República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 122015020130-6 A2

(22) Data do Depósito: 20/07/2012

(43) Data da Publicação Nacional: 24/01/2013

(54) Título: BIOMASSA DE UM MICROORGANISMO, ÓLEO E PRODUTO PARA ALIMENTAÇÃO

(51) Int. Cl.: C12P 7/64.

(30) Prioridade Unionista: 21/07/2011 US 61/510,464.

(71) Depositante(es): DSM IP ASSETS B.V..

(72) Inventor(es): KIRK E. APT; PAUL WARREN BEHRENS; JOSEPH W. PFEIFER III; JON MILTON HANSEN; JOSE R. GARCIA; XIAO DANIEL DONG.

(86) Pedido PCT: PCT US2012047728 de 20/07/2012

(87) Publicação PCT: WO 2013/013208 de 24/01/2013

(85) Data da Fase Nacional: 20/08/2015

(62) Pedido original do dividido: BR112014001443-4 - 20/07/2012

(57) Resumo: RESUMO BIOMASSA DE UM MICROORGANISMO, ÓLEO E PRODUTO PARA ALIMENTAÇÃO. A presente invenção é dirigida a biomassas de microorganismos que possui ácidos graxos e uma concentração de EPA, óleos microbianos extraídos de uma biomassa produzida a partir de um microorganismo isolado depositado sob o número de acesso ATCC PTA-10208, em que o óleo compreende ácidos graxos em que os ácidos graxos compreendem adicionalmente ácidos graxos polinsaturados ômega-3, em que os ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 compreendem DHA e EPA em uma quantidade de cerca de = 90%, em peso, da quantidade total de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e da quantidade de EPA, em peso, que é de cerca de 6% até cerca de 65% da quantidade total de EPA e DHA e produtos para alimentação que compreendem biomassa.

"BIOMASSA DE UM MICROORGANISMO, ÓLEO E PRODUTO PARA ALIMENTAÇÃO".

Dividido do BR 1120140014434, depositado em 20/07/2012.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Campo da invenção

[001] A presente invenção é dirigida aos microorganismos isolados, bem como às cepas e mutantes destes, biomassas, óleos microbianos, composições e culturas; métodos de produção dos óleos microbianos, biomassas e mutantes; e métodos de utilização dos microorganismos isolados, biomassas e óleos microbianos.

Fundamentos da técnica

[002] Os ácidos graxos são classificados com base nas características de comprimento e saturação da cadeia de carbono. Os ácidos graxos são denominados ácidos graxos de cadeia curta, cadeia média ou cadeia longa com base no número de carbonos presentes na cadeia, são denominados ácidos graxos saturados quando nenhuma ligação dupla está presente entre os átomos de carbono, e são denominados ácidos graxos insaturados quando ligações duplas estão presentes. Ácidos graxos insaturados de cadeia longa são monoinsaturados quando apenas uma ligação dupla está presente e são poliinsaturados quando mais de uma ligação dupla está presente.

[003] Ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) são classificados com base na posição da primeira ligação dupla da extremidade metil do ácido graxo: ácidos graxos ômega-3 (n-3) contêm uma primeira ligação dupla no terceiro carbono, enquanto ácidos graxos ômega-6 (n-6) contêm uma primeira ligação dupla no sexto carbono. Por exemplo, ácido

docosahexaenóico (“DHA”) é um ácido graxo poliinsaturado ômega-3 de cadeia longa (LC-PUFA) com um comprimento de cadeia de 22 carbonos e 6 ligações duplas, freqüentemente designado “22:6 n-3”. Outros LC-PUFAs ômega-3 incluem ácido eicosapentaenóico (“EPA”), designado “20:5 n-3” e ácido docosapentaenóico ômega-3 (“DPA n-3”), designado “22:5 n-3”. DHA e EPA foram denominados ácidos graxos “essenciais”. LC-PUFAs ômega-6 incluem ácido araquidônico (“ARA”), designado “20:4 n-6” e ácido docosapentaenóico ômega-6 (“DPA n-6”), designado “22:5 n-6”.

[004] Ácidos graxos ômega-3 são moléculas biologicamente importantes que afetam a fisiologia celular em função de sua presença em membranas celulares, regulam a produção e expressão gênica de compostos biologicamente ativos e servem como substratos biossintéticos (Roche, H.M, *Proc. Nutr. Soc*. 58: 397-401 (1999)). DHA, por exemplo, é responsável por aproximadamente 15%-20% dos lipídeos no córtex cerebral humano, 30%-60% dos lipídeos na retina, está concentrado nos testículos e no esperma, e é um componente importante do leite materno (Berge, J.P., e Barnathan, G. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol*. 96: 49-125 (2005)). DHA é responsável por até 97% dos ácidos graxos ômega-3 no cérebro e até 93% dos ácidos graxos ômega-3 na retina. Além disso, DHA é essencial para o desenvolvimento tanto fetal quanto do recém-nascido, bem como na manutenção de funções cognitivas em adultos. *Id*. Como os ácidos graxos ômega-3 não são sintetizados *de novo* no corpo humano, esses ácidos graxos devem ser derivados de fontes nutricionais.

[005] O óleo de semente de linhaça e óleos de peixe são considerados boas fontes dietéticas de ácidos graxos

ômega-3. O óleo de semente de linhaça não contém EPA, DHA, DPA ou ARA, mas, ao invés disso, contém ácido linolênico (C18:3 n-3), um bloco construtivo que permite que o corpo fabrique EPA. Há evidências, no entanto, de que a taxa de conversão metabólica pode ser lenta e variável, particularmente entre aqueles com saúde prejudicada. Os óleos de peixe variam consideravelmente no tipo e nível de composição de ácido graxo, dependendo da espécie particular e de suas dietas. Por exemplo, peixes criados por aqüicultura tendem a ter um nível menor de ácidos graxos ômega-3 do que aqueles selvagens. Além disso, óleos de peixe carregam o risco de conterem contaminantes ambientais e podem estar associados a problemas de estabilidade e um odor ou gosto de peixe.

[006] Traustoquitrídeos são microorganismos da ordem Thraustochytriales. Traustoquitrídeos incluem membros dos gêneros *Schizochytrium* e *Thraustochytrium* e foram reconhecidos como uma fonte alternativa de ácidos graxos ômega-3, incluindo DHA e EPA. Veja a Patente U.S. N° 5.130.242. Óleos produzidos por esses microorganismos heterotróficos marinos freqüentemente possuem perfis de ácido graxo poliinsaturado mais simples do que óleos de peixe ou de microalgas correspondentes (Lewis, T.E., *Mar. Biotechnol.* 1: 580-587 (1999)). Foram relatadas cepas de espécies de traustoquitrídeo para produzir ácidos graxos ômega-3 como uma percentagem elevada dos ácidos graxos totais produzidos pelos organismos (Patente U.S. N° 5.130.242; Huang, J. *e cols.*, *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 78: 605-610 (2001); Huang, J. *e cols.*, *Mar. Biotechnol.* 5: 450-457 (2003)). No entanto, traustoquitrídeos isolados variam

na identidade e quantidades de LC-PUFAs produzidos, de tal forma que algumas cepas descritas previamente podem ter níveis indesejáveis de ácidos graxos ômega-6 e/ou podem demonstrar baixa produtividade em cultura. Dessa forma, existe uma necessidade contínua pelo isolamento de microorganismos que demonstrem alta produtividade e perfis de LC-PUFA desejáveis.

BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[007] Os requerentes verificaram que a quantidade de EPA e DHA, produzida por um Traustoquitrídeo que produz uma biomassa que possui pelo menos 3% de EPA, pode ser modulada pela variação das quantidades de dióxido de carbono dissolvido (CO_2) em uma fase aquosa de um caldo de fermentação durante a fermentação do microorganismo. É aqui fornecido um método de produção de uma biomassa de um microorganismo que possui ácidos graxos e uma concentração de EPA, que compreende: fermentação do microorganismo em um vaso fermentador que possui um gás dissolvido em um caldo de fermentação para produzir uma biomassa, em que o microorganismo compreende um Traustoquitrídeo que produz uma biomassa que possui pelo menos 3% de EPA do peso total dos ácidos graxos; e ajuste dos níveis de CO_2 dissolvido no gás dissolvido. Em uma modalidade, os níveis de CO_2 dissolvido podem ser ajustados para obter um nível desejado de EPA e/ou DHA na biomassa. Em uma modalidade adicional a quantidade de CO_2 dissolvido na fase aquosa de um caldo de fermentação ranges de cerca de 38 até cerca de 600 ppm do gás dissolvido total e, particularmente, de cerca de 38 até cerca de 135 ppm do gás dissolvido total.

[008] É ainda aqui fornecido um método de produção de

uma biomassa de um microorganismo que possui ácidos graxos e uma concentração de EPA, que compreende: fermentação do microorganismo em um vaso fermentador, que compreende um gás, para produzir uma biomassa, em que o microorganismo compreende um Traustoquitrídeo que produz uma biomassa que possui pelo menos 3% de EPA do peso total dos ácidos graxos; e suplementação do gás com CO_2. Suplementação significa adicionar ou carregar os vasos com CO_2 em uma quantidade adicional à quantidade produzida pela fermentação das células ou uma quantidade em condições ambientes. Em uma modalidade, o CO_2 é suplementado ao vaso para obter uma quantidade desejada de EPA e/ou DHA na biomassa.

[009] Também é aqui fornecido um método de produção de uma biomassa de um microorganismo que possui ácidos graxos e uma concentração de EPA, que compreende: fermentação do microorganismo em um vaso fermentador para produzir uma biomassa, em que o microorganismo compreende um Traustoquitrídeo que produz uma biomassa que possui pelo menos 3% de EPA do peso total dos ácidos graxos; e ajuste da quantidade da biomassa no vaso. Em uma modalidade da invenção, a biomassa é ajustada para obter um nível desejado de EPA ou DHA na biomassa.

[010] Um método de produção de um microorganismo que possui ácidos graxos e uma concentração de EPA, que compreende: fermentação do microorganismo em um vaso fermentador para produzir uma biomassa, em que o microorganismo compreende um Traustoquitrídeo que produz uma biomassa que possui pelo menos 3% de EPA do peso total dos ácidos graxos; e ajuste da pressão na biomassa, por

exemplo, sem limitação, controle da pressão de retorno do vaso. Em uma modalidade, a pressão é ajustada para obter um nível desejado de EPA ou DHA na biomassa.

[011] Em outra modalidade, é aqui fornecido um método de produção de um microorganismo que possui ácidos graxos e uma concentração de EPA, que compreende: fermentação do microorganismo em um vaso fermentador para produzir um caldo de fermentação e uma biomassa, em que o microorganismo compreende um Traustoquitrídeo que produz uma biomassa que possui pelo menos 3% de EPA do peso total dos ácidos graxos; e ajuste da temperatura no caldo. Em uma modalidades a temperatura é ajustada para obter um nível desejado de EPA e/ou DHA na biomassa.

[012] Em várias modalidades, as quantidades de EPA e DHA também podem ser moduladas por ajuste da quantidade de CO_2 dissolvido em uma fase aquosa ou caldo de fermentação do vaso por aumento ou diminuição da quantidade de CO_2 no vaso. A quantidade de CO_2 dissolvido pode ser ajustada por ajuste adicional da quantidade da biomassa fermentada. Por exemplo, por fermentação das células em frascos e vasos de fermentação maiores. O EPA e DHA também podem ser variados de acordo com modalidades aqui fornecidas por variação da temperatura. A quantidade de CO_2 dissolvido pode ser adicionalmente ajustada, por exemplo, por ajuste da temperatura no vaso. Por exemplo, temperaturas do vaso menores produzirão concentrações maiores de EPA e concentrações menores de DHA. A quantidade de CO_2 dissolvido pode ainda ser ajustada por ajuste da pressão no vaso. Por exemplo, o aumento da pressão irá provavelmente aumentar CO_2 dissolvido, o que aumentará a quantidade de

EPA e diminuirá a quantidade de DHA na biomassa. Cada um dos ajustes descritos acima, por exemplo, CO_2 suplementado, aumento ou diminuição na biomassa, aumento ou diminuição na temperatura ou aumento ou diminuição na pressão, pode ser combinada com quaisquer outros ajustes para obter um nível desejado de EPA e DHA na biomassa e de qualquer óleo extraído da biomassa. O CO_2 dissolvido também pode ser ajustado por uma alteração no pH.

[013] Em algumas modalidades, a quantidade total de EPA e DHA permanece relativamente constante comparada com a quantidade, por peso, do peso total dos ácidos graxos e ácidos graxos ômega-3.

[014] Em modalidades adicionais, o teor de EPA ou DHA da biomassa é medido prior antes da realização de um ajuste à quantidade do CO_2 suplementado, pressão, temperatura ou biomassa.

[015] Sem se prender a nenhuma teoria, formulamos a hipótese de que o aumento e a diminuição nas quantidades do EPA ou DHA estão diretamente relacionados com a quantidade de CO_2 dissolvido na fase aquosa do caldo de fermentação e de que os ajustes descritos acima de CO_2, da pressão e da temperatura, variam a quantidade de CO_2 dissolvido na biomassa.

[016] Em algumas modalidades, a invenção fornece um método de produção de uma biomassa de um microorganismo que possui concentração aumentada de EPA, o método compreendendo o crescimento do microorganismo em um meio de cultura que compreende menos do que 0,1 mg/l de vitamina B12 para produzir uma biomassa. Em algumas modalidades, o meio de cultura compreende menos do que 0,01 mg/l de

vitamina B12. Em algumas modalidades, o meio de cultura compreende menos do que 0,001 mg/l de vitamina B12. Em modalidades adicionais, o meio de cultura compreende menos do que 0,0001 mg/l de vitamina B12. Em algumas modalidades, o meio de cultura não contém vitamina B12.

[017] Em algumas modalidades, o meio de cultura ainda compreende menos do que 1 g de extrato de levedura por 50 g de biomassa livre de lipídeo. Em algumas modalidades, o meio de cultura ainda compreende menos do que 0,5 g de extrato de levedura por 50 g de biomassa livre de lipídeo. Em modalidades adicionais, o meio de cultura ainda compreende menos do que 0,1 g de extrato de levedura por 50 g de biomassa livre de lipídeo.

[018] Em algumas modalidades, a concentração de EPA está aumentada por pelo menos 400% comparada com a concentração de EPA em uma biomassa obtida do microorganismo desenvolvido em um meio de cultura que compreende mais do que 0,1 mg/l de vitamina B12. Em algumas modalidades, a concentração de EPA está aumentada por pelo menos 300% comparada com a concentração de EPA em uma biomassa de um microorganismo desenvolvido em um meio de cultura que compreende mais do que 0,01 mg/l de vitamina B12. Em modalidades adicionais, a concentração de EPA está aumentada por pelo menos 200% comparada com a concentração de EPA em uma biomassa de um microorganismo desenvolvido em um meio de cultura que compreende mais do que 0,001 mg/l de vitamina B12. Em algumas modalidades, a concentração de EPA está aumentada por pelo menos 100% comparada com a concentração de EPA em uma biomassa de um microorganismo desenvolvido em um meio de cultura que compreende mais do

que 0,0001 mg/l de vitamina B12.

[019] Em algumas modalidades, a invenção fornece um método de produção de uma biomassa de um microorganismo que possui concentração aumentada de EPA, que compreende o crescimento do microorganismo em um meio de cultura que compreende menos do que 0,1 mg/l de cobalto para produzir uma biomassa. Em algumas modalidades, o meio de cultura compreende menos do que 0,01 mg/l de cobalto. Em algumas modalidades, o meio de cultura compreende menos do que 0,001 mg/l de cobalto. Em modalidades adicionais, o meio de cultura compreende menos do que 0,0001 mg/l de cobalto. Em algumas modalidades, o meio de cultura não contém cobalto.

[020] Em algumas modalidades, o microorganismo é um Traustoquitrídeo. Em algumas modalidades, o microorganismo produz pelo menos 3% de EPA do peso total dos ácidos graxos.

[021] Em algumas modalidades, o meio de cultura possui um nível de CO_2 dissolvido de pelo menos 5%. Em modalidades adicionais, o meio de cultura possui um nível de CO_2 dissolvido de pelo menos 10%. Em algumas modalidades, o meio de cultura possui um nível de CO_2 dissolvido de pelo menos 15%.

[022] A invenção também fornece uma biomassa isolada, e um óleo microbiano extraído da biomassa de qualquer um dos métodos aqui apresentados.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[023] As várias modalidades da invenção podem ser mais plenamente compreendidas a partir da descrição detalhada seguinte, das figuras e das descrições de seqüências que a acompanham, que formam uma parte desse pedido.

[024] A FIG. 1 mostra o desempenho de PTA-9695 em um gradiente de tiamina.

[025] A FIG. 2 mostra o desempenho de PTA-9695 em um gradiente de vitamina B12.

[026] A FIG. 3 mostra o desempenho de PTA-9695 em um gradiente de biotina.

[027] A FIG. 4 mostra o desempenho de PTA-9695 em um gradiente de Ca-pantotenato.

[028] A FIG. 5 mostra o desempenho de PTA-9695 em padrões de TSFM.

[029] FIG. 6 - FIG. 19 mostram o desempenho de PTA-9695 em um gradiente de vitamina B12 a CO_2 10%.

[030] FIG. 20 - FIG. 49 mostram o desempenho de PTA-10208 em um gradiente de vitamina B12 a CO_2 10%.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[031] Os métodos e composições aqui fornecidos são particularmente aplicáveis a um Traustoquitrídeo que produz uma biomassa que possui pelo menos 3% de EPA do peso total dos ácidos graxos que produz. Um Traustoquitrídeo particular que produz uma biomassa que possui pelo menos 3% de EPA aqui fornecido é um microorganismo isolado da espécie depositada sob o N° de Acesso na ATCC PTA-10212. O microorganismo isolado associado ao N° de Acesso na ATCC PTA-10212 foi depositado sob o Tratado de Budapeste em 14 de julho de 2009 na “American Type Culture Collection”, Depositório de Patentes, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 201 10-2209.

[032] Um Traustoquitrídeo particular que produz uma biomassa que possui pelo menos 3% de EPA é selecionado de um microorganismo isolado depositado sob o N° de Acesso na

ATCC PTA-10212, PTA-10213, PTA-10214, PTA-10215, PTA-10208, PTA-10209, PTA-10210 ou PTA-10211.

[033] Uma modalidade particular aqui fornecida é dirigida a um microorganismo isolado que compreende um 18s rRNA que compreende uma seqüência de polinucleotídeos do ID. DE SEQ. N°: 1 ou uma seqüência de polinucleotídeos que possui pelo menos 94% de identidade para o ID. DE SEQ. N°: 1.

[034] Uma modalidade particular aqui fornecida é dirigida a um microorganismo isolado que compreende seqüência de polinucleotídeos de um 18s rRNA que possui pelo menos 94% de identidade para seqüência de polinucleotídeos de um 18s rRNA do microorganismo depositado sob o N° de Acesso na ATCC PTA-10212.

[035] Um Traustoquitrídeo particular que produz uma biomassa que possui pelo menos 3% de EPA aqui fornecido é dirigido a um microorganismo isolado da espécie depositada sob o N° de Acesso na ATCC PTA-10208.

[036] Uma modalidade particular aqui fornecida é dirigida a um microorganismo isolado da espécie depositada sob o N° de Acesso na ATCC PTA-10208, em que os ácidos graxos totais produzidos pelo microorganismo compreendem mais do que cerca de 10% por peso de ácido eicosapentaenóico.

[037] Um Traustoquitrídeo particular que produz uma biomassa que possui pelo menos 3% de EPA da presente invenção é dirigido a um microorganismo isolado que possui as características da espécie depositada sob o N° de Acesso na ATCC PTA-10208, em que os ácidos graxos totais produzidos pelo microorganismo compreendem mais do que

cerca de 10% por peso de ácido eicosapentaenóico. Um Traustoquitrídeo particular que produz uma biomassa que possui pelo menos 3% de EPA aqui fornecido é selecionado de um microorganismo isolado selecionado de uma cepa mutante depositada sob o N° de Acesso na ATCC PTA-10209, PTA-10210 ou PTA-10211. Os microorganismos associados aos N^{os} de Acesso na ATCC PTA-10209, PTA-10210 e PTA-10211 foram depositados sob o Tratado de Budapeste em 25 de setembro de 2009 na "American Type Culture Collection", Depositório de Patentes, 10801 University Boulevard, Manassas, V A 201 10-2209.

[038] Modalidades aqui fornecidas são dirigidas aos microorganismos descritos acima, suas cepas mutantes e aos microorganismos identificados no Pedido de Patente U.S. N° 12/729.013 aqui incorporado por referência em sua totalidade.

[039] Uma modalidade aqui fornecida é dirigida a um microorganismo isolado que produz uma fração de triacilglicerol, em que o teor de ácido eicosapentaenóico da fração de triacilglicerol é pelo menos cerca de 12% por peso.

[040] Uma modalidade aqui fornecida é dirigida a uma biomassa isolada, em que pelo menos cerca de 20% por peso da massa de células secas da biomassa são ácidos graxos, em que mais do que cerca de 10% por peso de ácidos graxos é ácido eicosapentaenóico, e em que os ácidos graxos compreendem menos do que cerca de 5% por peso de cada um de ácido araquidônico e ácido docosapentaenóico n-6. Em algumas modalidades, pelo menos cerca de 25% por peso dos ácidos graxos é ácido docosahexaenóico.

[041] Em algumas modalidades, a presente invenção é dirigida a uma biomassa isolada que compreende triacilglicerol, em que pelo menos cerca de 12% por peso de triacilglicerol é ácido eicosapentaenóico.

[042] Em algumas modalidades, a presente invenção é dirigida a qualquer uma das biomassas isoladas da invenção em que os ácidos graxos ainda compreendem menos do que cerca de 5% por peso de cada um de ácido oléico, ácido linoléico, ácido linolênico, ácido eicosenóico e ácido erúcico.

[043] A presente invenção é dirigida a um microorganismo traustoquitrídeo isolado da espécie traustoquitrídeo depositada sob o N° de Acesso na ATCC PTA-9695 ou uma cepa dele derivada, em que os ácidos graxos totais produzidos pelo referido microorganismo ou cepa dele derivada compreendem cerca de 10% ou menos por peso de ácido eicosapentaenóico. Uma modalidade aqui fornecida é dirigida ao microorganismo descrito acima ou uma cepa dele derivada e outro microorganismo relacionado descrito na Publicação de Pedido de Patente U.S. N° US 2010/0239533 aqui incorporada por referência em sua totalidade.

[044] Também é aqui fornecido um método de aumento da concentração de EPA em uma biomassa de um microorganismo que possui ácidos graxos e uma concentração de EPA que compreende: fermentação do microorganismo em um vaso fermentador, que compreende um gás, para produzir uma biomassa, em que o microorganismo compreende um Traustoquitrídeo que produz uma biomassa que possui pelo menos 3% de EPA do peso total dos ácidos graxos; e suplementação do gás com CO_2 em uma quantidade suficiente

para aumentar a concentração do EPA na biomassa. O aumento na concentração do EPA pode ser comparado, por exemplo, com a concentração de EPA no microorganismo similarmente fermentado não suplementado com CO_2 ou quando comparado com um microorganismo similarmente fermentado em condições ambientes.

[045] Em outra modalidade, a quantidade de CO_2 suficiente para aumentar a concentração do EPA é maior ou igual a 2% do gás total no vaso. Em outra modalidade, a quantidade do CO_2 no vaso é maior ou igual a cerca de 5% até cerca de 20% do gás total no vaso. Em outra modalidade, a quantidade do CO_2 no vaso é maior ou igual a cerca de 5% até cerca de 15% do gás total no vaso.

[046] Em uma modalidade adicional, a quantidade de CO_2 suplementado é maior ou igual a 2% do gás total no vaso para aumentar a concentração do EPA na biomassa até mais do que cerca de 4% por peso do peso total dos ácidos graxos, mais particularmente de cerca de mais do que 4% até cerca de 45% por peso do peso total dos ácidos graxos, mais particularmente, de cerca de mais do que 4% até cerca de 40% do peso total dos ácidos graxos.

[047] Em uma modalidade adicional, a quantidade de CO_2 suplementado é suficiente para aumentar os níveis de EPA de cerca de 4% até uma faixa de cerca de 6 a 30% por peso do peso total dos ácidos graxos. Em outra modalidade, a quantidade de CO_2 fornecida é suficiente para aumentar a concentração do EPA de cerca de 15% até cerca de 40%, por peso do peso total dos ácidos graxos. Em outra modalidade, a quantidade de CO_2 fornecida é suficiente para aumentar a concentração do EPA até mais do que 20% por peso do peso

total dos ácidos graxos. Em outra modalidade, o CO_2 é fornecido em uma quantidade suficiente para aumentar a concentração do EPA de cerca de 20% até cerca de 25%.

[048] Em outra modalidade, é aqui fornecido um método de aumento da concentração de EPA em uma biomassa de um microorganismo que possui ácidos graxos e uma concentração de EPA que compreende: fermentação do microorganismo em um vaso fermentador para produzir uma biomassa; fornecimento de uma pressão na biomassa suficiente para aumentar a concentração do EPA na biomassa. O aumento na concentração do EPA pode ser comparado, por exemplo, com a concentração de EPA microorganismo similarmente fermentado que não recebeu a pressão ou quando comparado com um microorganismo similarmente fermentado em condições ambientes. Em uma modalidade adicional, a pressão fornecida na biomassa é cerca de 3,44 kPa acima da pressão atmosférica. Em outra modalidade, o vaso possui uma pressão de entrada (ou pressão de retorno) maior ou igual a cerca de 2,75 kPa, mais particularmente de cerca de 2,75 kPa até cerca de 206,84 kPa, ainda mais particularmente de cerca de 6,89 até cerca de 206,84 kPa. Em outra modalidade, o vaso possui uma pressão de entrada de cerca de 6,89 até cerca de 137,89 kPa. Em outra modalidade, a pressão fornecida é fornecida por um tempo suficiente para ajustar a quantidade de EPA na biomassa, particularmente por um tempo de até 120 horas.

[049] Em outra modalidade, é aqui fornecido um método de produção de uma biomassa de um microorganismo que produz ácidos graxos e uma concentração de EPA, que compreende as fermentação do microorganismo em um vaso fermentador para produzir uma biomassa, em que o microorganismo compreende

um Traustoquitrídeo que produz uma biomassa que possui pelo menos 3% de EPA do peso total dos ácidos graxos em uma temperatura suficiente para aumentar a concentração do EPA na biomassa. Em algumas modalidades, a temperatura suficiente para aumentar os níveis de EPA é menos do que cerca de 30°C, mais particularmente é menor ou igual a cerca de 22°C e, mais particularmente, a temperatura é menor ou igual a cerca de 21°C. O aumento na concentração do EPA pode ser comparado, por exemplo, com a concentração de EPA em um microorganismo similarmente fermentado em que a temperatura não é ajustada ou quando comparado com um microorganismo similarmente fermentado em condições ambientes.

[050] Em uma modalidade adicional, os métodos aqui fornecidos variam as quantidades de EPA geradas durante fermentação para produzir uma biomassa, e um óleo extraído, em que a quantidade de EPA fornecida é mais do que 4%, particularmente de cerca de mais do que 4% até cerca de 45%, mais particularmente de cerca de mais do que 4% até cerca de 40% por peso, do peso total dos ácidos graxos. Em outra modalidade, a quantidade de EPA produzida por um método aqui fornecido está em uma quantidade de cerca de 6% até cerca de 30% por peso do peso total dos ácidos graxos. Em uma modalidade adicional, a quantidade de EPA produzida por um método aqui fornecido está em uma quantidade de cerca de 15% até cerca de 40% por peso do peso total dos ácidos graxos. Em uma modalidade adicional, a quantidade de EPA produzida por um método aqui fornecido está em uma quantidade de mais do que cerca de 20%, mais particularmente de cerca de 20% até cerca de 25% por peso

do peso total dos ácidos graxos.

[051] Em uma modalidade adicional, o nível desejado de EPA fornecido é mais do que 4%, particularmente de cerca de mais do que 4% até cerca de 45%, mais particularmente de cerca de mais do que 4% até cerca de 40% por peso, do peso total dos ácidos graxos. Em outra modalidade, o nível desejado de EPA produzido por um método aqui fornecido está em uma quantidade de cerca de 6% até cerca de 30% por peso do peso total dos ácidos graxos. Em uma modalidade adicional, o nível desejado de EPA produzido por um método aqui fornecido está em uma quantidade de cerca de 15% até cerca de 40% por peso do peso total dos ácidos graxos. Em uma modalidade adicional, o nível desejado de EPA produzido por um método aqui fornecido está em uma quantidade de mais do que cerca de 20%, mais particularmente de cerca de 20% até cerca de 25% por peso do peso total dos ácidos graxos.

[052] Um método de aumento da concentração de EPA em uma biomassa de um microorganismo que possui ácidos graxos e uma concentração de EPA que compreende: fermentação do microorganismo em um vaso fermentador para produzir uma biomassa em que o microorganismo Traustoquitrídeo que produz uma biomassa que possui pelo menos 3% de EPA do peso total dos ácidos graxos; e aumento da biomassa em uma quantidade suficiente para aumentar a concentração do EPA na biomassa. Em algumas modalidades, a quantidade de biomassa suficiente para aumentar a concentração do EPA possui uma densidade maior ou igual a 10 g/l. Em algumas modalidades, a quantidade de biomassa suficiente para aumentar a concentração do EPA possui uma densidade de cerca de 10 g/l até cerca de 250 g/l. O aumento na

concentração do EPA pode ser comparado, por exemplo, com a concentração de EPA em um microorganismo similarmente fermentado em que a biomassa não é aumentada.

[053] Em algumas modalidades, a concentração de EPA da biomassa crescida em um meio de cultura que compreende um nível maior de CO_2 (por exemplo, em um vaso que compreende CO_2 em uma quantidade maior ou igual a 2%, maior ou igual a 5%, maior ou igual a 10%, maior ou igual a 15%, maior ou igual a 20%, 5% a 20% ou 5% a 15% do gás total no vaso) é pelo menos 10%, pelo menos 50%, pelo menos 100%, pelo menos 250%, pelo menos 500%, pelo menos 750%, pelo menos 1.000%, pelo menos 1.100%, pelo menos 1.200%, pelo menos 1.300%, pelo menos 1.400%, pelo menos 1.500%, pelo menos 1.600%, pelo menos 1.700%, pelo menos 1.800%, pelo menos 1.900% ou pelo menos 2.000% maior do que a concentração de EPA em uma biomassa obtida do microorganismo desenvolvido em um meio de cultura que compreende níveis menores de CO_2 (por exemplo, em um vaso que compreende CO_2 em uma quantidade de menos do que 2%, menos do que 5%, menos do que 10%, menos do que 15%, menos do que 20%, 0% a 4% ou 1% a 3% do gás total no vaso, respectivamente). Por exemplo, a concentração de EPA da biomassa crescida em um meio de cultura que compreende um nível maior de CO_2 (por exemplo, em um vaso que compreende CO_2 em uma quantidade maior ou igual a 2%, maior ou igual a 5%, maior ou igual a 10%, maior ou igual a 15%, maior ou igual a 20%, 5% a 20% ou 5% a 15% do gás total no vaso) é pelo menos 10%, pelo menos 50%, pelo menos 100%, pelo menos 250%, pelo menos 500%, pelo menos 750%, pelo menos 1.000%, pelo menos 1 100%, pelo menos 1.200%, pelo menos 1.300%, pelo menos 1.400%, pelo

menos 1.500%, pelo menos 1.600%, pelo menos 1.700%, pelo menos 1.800%, pelo menos 1.900% ou pelo menos 2.000% maior do que a concentração de EPA em uma biomassa obtida do microorganismo desenvolvido em um vaso em um nível de CO_2 ambiente.

Vitamina B12 em meio de cultura

[054] O termo "vitamina B12", como aqui usado, se refere a uma classe de compostos quimicamente relacionados tanto em formas de ocorrência natural e sintéticas, incluindo, sem limitação, vitamina B12, cobalamina, cianocobalamina e hidroxocobalamina. Em algumas modalidades, a invenção fornece métodos de aumento da concentração de EPA na biomassa de um microorganismo que produz EPA por crescimento do microorganismo em um meio de cultura que possui níveis baixos de vitamina B12 ou em um meio de cultura que não possui vitamina B12. Em algumas modalidades, a invenção fornece métodos de produção de uma biomassa de um microorganismo que possui concentração aumentada de EPA, que compreende o crescimento do microorganismo em um meio de cultura que compreende menos do que 0,1 mg/l de vitamina B12 para produzir uma biomassa. Em algumas modalidades, o meio de cultura compreende menos do que 0,05 mg/l, menos do que 0,01 mg/l, menos do que 0,005 mg/l, menos do que 0,001 mg/l, menos do que 0,0005 mg/l, menos do que 0,0001 mg/l ou não possui vitamina B12.

[055] Em algumas modalidades, o meio de cultura compreende menos do que 1 g de fontes de vitamina B12 (por exemplo, extrato de levedura, sólidos de maceração de milho, farinha de soja e outras fontes de nitrogênio complexas) por 50 g de biomassa livre de lipídeo. Em

algumas modalidades, o meio de cultura compreende menos do que 0,8 g, menos do que 0,5 g, menos do que 0,3 g, menos do que 0,1 g, menos do que 0,05 g ou menos do que 0,01 g dessas fontes de vitamina B12 por 50 g de biomassa livre de lipídeo. Em algumas modalidades, o meio de cultura ainda compreende menos do que 1 g de extrato de levedura por 50 g de biomassa livre de lipídeo, menos do que 0,8 g de extrato de levedura por 50 g de biomassa livre de lipídeo, menos do que 0,5 g de extrato de levedura por 50 g de biomassa livre de lipídeo, menos do que 0,3 g de extrato de levedura por 50 g de biomassa livre de lipídeo, menos do que 0,1 g de extrato de levedura por 50 g de biomassa livre de lipídeo, menos do que 0,05 g de extrato de levedura por 50 g de biomassa livre de lipídeo, ou menos do que 0,01 g de extrato de levedura por 50 g de biomassa livre de lipídeo. Como aqui usado, o termo “biomassa livre de lipídeo” se refere à massa de células secas livre de gordura-alvo do microorganismo após cultivo.

[056] Em algumas modalidades, a concentração de EPA da biomassa crescida em um meio de cultura que compreende um nível menor de vitamina B12 (por exemplo, em um meio de cultura que compreende menos do que 0,1 mg/l, menos do que 0,05 mg/l, menos do que 0,01 mg/l, menos do que 0,005 mg/l, menos do que 0,001 mg/l, menos do que 0,0005 mg/l, menos do que 0,0001 mg/l ou não possui vitamina B12) é pelo menos 10%, pelo menos 25%, pelo menos 50%, pelo menos 75%, pelo menos 100%, pelo menos 150%, pelo menos 200%, pelo menos 250%, pelo menos 300%, pelo menos 350%, pelo menos 400%, pelo menos 450%, pelo menos 500%, pelo menos 550%, pelo menos 600%, pelo menos 650% ou pelo menos 700% maior do que

a concentração de EPA em uma biomassa obtida do microorganismo desenvolvido em um meio de cultura que compreende níveis maiores de vitamina B12 (por exemplo, em um meio de cultura que compreende pelo menos 0,1 mg/l, pelo menos 0,05 mg/l, pelo menos 0,01 mg/l, pelo menos 0,005 mg/l, pelo menos 0,001 mg/l, pelo menos 0,0005 mg/l, pelo menos 0,0001 mg/l ou pelo menos 0,00005 mg/l de vitamina B12, respectivamente). Por exemplo, a concentração de EPA da biomassa crescida em um meio de cultura que não contém vitamina B12 é pelo menos 10%, pelo menos 25%, pelo menos 50%, pelo menos 75%, pelo menos 100%, pelo menos 150%, pelo menos 200%, pelo menos 250%, pelo menos 300%, pelo menos 350%, pelo menos 400%, pelo menos 450%, pelo menos 500%, pelo menos 550%, pelo menos 600%, pelo menos 650% ou pelo menos 700% maior do que a concentração de EPA em uma biomassa obtida do microorganismo desenvolvido em um meio de cultura que compreende vitamina B12 (por exemplo, pelo menos 0,0001 mg/l de vitamina B12).

[057] Em algumas modalidades, a concentração de EPA da biomassa crescida em um meio de cultura que compreende níveis menores de vitamina B12 (por exemplo, em um meio de cultura que compreende menos do que 0,1 mg/l, menos do que 0,05 mg/l, menos do que 0,01 mg/l, menos do que 0,005 mg/l, menos do que 0,001 mg/l, menos do que 0,0005 mg/l, menos do que 0,0001 mg/l ou não possui vitamina B12) sob um nível de CO_2 ambiente é pelo menos 100%, pelo menos 200%, pelo menos 300%, pelo menos 400% ou pelo menos 500% maior do que a concentração de EPA em uma biomassa obtida do microorganismo desenvolvido em um meio de cultura que compreende níveis maiores de vitamina B12 (por exemplo, em

um meio de cultura que compreende pelo menos 0,1 mg/l, pelo menos 0,05 mg/l, pelo menos 0,01 mg/l, pelo menos 0,005 mg/l, pelo menos 0,001 mg/l, pelo menos 0,0005 mg/l, pelo menos 0,0001 mg/l ou pelo menos 0,00005 mg/l de vitamina B12, respectivamente) sob um nível de CO_2 ambiente. Em algumas modalidades, a concentração de EPA da biomassa crescida em um meio de cultura que compreende níveis menores de vitamina B12 sob um nível de CO_2 ambiente é 100% a 700%, 150% a 650%, 200% a 600%, 250% a 550% ou 300% a 500% maior do que a concentração de EPA em uma biomassa obtida do microorganismo desenvolvido em um meio de cultura que compreende níveis maiores de vitamina B12 sob um nível de CO_2 ambiente. Em algumas modalidades, a concentração de EPA da biomassa crescida em um meio de cultura que compreende níveis menores de vitamina B12 sob um nível elevado de CO_2 (por exemplo, um nível de CO_2 dissolvido de pelo menos 5%, pelo menos 10%, pelo menos 15% ou pelo menos 20%) é pelo menos 5%, pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90% ou pelo menos 100% maior do que a concentração de EPA em uma biomassa obtida do microorganismo desenvolvido em um meio de cultura que compreende níveis maiores de vitamina B12 sob um nível elevado de CO_2. Em algumas modalidades, a concentração de EPA da biomassa crescida em um meio de cultura que compreende níveis menores de vitamina B12 sob um nível elevado de CO_2 (por exemplo, um nível de CO_2 dissolvido de pelo menos 5%, pelo menos 10%, pelo menos 15% ou pelo menos 20%) é 5% a 200%, 10% a 175%, 15% a 150%, 20% a 125% ou 25%

a 100% maior do que a concentração de EPA em uma biomassa obtida do microorganismo desenvolvido em um meio de cultura que compreende níveis maiores de vitamina B12 sob um nível elevado de CO_2. Por exemplo, a concentração de EPA da biomassa crescida em um meio de cultura que não compreende vitamina B12 sob um nível de CO_2 ambiente é pelo menos 100%, pelo menos 200%, pelo menos 300%, pelo menos 400% ou pelo menos 500% maior do que a concentração de EPA em uma biomassa obtida do microorganismo desenvolvido em um meio de cultura que compreende vitamina B12 (por exemplo, pelo menos 0,0001 mg/l de vitamina B12) sob um nível de CO_2 ambiente. Como outro exemplo, a concentração de EPA da biomassa crescida em um meio de cultura que não compreende vitamina B12 sob um nível de CO_2 dissolvido de pelo menos 10% é pelo menos 5%, pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90% ou pelo menos 100% maior do que a concentração de EPA em uma biomassa obtida do microorganismo desenvolvido em um meio de cultura que compreende vitamina B12 (por exemplo, pelo menos 0,0001 mg/l de vitamina B12) sob um nível de CO_2 dissolvido de pelo menos 10%.

[058] Em algumas modalidades, a concentração de EPA está aumentada por pelo menos 100%, pelo menos 200%, pelo menos 300%, pelo menos 400% ou pelo menos 500% na biomassa de um microorganismo desenvolvido em um meio de cultura que possui menos do que 0,1 mg/l de vitamina B12, comparado com o mesmo microorganismo desenvolvido em um meio de cultura que possui mais do que 0,1 mg/l de vitamina B12. Em algumas

modalidades, a concentração de EPA está aumentada por pelo menos 100%, pelo menos 200%, pelo menos 300%, pelo menos 400% ou pelo menos 500% na biomassa de um microorganismo desenvolvido em um meio de cultura que possui menos do que 0,01 mg/l de vitamina B12, comparado com o mesmo microorganismo desenvolvido em um meio de cultura que possui mais do que 0,01 mg/l de vitamina B12. Em algumas modalidades, a concentração de EPA está aumentada por pelo menos 100%, pelo menos 200%, pelo menos 300%, pelo menos 400% ou pelo menos 500% na biomassa de um microorganismo desenvolvido em um meio de cultura que possui menos do que 0,001 mg/l de vitamina B12, comparado com o mesmo microorganismo desenvolvido em um meio de cultura que possui mais do que 0,001 mg/l de vitamina B12. Em modalidades adicionais, a concentração de EPA está aumentada por pelo menos 100%, pelo menos 200%, pelo menos 300%, pelo menos 400% ou pelo menos 500% na biomassa de um microorganismo desenvolvido em um meio de cultura que possui menos do que 0,0001 mg/l de vitamina B12, comparado com o mesmo microorganismo desenvolvido em um meio de cultura que possui mais do que 0,0001 mg/l de vitamina B12. Em algumas modalidades, a concentração de EPA está aumentada por pelo menos 100%, pelo menos 200%, pelo menos 300%, pelo menos 400% ou pelo menos 500% na biomassa de um microorganismo desenvolvido em um meio de cultura que não possui vitamina B12, comparado com o mesmo microorganismo desenvolvido em um meio de cultura que contém uma quantidade de vitamina B12. A determinação do aumento na concentração de EPA na biomassa pode ser feita por crescimento de um microorganismo em um meio de cultura que

possui quantidades maiores de vitamina B12, crescimento do mesmo microorganismo em um meio de cultura que possui quantidades menores de vitamina B12 e comparando-se a concentração de EPA na biomassa resultante de cada cultura. Nessa determinação, os teores do meio de cultura que possui quantidades menores ou maiores de vitamina B12 são iguais, exceto quanto ao seu nível de vitamina B12.

[059] Em algumas modalidades, a concentração de EPA da biomassa do microorganismo desenvolvido em um meio de cultura que compreende pelo menos 0,1 mg/l, pelo menos 0,05 mg/l, pelo menos 0,01 mg/l, pelo menos 0,005 mg/l, pelo menos 0,001 mg/l, pelo menos 0,0005 mg/l ou pelo menos 0,0001 mg/l de vitamina B12 é pelo menos 1%, pelo menos 2%, pelo menos 3%, pelo menos 4% ou pelo menos 5% de EPA por peso dos ácidos graxos totais. Em algumas modalidades, a concentração de EPA da biomassa do microorganismo desenvolvido em um meio de cultura que compreende pelo menos 0,1 mg/l, pelo menos 0,05 mg/l, pelo menos 0,01 mg/l, pelo menos 0,005 mg/l, pelo menos 0,001 mg/l, pelo menos 0,0005 mg/l ou pelo menos 0,0001 mg/l de vitamina B12 é 1% a 50%, 1% a 40%, 1% a 30%, 1% a 20%, 2% a 50%, 2% a 40%, 2% a 30% ou 2% a 20% de EPA por peso dos ácidos graxos totais.

Cobalto em meio de cultura

[060] Em algumas modalidades, a invenção fornece métodos de produção de uma biomassa de um microorganismo que possui concentração aumentada de EPA, que compreende o crescimento do microorganismo em um meio de cultura que compreende menos do que 0,1 mg/l de cobalto para produzir uma biomassa. Em algumas modalidades, o meio de cultura compreende menos do que 0,05 mg/l, menos do que 0,01 mg/l,

menos do que 0,005 mg/l, menos do que 0,001 mg/l, menos do que 0,0005 mg/l, menos do que 0,0001 mg/l ou não possui cobalto.

[061] Em algumas modalidades, o meio de cultura ainda compreende menos do que 1 g de extrato de levedura por 50 g de biomassa livre de lipídeo, menos do que 0,8 g de extrato de levedura por 50 g de biomassa livre de lipídeo, menos do que 0,5 g de extrato de levedura por 50 g de biomassa livre de lipídeo, menos do que 0,3 g de extrato de levedura por 50 g de biomassa livre de lipídeo, menos do que 0,1 g de extrato de levedura por 50 g de biomassa livre de lipídeo, menos do que 0,05 g de extrato de levedura por 50 g de biomassa livre de lipídeo, ou menos do que 0,01 g de extrato de levedura por 50 g de biomassa livre de lipídeo.

[062] Em algumas modalidades, a concentração de EPA da biomassa crescida em um meio de cultura que compreende um nível menor de cobalto (por exemplo, em um meio de cultura que compreende menos do que 0,1 mg/l, menos do que 0,05 mg/l, menos do que 0,01 mg/l, menos do que 0,005 mg/l, menos do que 0,001 mg/l, menos do que 0,0005 mg/l, menos do que 0,0001 mg/l ou não possui cobalto) é pelo menos 10%, pelo menos 25%, pelo menos 50%, pelo menos 75%, pelo menos 100%), pelo menos 150%, pelo menos 200%., pelo menos 250%, pelo menos 300%, pelo menos 350%, pelo menos 400%, pelo menos 450%, pelo menos 500%, pelo menos 550%, pelo menos 600%, pelo menos 650% ou pelo menos 700% maior do que a concentração de EPA em uma biomassa obtida do microorganismo desenvolvido em um meio de cultura que compreende níveis maiores de cobalto (por exemplo, em um meio de cultura que compreende pelo menos 0,1 mg/l, pelo

menos 0,05 mg/l, pelo menos 0,01 mg/l, pelo menos 0,005 mg/l, pelo menos 0,001 mg/l, pelo menos 0,0005 mg/l, pelo menos 0,0001 mg/l ou pelo menos 0,00005 mg/l de cobalto, respectivamente). Por exemplo, a concentração de EPA da biomassa crescida em um meio de cultura que não contém cobalto é pelo menos 10%, pelo menos 25%, pelo menos 50%, pelo menos 75%, pelo menos 100%, pelo menos 150%, pelo menos 200%, pelo menos 250%, pelo menos 300%, pelo menos 350%, pelo menos 400%, pelo menos 450%, pelo menos 500%, pelo menos 550%, pelo menos 600%, pelo menos 650% ou pelo menos 700% maior do que a concentração de EPA em uma biomassa obtida do microorganismo desenvolvido em um meio de cultura que compreende cobalto (por exemplo, pelo menos 0,0001 mg/l de cobalto).

[063] Em algumas modalidades, a concentração de EPA da biomassa crescida em um meio de cultura que compreende níveis menores de cobalto (por exemplo, em um meio de cultura que compreende menos do que 0,1 mg/l, menos do que 0,05 mg/l, menos do que 0,01 mg/l, menos do que 0,005 mg/l, menos do que 0,001 mg/l, menos do que 0,0005 mg/l, menos do que 0,0001 mg/l ou não possui cobalto) sob um nível de CO_2 ambiente é pelo menos 100%, pelo menos 200%, pelo menos 300%, pelo menos 400% ou pelo menos 500% maior do que a concentração de EPA em uma biomassa obtida do microorganismo desenvolvido em um meio de cultura que compreende níveis maiores de cobalto (por exemplo, em um meio de cultura que compreende pelo menos 0,1 mg/l, pelo menos 0,05 mg/l, pelo menos 0,01 mg/l, pelo menos 0,005 mg/l, pelo menos 0,001 mg/l, pelo menos 0,0005 mg/l, pelo menos 0,0001 mg/l ou pelo menos 0,00005 mg/l de cobalto,

respectivamente) sob um nível de CO_2 ambiente. Em algumas modalidades, a concentração de EPA da biomassa crescida em um meio de cultura que compreende níveis menores de cobalto sob um nível de CO_2 ambiente é 100% a 700%, 150% a 650%, 200% a 600%, 250% a 550% ou 300% a 500% maior do que a concentração de EPA em uma biomassa obtida do microorganismo desenvolvido em um meio de cultura que compreende níveis maiores de cobalto sob um nível de CO_2 ambiente. Em algumas modalidades, a concentração de EPA da biomassa crescida em um meio de cultura que compreende níveis menores de cobalto sob um nível elevado de CO_2 (por exemplo, um nível de CO_2 dissolvido de pelo menos 5%, pelo menos 10%, pelo menos 15% ou pelo menos 20%) é pelo menos 5%, pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90% ou pelo menos 100%) maior do que a concentração de EPA em uma biomassa obtida do microorganismo desenvolvido em um meio de cultura que compreende níveis maiores de cobalto sob um nível elevado de CO_2. Em algumas modalidades, a concentração de EPA da biomassa crescida em um meio de cultura que compreende níveis menores de cobalto sob um nível elevado de CO_2 (por exemplo, um nível de CO_2 dissolvido de pelo menos 5%, pelo menos 10%, pelo menos 15% ou pelo menos 20%) é 5% a 200%, 10% a 175%, 15% a 150%, 20% a 125% ou 25% a 100% maior do que a concentração de EPA em uma biomassa obtida do microorganismo desenvolvido em um meio de cultura que compreende níveis maiores de cobalto sob um nível elevado de CO_2. Por exemplo, a concentração de EPA da biomassa crescida em um meio de cultura que

compreende no cobalto sob um nível de CO_2 ambiente é pelo menos 100%, pelo menos 200%, pelo menos 300%, pelo menos 400% ou pelo menos 500% maior do que a concentração de EPA em uma biomassa obtida do microorganismo desenvolvido em um meio de cultura que compreende cobalto (por exemplo, pelo menos 0,0001 mg/l de cobalto) sob um nível de CO_2 ambiente. Como outro exemplo, a concentração de EPA da biomassa crescida em um meio de cultura que compreende no cobalto sob um nível de CO_2 dissolvido de pelo menos 10% é pelo menos 5%, pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 20%, pelo menos 25%, pelo menos 30%, pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80%, pelo menos 90% ou pelo menos 100% maior do que a concentração de EPA em uma biomassa obtida do microorganismo desenvolvido em um meio de cultura que compreende cobalto (por exemplo, pelo menos 0,0001 mg/l de cobalto) sob um nível de CO_2 dissolvido de pelo menos 10%.

[064] Em algumas modalidades, a concentração de EPA está aumentada por pelo menos 100%, pelo menos 200%, pelo menos 300%, pelo menos 400% ou pelo menos 500% na biomassa de um microorganismo desenvolvido em um meio de cultura que possui menos do que 0,1 mg/l de cobalto comparado com o mesmo microorganismo desenvolvido em um meio de cultura que possui mais do que 0,1 mg/l de cobalto. Em algumas modalidades, a concentração de EPA está aumentada por pelo menos 100%, pelo menos 200%, pelo menos 300%, pelo menos 400% ou pelo menos 500% na biomassa de um microorganismo desenvolvido em um meio de cultura que possui menos do que 0,01 mg/l de cobalto comparado com o mesmo microorganismo desenvolvido em um meio de cultura que possui mais do que

0,01 mg/l de cobalto. Em algumas modalidades, a concentração de EPA está aumentada por pelo menos 100%, pelo menos 200%, pelo menos 300%, pelo menos 400% ou pelo menos 500% na biomassa de um microorganismo desenvolvido em um meio de cultura que possui menos do que 0,001 mg/l de cobalto comparado com o mesmo microorganismo desenvolvido em um meio de cultura que possui mais do que 0,001 mg/l de cobalto. Em modalidades adicionais, a concentração de EPA está aumentada por pelo menos 100%, pelo menos 200%, pelo menos 300%, pelo menos 400% ou pelo menos 500% na biomassa de um microorganismo desenvolvido em um meio de cultura que possui menos do que 0,0001 mg/l de cobalto comparado com o mesmo microorganismo desenvolvido em um meio de cultura que possui mais do que 0,0001 mg/l de cobalto. Em algumas modalidades, a concentração de EPA está aumentada por pelo menos 100%, pelo menos 200%, pelo menos 300%, pelo menos 400% ou pelo menos 500% na biomassa de um microorganismo desenvolvido em um meio de cultura que possui no cobalto comparado com o mesmo microorganismo desenvolvido em um meio de cultura que contém uma quantidade de cobalto. A determinação do aumento na concentração de EPA na biomassa pode ser feita por crescimento de um microorganismo em um meio de cultura que possui quantidades maiores de cobalto, crescimento do mesmo microorganismo em um meio de cultura que possui quantidades menores de cobalto, e comparando-se a concentração de EPA na biomassa resultante de cada cultura. Nessa determinação, os teores do meio de cultura que possui quantidades menores ou maiores de cobalto são iguais, exceto quanto ao seu nível de cobalto.

[065] Em algumas modalidades, a concentração de EPA da

biomassa do microorganismo desenvolvido em um meio de cultura que compreende pelo menos 0,1 mg/l, pelo menos 0,05 mg/l, pelo menos 0,01 mg/l, pelo menos 0,005 mg/l, pelo menos 0,001 mg/l, pelo menos 0,0005 mg/l ou pelo menos 0,0001 mg/l de cobalto é pelo menos 1%, pelo menos 2%, pelo menos 3%, pelo menos 4% ou pelo menos 5% de EPA por peso dos ácidos graxos totais. Em algumas modalidades, a concentração de EPA da biomassa do microorganismo desenvolvido em um meio de cultura que compreende pelo menos 0,1 mg/l, pelo menos 0,05 mg/l, pelo menos 0,01 mg/l, pelo menos 0,005 mg/l, pelo menos 0,001 mg/l, pelo menos 0,0005 mg/l ou pelo menos 0,0001 mg/l de cobalto é 1% a 50%, 1% a 40%, 1% a 30%, 1% a 20%, 2% a 50%, 2% a 40%, 2% a 30% ou 2% a 20% de EPA por peso dos ácidos graxos totais.

[066] O meio de cultura que contém quantidades baixas de vitamina B12, extrato de levedura e/ou cobalto poderia ainda compreender um nível de CO_2 dissolvido de pelo menos 5%, pelo menos 10%, pelo menos 15% ou pelo menos 20%. A presente invenção é dirigida a uma biomassa isolada dos métodos aqui revelados, bem como a um óleo microbiano extraído da biomassa dos métodos.

[067] A presente invenção é dirigida a uma cultura isolada, que compreende qualquer um dos microorganismos da invenção ou misturas destes.

[068] A presente invenção é dirigida a um produto alimentício, composição cosmética ou farmacêutica para um animal não humano ou humano, que compreende qualquer um dos microorganismos ou biomassas da invenção ou misturas destes.

[069) A presente invenção é dirigida a um óleo

microbiano que compreende pelo menos cerca de 20% por peso de ácido eicosapentaenóico e menos do que cerca de 5% por peso de cada um de ácido araquidônico, ácido docosapentaenóico n-6, ácido oléico, ácido linoléico, ácido linolênico, ácido eicosenóico, ácido erúcico e ácido estearidônico. Em algumas modalidades, o óleo microbiano ainda compreende pelo menos cerca de 25% por peso de ácido docosahexaenóico.

[070] A presente invenção é dirigida a um óleo microbiano que compreende uma fração de triacilglicerol de pelo menos cerca de 10% por peso, em que pelo menos cerca de 12% por peso dos ácidos graxos na fração de triacilglicerol é ácido eicosapentaenóico, em que pelo menos cerca de 25% por peso dos ácidos graxos na fração de triacilglicerol é ácido docosahexaenóico, e em que menos do que cerca de 5% por peso dos ácidos graxos na fração de triacilglicerol é ácido araquidônico.

[071] A presente invenção é dirigida a um produto alimentício, composição cosmética ou farmacêutica para um animal não humano ou humano, que compreende qualquer um dos óleos microbianos da invenção. Em algumas modalidades, o produto alimentício é uma fórmula infantil. Em algumas modalidades, a fórmula infantil é adequada para bebês prematuros. Em algumas modalidades, o produto alimentício é um leite, uma bebida, uma bebida terapêutica, a bebidas nutricionais ou uma combinação destas. Em algumas modalidades, o produto alimentício é um aditivo para o alimento para animal não humano ou humano. Em algumas modalidades, o produto alimentício é um suplemento nutricional. Em algumas modalidades, o produto alimentício

é uma ração animal. Em algumas modalidades, a ração animal é uma ração para aqüicultura. Em algumas modalidades, a ração animal é uma ração para animal doméstico, uma ração para animal de zoológico, uma ração para animal de trabalho, uma ração para animal de criação, ou uma combinação destas.

[072] A presente invenção é dirigida a um método para produção de um óleo microbiano que compreende ácidos graxos ômega-3, o método compreendendo: crescimento de qualquer um dos microorganismos isolados da invenção ou misturas destes em uma cultura para produzir um óleo que compreende ácidos graxos ômega-3. Em algumas modalidades, o método ainda compreende a extração do óleo.

[073] A presente invenção é dirigida a um método para produção de um óleo microbiano que compreende ácidos graxos ômega-3, o método compreendendo a extração de um óleo que compreende ácidos graxos ômega-3 de qualquer uma das biomassas da invenção. Em algumas modalidades, o óleo microbiano é extraído usando um processo de extração de solvente orgânico, por exemplo, extração de hexano. Em algumas modalidades, o óleo microbiano é extraído usando um processo de extração sem solvente.

[074] A presente invenção é dirigida a um óleo microbiano produzido por um método da invenção.

(075] A presente invenção é dirigida a um método para produção de uma biomassa da invenção, que compreende: crescimento de qualquer um dos microorganismos isolados da invenção ou misturas destes em uma cultura para produzir uma biomassa.

[076] A presente invenção é dirigida a uma biomassa

produzida por um método da invenção.

[077] A presente invenção é dirigida a um método para produção de uma cepa mutante da invenção, que compreende: mutagênese de qualquer um dos microorganismos da invenção, e isolamento da cepa mutante.

[078] A presente invenção é dirigida ao uso de qualquer um dos microorganismos isolados, biomassas ou óleos microbianos da invenção, ou misturas destes, para a fabricação de um medicamento para o tratamento de inflamação ou uma condição a ela relacionada.

[079] A presente invenção é dirigida ao uso de qualquer um dos microorganismos isolados, biomassas ou óleos microbianos da invenção, ou misturas destes, para o tratamento de inflamação ou uma condição a ela relacionada.

[080] A presente invenção é dirigida a qualquer um dos microorganismos isolados, biomassas ou óleos microbianos da invenção, ou misturas destes, para uso no tratamento de inflamação ou uma condição a ela relacionada.

[081] A presente invenção é dirigida a um método para o tratamento de inflamação ou uma condição a ela relacionada em um indivíduo que dele necessita, que compreende a administração ao indivíduo de qualquer um dos microorganismos isolados, biomassas ou óleos microbianos da invenção, ou misturas destes, e um veículo farmaceuticamente aceitável.

[082] A presente invenção é dirigida aos métodos de produção de óleos microbianos, e biomassas, pelos microorganismos da invenção, e métodos de utilização dos microorganismos, biomassas e óleos microbianos.

Microorganismos

[083] Em algumas modalidades, uma célula microbiana para uso com a presente invenção é um microorganismo do filo Labyrinthulomycota. Em algumas modalidades, uma célula microbiana do filo Labyrinthulomycota é um traustoquitrídeo, por exemplo, um *Schizochytrium* ou *Thraustochytrium*. De acordo com a presente invenção, o termo "traustoquitrídeo" se refere a qualquer membro da ordem Thraustochytriales, que inclui a família Thraustochytriaceae, e o termo "labirintulídeo" se refere a qualquer membro da ordem Labyrinthulales, que inclui a família Labyrinthulaceae.

[084] Membros da família Labyrinthulaceae eram previamente considerados como sendo membros da ordem Thraustochytriales, mas em revisões mais recentes da classificação taxonômica desses organismos, a família Labyrinthulaceae é agora considerada como um membro da ordem Labyrinthulales. Tanto Labyrinthulales quanto Thraustochytriales são considerados como sendo membros do filo Labyrinthulomycota. Os teóricos taxonômicos geralmente colocam ambos esses grupos de microorganismos com as algas ou protistas do tipo algas da linhagem Stramenopile. A colocação taxonômica atual dos traustoquitrídeos e labirintulídeos pode ser resumida da seguinte forma:

Reino: Stramenopila (Chromista)

Filo: Labyrinthulomycota (Heterokonta)

Classe: Labyrinthulomycetes (Labyrinthulae)

Ordem: Labyrinthulales

Família: Labyrinthulaceae

Ordem: Thraustochytriales

Família: Thraustochytriaceae

[085] Para os objetivos da presente invenção, as cepas de células microbianas descritas como traustoquitrídeos incluem os seguintes organismos: Ordem: Thraustochytriales; Família: Thraustochytriaceae; Gêneros: *Thraustochylrium* (Espécies: sp., *arudimentale*, *aureum*, *benthicola*, *globosum*, *kinnei*, *motivum*, *multirudimentale*, *pachydermum*, *proliferum*, *roseum* e *striatum*), *Ulkenia* (Espécies: sp., *amoeboidea*, *kerguelensis*, *minuta*, *profunda*, *radiata*, *sailens*, *sarkariana*, *schizochytrops*, *visurgensis*, *yorkensis* e sp. BP-5601), *Schizochytrium* (Espécies: sp., *aggregatum*, *limnaceum*, *mangrovei*, *minutum* e *octosporum*), *Japonochytrium* (Espécie: sp., *marinum*), *Aplanochytrium* (Espécies: sp., *haliotidis*, *kerguelensis*, *profunda* e *stocchinoi*), *Althornia* (Espécie: sp., *crouchii*) ou *Elina* (Espécies: sp., *marisalba* e *sinorifica*). Para os objetivos dessa invenção, as espécies descrita dentro de *Ulkenia* serão consideradas como sendo membros do gênero *Thraustochytrium*. *Aurantiacochytrium* e *Oblogospora* são dois gêneros adicionais englobados pelo filo Labyrinthulomycota na presente invenção. Em algumas modalidades, uma célula microbiana é do gênero *Thraustochystrium*, *Schizochytrium*, e misturas destes.

[086] A invenção é dirigida aos microorganismos isolados e cepas deles derivadas. Uma cepa que é "derivada" de um microorganismo isolado da invenção pode ser um derivado natural ou artificial como, por exemplo, uma cepa mutante, variante ou recombinante. O termo "isolado", como aqui usado, não reflete necessariamente a extensão até a qual um isolado foi purificado, mas indica o isolamento ou separação de uma forma nativa ou do ambiente nativo. Um

isolado pode incluir, sem limitação, um microorganismo isolado, uma biomassa isolada, uma cultura isolada, um óleo microbiano isolado e uma seqüência isolada (por exemplo, uma seqüência isolada de polinucleotídeos aqui revelados). O termo "microorganismo", como aqui usado, inclui, sem limitação, os termos "microalgas", "traustoquitrídeo", e classificações taxonômicas associadas com qualquer um dos microorganismos depositados aqui descritos. Os termos "Thraustochytriales", "traustoquitrídeo", "*Schizochytrium*", e "*Thraustochytrium*", como usados em referência a qualquer um dos microorganismos da invenção, incluindo os microorganismos depositados aqui descritos, são baseados em classificações taxonômicas presentes que incluem informação filogenética disponível e não visam ser limitantes caso as classificações taxonômicas sejam revisadas após a data de depósito do presente pedido.

[087] Em algumas modalidades, a invenção é dirigida a um microorganismo isolado da espécie depositada sob o N° de Acesso na ATCC PTA-10212. O microorganismo isolado associado ao N° de Acesso na ATCC PTA-10212 também é aqui conhecido como *Thraustochytrium sp.* ATCC PTA-10212. O microorganismo isolado associado ao N° de Acesso na ATCC PTA-10212 foi depositado sob o Tratado de Budapeste em 14 de julho de 2009 na "American Type Culture Collection", Depositório de Patentes, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 201 10-2209. Em algumas modalidades, a invenção é dirigida a uma cepa isolada depositada sob o N° de Acesso na ATCC PTA-10212. Em algumas modalidades a invenção é dirigida a um microorganismo isolado depositado sob o N° de Acesso na ATCC PTA-10212, PTA-10213, PTA-10214,

PTA-10215, PTA-10208, PTA-10209, PTA-10210 ou PTA-10211.

[088] Em algumas modalidades, a invenção é dirigida a um microorganismo isolado que possui as características da espécie depositada sob o N° de Acesso na ATCC PTA-10212 ou uma cepa dele derivada. As características da espécie depositada sob o N° de Acesso na ATCC PTA-10212 podem incluir seu propriedades de crescimento e fenotípicas (exemplos de propriedades fenotípicas incluem propriedades morfológicas e reprodutivas), suas propriedades físicas e químicas (por exemplo, pesos secos e perfis lipídicos), suas seqüências gênicas, e combinações destas, em que as características distinguem as espécies entre espécies previamente identificadas. Em algumas modalidades, a invenção é dirigida a um microorganismo isolado que possui as características da espécie depositada sob o N° de Acesso na ATCC PTA-10212, em que as características incluem um 18s rRNA que compreende a seqüência de polinucleotídeos do ID. DE SEQ. N°: 1 ou uma seqüência de polinucleotídeos que possui pelo menos 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade para o ID. DE SEQ. N°: 1, as propriedades morfológicas e reprodutivas da espécie depositada sob o N° de Acesso na ATCC PTA-10212, e os perfis de ácido graxo da espécie depositada sob o N° de Acesso na ATCC PTA-10212. Em algumas modalidades, microorganismos isolados da invenção possuem propriedades fenotípicas substancialmente idênticas àquelas do microorganismo depositado sob o N° de Acesso na ATCC PTA-10212. Em algumas modalidades, microorganismos isolados da invenção possuem propriedades de crescimento substancialmente idênticas àquelas do microorganismo depositado sob o N° de Acesso na ATCC PTA-10212. Em algumas

modalidades, a invenção é dirigida a um microorganismo isolado que compreende um 18s rRNA que compreende a seqüência de polinucleotídeos do ID. DE SEQ. N°: 1 ou uma seqüência de polinucleotídeos que possui pelo menos 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade para o ID. DE SEQ. N°: 1. Em algumas modalidades, a invenção é dirigida a um microorganismo isolado que compreende seqüência de polinucleotídeos de um 18s rRNA que possui pelo menos 94% de identidade para a seqüência de polinucleotídeos de 18s rRNA do microorganismo depositado sob o N° de Acesso na ATCC PTA-10212.

[089] Em algumas modalidades, a invenção é dirigida a uma cepa mutante do microorganismo depositado sob o N° de Acesso na ATCC PTA-10212. Em modalidades adicionais, a cepa mutante é uma cepa depositada sob o N° de Acesso na ATCC PTA-10213, PTA-10214 ou PTA-10215. Os microorganismos associados aos N^{os} de Acesso na ATCC PTA-10213, PTA-10214 e PTA-10215 foram depositados sob o Tratado de Budapeste em 14 de julho de 2009 na "American Type Culture Collection", Depositório de Patentes, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 201 10-2209.

[090] Em algumas modalidades, a invenção é dirigida a um microorganismo isolado da espécie depositada sob o N° de Acesso na ATCC PTA-10208. O microorganismo isolado associado ao N° de Acesso na ATCC PTA-10208 também é aqui conhecido como *Schizochytrium sp.* ATCC PTA-10208. O microorganismo associado ao N° de Acesso na ATCC PTA-10208 foi depositado sob o Tratado de Budapeste em 14 de julho de 2009 na "American Type Culture Collection", Depositório de Patentes, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 201 10-

2209. Em algumas modalidades, a invenção é dirigida a uma cepa isolada depositada sob o N° de Acesso na ATCC PTA-10208.

[091] Em algumas modalidades, a invenção é dirigida a um microorganismo isolado da espécie depositada sob o N° de Acesso na ATCC PTA-10208, em que os ácidos graxos totais produzidos pelo microorganismo compreendem mais do que cerca de 10%, mais do que cerca de 11%, mais do que cerca de 12%, mais do que cerca de 13%, mais do que cerca de 14%, mais do que cerca de 15%, mais do que cerca de 16%, mais do que cerca de 17%, mais do que cerca de 18%, mais do que cerca de 19% ou mais do que cerca de 20% por peso de EPA. Em algumas modalidades, a invenção é dirigida a um microorganismo isolado da espécie depositada sob o N° de Acesso na ATCC PTA-10208, em que os ácidos graxos totais produzidos pelo microorganismo compreendem cerca de 10% até cerca de 55%, cerca de 10% até cerca de 50%, cerca de 10% até cerca de 45%, cerca de 10% até cerca de 40%, cerca de 10% até cerca de 35%, cerca de 10% até cerca de 30%, cerca de 15% até cerca de 55%, cerca de 15% até cerca de 50%, cerca de 15% até cerca de 45%, cerca de 15% até cerca de 40%, cerca de 15%) até cerca de 35%, cerca de 15% até cerca de 30%, cerca de 20% até cerca de 55%, cerca de 20% até cerca de 50%, cerca de 20% até cerca de 45%, cerca de 20% até cerca de 40%, cerca de 20% até cerca de 35% ou cerca de 20% até cerca de 30% por peso de EPA.

[092] Em algumas modalidades, a invenção é dirigida a um microorganismo isolado que possui as características da espécie depositada sob o N° de Acesso na ATCC PTA-10208, em que os ácidos graxos totais produzidos pelo microorganismo

compreendem mais do que cerca de 10% por peso de ácido eicosapentaenóico. As características do microorganismo depositado sob o N° de Acesso na ATCC PTA-10208 incluem suas propriedades de crescimento e fenotípicas (exemplos de propriedades fenotípicas incluem propriedades morfológicas e reprodutivas), suas propriedades físicas e químicas (por exemplo, pesos secos e perfis lipídicos), suas seqüências gênicas, e combinações destas, em que as características distinguem as espécies entre espécies previamente identificadas. Em algumas modalidades, a invenção é dirigida a um microorganismo isolado que possui as características da espécie depositada sob o N° de Acesso na ATCC PTA-10212, em que as características incluem um 18s rRNA que compreende a seqüência de polinucleotídeos do ID. DE SEQ. N°: 2, as propriedades morfológicas e reprodutivas da espécie depositada sob o N° de Acesso na ATCC PTA-10208, e os perfis de ácido graxo da espécie depositada sob o N° de Acesso na ATCC PTA-10208. Em algumas modalidades, microorganismos isolados da invenção possuem propriedades físicas e químicas substancialmente idênticas àquelas do microorganismo depositado sob o N° de Acesso na ATCC PTA-10208.

[093] Em algumas modalidades, a invenção é dirigida a uma cepa mutante do microorganismo depositado sob o N° de Acesso na ATCC PTA-10208. Em modalidades adicionais, a cepa mutante é uma cepa depositada sob o N° de Acesso na ATCC PTA-10209, PTA-10210 ou PTA-10211. Os microorganismos associados aos N^{os} de Acesso na ATCC PTA-10209, PTA-10210 e PTA-10211 foram depositados sob o Tratado de Budapeste em 25 de setembro de 2009 na "American Type Culture

Collection", Depositório de Patentes, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 201 10-2209.

[094] Em algumas modalidades, a invenção é dirigida a um microorganismo isolado da invenção que produz uma fração de triacilglicerol, em que o teor de EPA da fração de triacilglicerol é pelo menos cerca de 12%, pelo menos cerca de 13%, pelo menos cerca de 14%, pelo menos cerca de 15%, pelo menos cerca de 16%, pelo menos cerca de 17%, pelo menos cerca de 18%, pelo menos cerca de 19% ou pelo menos cerca de 20% por peso. Em algumas modalidades, a invenção é dirigida a um microorganismo isolado que produz uma fração de triacilglicerol, em que o teor de EPA da fração de triacilglicerol é cerca de 12% até cerca de 55%, cerca de 12 % até cerca de 50%, cerca de 12% até cerca de 45,%, cerca de 12% até cerca de 40%, cerca de 12% até cerca de 35%, cerca de 12% até cerca de 30%, cerca de 15% até cerca de 45%, cerca de 15% até cerca de 40%, cerca de 15% até cerca de 35%, cerca de 15% até cerca de 30% ou cerca de 20% até cerca de 30% por peso.

[095] Em algumas modalidades, a invenção é dirigida a um mutante, variante ou recombinante de um microorganismo isolado da invenção que produz uma fração de triacilglicerol, em que o teor de EPA da fração de triacilglicerol é pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 11%, pelo menos cerca de 12%, pelo menos cerca de 13%, pelo menos cerca de 14%, pelo menos cerca de 15%, pelo menos cerca de 16%, pelo menos cerca de 17%, pelo menos cerca de 18%, pelo menos cerca de 19% ou pelo menos cerca de 20% por peso. Em algumas modalidades, a invenção é dirigida a um mutante, variante ou recombinante de um

microorganismo isolado da invenção que produz uma fração de triacilglicerol, em que o teor de EPA da fração de triacilglicerol é cerca de 12% até cerca de 55%, cerca de 12% até cerca de 50%, cerca de 12% até cerca de 45%, cerca de 12% até cerca de 40%, cerca de 12% até cerca de 35%, cerca de 12% até cerca de 30%, cerca de 15% até cerca de 55%, cerca de 15% até cerca de 50%, cerca de 15% até cerca de 45%, cerca de 15% até cerca de 40%, cerca de 15% até cerca de 35%, cerca de 15% até cerca de 30%, cerca de 20% até cerca de 55%, cerca de 20% até cerca de 50%, cerca de 20% até cerca de 45%, cerca de 20% até cerca de 40%, cerca de 20% até cerca de 35% ou cerca de 20% até cerca de 30% por peso. Cepas mutantes podem ser produzidas por procedimentos bem conhecidos. Procedimentos comuns incluem irradiação, tratamento em temperaturas elevadas, e tratamento com um mutágeno. Cepas variantes podem ser outros isolados de ocorrência natural e/ou subisolados das espécies aqui descritas. Cepas recombinantes podem ser produzidas por quaisquer métodos bem conhecidos em biologia molecular para a expressão de genes exógenos ou alteração da função ou expressão do gene endógeno. Em algumas modalidades, a cepa mutante, variante ou recombinante produz uma quantidade maior de ácidos graxos ômega-3, particularmente EPA, do que a cepa do tipo selvagem. Em algumas modalidades, a cepa mutante, variante ou recombinante produz uma quantidade menor de um ou mais ácidos graxos, por exemplo, quantidades menores de DHA, ARA, DPA n-6, ou combinações destes. Em algumas modalidades, a cepa mutante, variante ou recombinante produz uma massa maior de células secas por litro de

cultura do que a cepa do tipo selvagem. Essas cepas mutantes, variantes ou recombinantes são exemplos de cepas derivadas de um microorganismo isolado da invenção.

[096] A presente invenção também é dirigida a um microorganismo traustoquitrídeo isolado que possui as características da espécie traustoquitrídeo depositada sob o N° de Acesso na ATCC PTA-9695, em que os ácidos graxos totais produzidos pelo referido microorganismo ou cepa dele derivada compreendem cerca de 10% ou menos por peso de ácido eicosapentaenóico.

[097] A presente invenção também é dirigida a um microorganismo traustoquitrídeo isolado, ou uma cepa dele derivada, que compreende uma fração de triglicerídeo, em que o teor de ácido docosahexaenóico da fração de triglicerídeo é pelo menos cerca de 40% por peso, em que o teor de ácido docosapentaenóico n-6 da fração de triglicerídeo é de pelo menos cerca de 0,5% por peso até cerca de 6% por peso, e em que os ácidos graxos totais produzidos pelo referido microorganismo ou cepa dele derivada compreendem cerca de 10% ou menos por peso de ácido eicosapentaenóico.

[098) A presente invenção também é dirigida a um microorganismo traustoquitrídeo isolado da mesma espécie que o traustoquitrídeo depositado sob o N° de Acesso na ATCC PTA-9695 ou uma cepa dele derivada, em que os ácidos graxos totais produzidos pelo referido microorganismo ou cepa dele derivada compreendem cerca de 10% ou menos por peso de ácido eicosapentaenóico.

[099] Em algumas modalidades, a cepa derivada do microorganismo traustoquitrídeo isolado da invenção é uma

cepa mutante.

[100] A presente invenção também é dirigida a um microorganismo isolado depositado sob o N° de Acesso na ATCC PTA-9695, PTA-9696, PTA-9697 ou PTA-9698.

[101] A presente invenção também é dirigida a uma biomassa de traustoquitrídeo que compreende qualquer um dos microorganismos traustoquitrídeo da invenção ou misturas destes.

[102] A presente invenção também é dirigida a uma biomassa de traustoquitrídeo isolado, em que pelo menos cerca de 50% por peso da massa de células secas da biomassa são ácidos graxos, e em que pelo menos cerca de 50% por peso dos ácidos graxos são ácidos graxos ômega-3. Em algumas modalidades, pelo menos cerca de 50% por peso dos ácidos graxos é ácido docosahexaenóico. A presente invenção também é dirigida a uma biomassa de traustoquitrídeo isolado, em que pelo menos cerca de 25% por peso da massa de células secas da biomassa é ácido docosahexaenóico.

[103] Em algumas modalidades, a presente invenção também é dirigida a uma biomassa de traustoquitrídeo isolado em que cerca de 10% ou menos por peso dos ácidos graxos é ácido eicosapentaenóico, e em que a proporção de peso de ácido docosahexaenóico para ácido eicosapentaenóico é pelo menos cerca de 5:1.

[104] Em algumas modalidades, a presente invenção também é dirigida a uma biomassa de traustoquitrídeo isolado em que cerca de 1,5% ou menos por peso dos ácidos graxos é ácido araquidônico, e em que a proporção de peso de ácido docosahexaenóico para ácido araquidônico é pelo menos cerca de 20:1.

[105] Em algumas modalidades, a presente invenção também é dirigida a uma biomassa de traustoquitrídeo isolado que compreende ácido docosahexaenóico e ácido docosapentaenóico n-6 em uma proporção de peso de pelo menos cerca de 10:1. Em algumas modalidades, a invenção é dirigida a um traustoquitrídeo da espécie depositada sob o N° de Acesso na ATCC PTA-9695. O traustoquitrídeo isolado também é aqui conhecido como *Schizochytrium sp.* ATCC PTA-9695. O traustoquitrídeo associado ao N° de Acesso na ATCC PTA-9695 foi depositado sob o Tratado de Budapeste em 7 de janeiro de 2009 na "American Type Culture Collection", Depositório de Patentes, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 201 10-2209.

[106] Em algumas modalidades, a invenção é dirigida a uma cepa de traustoquitrídeo isolada depositada sob o N° de Acesso na ATCC PTA-9695. Em algumas modalidades, a invenção é dirigida a um microorganismo traustoquitrídeo isolado da mesma espécie que o traustoquitrídeo depositado sob o N° de Acesso na ATCC PTA-9695.

[107] Em algumas modalidades, a invenção é dirigida a um traustoquitrídeo isolado que possui as características da espécie depositada sob o N° de Acesso na ATCC PTA-9695 ou uma cepa dele derivada. As características da espécie traustoquitrídeo depositada sob o N° de Acesso na ATCC PTA-9695 incluem suas propriedades de crescimento e fenotípicas (exemplos de propriedades fenotípicas incluem propriedades morfológicas e reprodutivas), suas propriedades físicas e químicas (por exemplo, pesos secos e perfis lipídicos), e suas seqüências gênicas. Em algumas modalidades, os traustoquitrídeos isolados da invenção possuem propriedades

fenotípicas substancialmente idênticas do traustoquitrídeo depositado sob o N° de Acesso na ATCC PTA-9695. Em algumas modalidades, os traustoquitrídeos isolados da invenção possuem propriedades de crescimento substancialmente idênticas do traustoquitrídeo depositado sob o N° de Acesso na ATCC PTA-9695.

[108] Em algumas modalidades, a invenção é dirigida a um mutante, variante ou recombinante de um traustoquitrídeo isolado da invenção, em que os ácidos graxos totais produzidos pelo mutante, variante, ou recombinante compreendem cerca de 10% ou menos por peso de ácido eicosapentaenóico. Cepas mutantes podem ser produzidas por procedimentos bem conhecidos. Procedimentos comuns incluem irradiação; tratamento em temperaturas elevadas; e tratamento com um mutágeno. Cepas variantes podem ser outros isolados de ocorrência natural e/ou subisolados das espécies aqui descritas. Cepas recombinantes podem ser produzidas por quaisquer métodos bem conhecidos em biologia molecular para a expressão de genes exógenos ou a alteração da função ou expressão do gene endógeno. Em algumas modalidades, a cepa mutante, variante ou recombinante produz uma quantidade maior de ácidos graxos ômega-3, incluindo DHA e/ou EPA, do que a cepa do tipo selvagem. Em algumas modalidades, a cepa mutante, variante ou recombinante produz uma quantidade menor de um ou mais ácidos graxos, por exemplo, quantidades menores de EPA, ARA, DPA n-6, ou combinações destes. Em algumas modalidades, a cepa mutante, variante ou recombinante produz uma massa maior de células secas por litro de cultura do que a cepa do tipo selvagem. Essas cepas

mutantes, variantes ou recombinantes são exemplos de cepas derivadas de um traustoquitrídeo isolado da invenção.

[109] Em algumas modalidades, a invenção é dirigida a uma cepa mutante do traustoquitrídeo depositado sob o N° de Acesso na ATCC PTA-9695. Em modalidades adicionais, a cepa mutante é uma cepa depositada sob os N^{OS} de Acesso na ATCC PTA-9696, PTA-9697 ou PTA-9698. As cepas de traustoquitrídeo associadas aos N^{OS} de Acesso na ATCC PTA-9696, PTA-9697 e PTA-9698 foram depositados sob o Tratado de Budapeste em 7 de janeiro de 2009 na "American Type Culture Collection", Depositório de Patentes, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 201 10-2209. Essas cepas mutantes depositadas são derivadas do traustoquitrídeo depositado sob o N° de Acesso na ATCC PTA-9695.

[110] Em algumas modalidades, um traustoquitrídeo isolado da invenção, incluindo mutantes, variantes ou recombinantes deste, compreende um perfil de ácido graxo em uma ou mais frações isoladas do traustoquitrídeo. As (uma ou mais) frações isoladas do traustoquitrídeo inclui a fração de ácido graxo total, a fração de ésteres de esterol, a fração de triglicerídeo, a fração de ácido graxo livre, a fração de esterol, a fração de diglicerídeo, a fração polar (incluindo a fração de fosfolipídeo), e combinações destas.

[111] A presente invenção também é dirigida a uma cultura de traustoquitrídeo isolado que compreende qualquer um dos microorganismos traustoquitrídeo da invenção ou misturas destes. Em algumas modalidades, a cultura compreende pelo menos cerca de 5% de oxigênio dissolvido.

[112] A presente invenção também é dirigida a um

produto alimentício, composição cosmética ou farmacêutica para animais ou humanos que compreende qualquer um dos microorganismos traustoquitrídeo ou biomassas da invenção ou misturas destes.

[113] A presente invenção também é dirigida a um óleo microbiano que compreende uma fração de triglicerídeo de pelo menos cerca de 70% por peso, em que o teor de ácido docosahexaenóico da fração de triglicerídeo é pelo menos cerca de 50% por peso, e em que o teor de ácido docosapentaenóico n-6 da fração de triglicerídeo é de cerca de 0,5% por peso até cerca de 6% por peso. Em algumas modalidades, o óleo microbiano ainda compreende um teor de ácido araquidônico da fração de triglicerídeo de cerca de 1,5% ou menos por peso.

[114] A presente invenção também é dirigida a um óleo microbiano que compreende uma fração de triglicerídeo de pelo menos cerca de 70% por peso, em que o teor de ácido docosahexaenóico da fração de triglicerídeo é pelo menos cerca de 40% por peso, em que o teor de ácido docosapentaenóico n-6 da fração de triglicerídeo é de pelo menos cerca de 0,5% por peso até cerca de 6% por peso, e em que a proporção de ácido docosahexaenóico para ácido docosapentaenóico n-6 é mais do que cerca de 6:1.

[115] A presente invenção também é dirigida a um óleo microbiano que compreende uma fração de triglicerídeo de pelo menos cerca de 70% por peso, em que o teor de ácido docosahexaenóico da fração de triglicerídeo é pelo menos cerca de 60% por peso.

[116] Em algumas modalidades, pelo menos cerca de 20% dos triglicerídeos na fração de triglicerídeo do óleo

microbiano contêm ácido docosahexaenóico em duas posições no triglicerídeo selecionadas de quaisquer duas das posições *sn*-1, *sn*-2 e *sn*-3. Em algumas modalidades, pelo menos cerca de 5% dos triglicerídeos na fração de triglicerídeo do óleo microbiano contêm ácido docosahexaenóico em todas as três das posições *sn*-1, *sn*-2 e *sn*-3 no triglicerídeo.

[117] Em algumas modalidades, um microorganismo isolado da invenção, incluindo mutantes, variantes e recombinantes deste, compreende um perfil de ácido graxo em uma ou mais frações isoladas do microorganismo. As (uma ou mais) frações isoladas do microorganismo incluem a fração de ácido graxo total, a fração de ésteres de esterol, a fração de triacilglicerol, a fração de ácido graxo livre, a fração de esterol, a fração de diacilglicerol, a fração polar (incluindo a fração de fosfolipídeo), e combinações destas. O perfil de ácido graxo para uma fração específica pode incluir qualquer um dos perfis de ácido graxo associados à fração específica, como aqui revelado.

[118] A invenção é dirigida a um método de produção de um mutante que compreende a mutagênese de qualquer um dos microorganismos da invenção e o isolamento da cepa mutante.

Culturas e biomassas isoladas

[119] A invenção é dirigida a uma cultura que compreende um ou mais microorganismos isolados da invenção. Vários parâmetros de fermentação para inoculação, crescimento e recuperação de microflora, por exemplo, microalgas e traustoquitrídeos, são conhecidos na técnica. Veja, por exemplo, a Patente U.S. N° 5.130.242, aqui incorporada por referência em sua totalidade. Meios

líquidos ou sólidos podem conter água do mar natural ou artificial. Fontes de carbono para crescimento heterotrófico incluem, sem limitação, glicose, frutose, xilose, sacarose, maltose, amido solúvel, melaço, fucose, glucosamina, dextrana, gorduras, óleos, glicerol, acetato de sódio e manitol. Fontes de nitrogênio incluem, sem limitação, peptona, extrato de levedura, polipeptona, extrato de malte, extrato de carne, ácido casamino, licor de maceração de milho, fontes de nitrogênio orgânico, glutamato de sódio, uréia, fontes de nitrogênio inorgânico, acetato de amônio, sulfato de amônio, cloreto de amônio e nitrato de amônio.

[120] Um meio típico para crescimento do microorganismo depositado sob o N° de Acesso na ATCC PTA-10212 é mostrado na Tabela 1:

Tabela 1: Meio do vaso de PTA-10212.

Ingrediente	**Concentração**		**Faixas**
Na_2SO_4	g/l	31,0	0-50, 15-45 ou 25-35
NaCl	g/l	0,625	0-25, 0,1-10 ou 0,5-5
KCl	g/l	1,0	0-5, 0,25-3 ou 0,5-2
$MgSO_4.7H_2O$	g/l	5,0	0-10, 2-8, ou 3-6
$(NH_4)_2SO_4$	g/l	0,44	0-10, 0,25-5 ou 0,05-3
$MSG.1H_2O$	g/l	6,0	0-10, 4-8, ou 5-7
$CaCl_2$	g/l	0,29	0,1-5, 0,15-3 ou 0,2-1
T 154 (extrato de levedura)	g/l	6,0	0-20, 0,1-10, ou 1-7
KH_2PO_4	g/l	0,8	0,1-10, 0,5-5 ou 0,6-1,8
Pós-autoclave (metais)			
Ácido cítrico	mg/l	3,5	0,1-5000, 10-3000 ou 3-2500

$FeSO_4.7H_2O$	mg/l	10,30	0,1-100, 1-50 ou 5-25
$MnCl_2.4H_2O$	mg/l	3,10	0,1-100, 1-50 ou 2-25
$ZnSO_4.7H_2O$	mg/l	3,10	0,01-100, 1-50 ou 2-25
$CoCl_2.6H_2O$	mg/l	0,04	0-1, 0,001-0,1 ou 0,01-0,1
$Na_2MoO_4.2H_2O$	mg/l	0,04	0,001-1, 0,005-0,5 ou 0,01-0,1
$CuSO_4.5H_2O$	mg/l	2,07	0,1-100, 0,5-50 ou 1-25
$NiSO_4.6H_2O$	mg/l	2,07	0,1-100, 0,5-50 ou 1-25
Pós-autoclave (vitaminas)			
Tiamina	mg/l	9,75	0,1-100, 1-50 ou 5-25
Vitamina B12	mg/l	0,16	0,01-100, 0,05-5 ou 0,1-1
Ca½-pantotenato	mg/l	2,06	0,1-100, 0,1-50 ou 1-10
Biotina	mg/l	3,21	0,1-100, 0,1-50 ou 1-10
Pós-autoclave (carbono)			
Glicerol	g/l	30,0	5-150, 10-100 ou 20-50
Alimentação de nitrogênio:			
Ingrediente	**Concentração**		
$MSG.1H_2O$	g/l	17	0-150, 10-100 ou 15-50

Condições de cultivo típicas incluiriam o seguinte:

pH cerca de 6,5 - cerca de 9,5, cerca de 6,5 - cerca de 8,0 ou cerca de 6,8 - cerca de 7,8;

Temperatura: cerca de 15 - cerca de 30 graus Celsius, cerca de 18 - cerca de 28 graus Celsius ou cerca de 21 até cerca de 23 graus Celsius;

Oxigênio dissolvido: cerca de 0,1 - cerca de 100% de saturação, cerca de 5 - cerca de 50% de saturação, ou cerca de 10 - cerca de 30% de saturação; e/ou

Glicerol controlado @: cerca de 5 - cerca de 50 g/l, cerca de 10 - cerca de 40 g/l ou cerca de 15 - cerca de 35

g/l.

[121] Em algumas modalidades, o microorganismo depositado sob o N° de Acesso na ATCC PTA-10212, ou um mutante, variante, ou recombinante deste, cresce heterotroficamente em glicerol como a fonte de carbono, mas não cresce em glicose como a fonte de carbono.

[122] Um meio típico para crescimento do microorganismo depositado sob o N° de Acesso na ATCC PTA-10208 é mostrado na Tabela 2:

Tabela 2: Meio do vaso de PTA-10208.

Ingrediente	**Concentração**		**Faixas**
Na_2SO_4	g/l	8,8	0-25, 2-20 ou 3-10
NaCl	g/l	0,625	0-25, 0,1-10 ou 0,5-5
KCl	g/l	1,0	0-5, 0,25-3 ou 0,5-2
$MgSO_4.7H_2O$	g/l	5,0	0-10, 2-8, ou 3-6
$(NH_4)_2SO_4$	g/l	0,42	0-10, 0,25-5 ou 0,05-3
$CaCl_2$	g/l	0,29	0,1 -5, 0,15-3 ou 0,2- 1
T 154 (extrato de levedura)	g/l	1,0	0-20, 0,1-10 ou 0,5-5
KH_2PO_4	g/l	1,765	0,1 -10, 0,5-5 ou 1-3
Pós-autoclave (metais)			
Ácido cítrico	mg/l	46,82	0,1-5000, 10-3000 ou 40-2500
$FeSO_4.7H_2O$	mg/l	10,30	0,1 -100, 1-50 ou 5-25
$MnCl_2.4H_2O$	mg/l	3,10	0,1 -100, 1-50 ou 2-25
$ZnSO_4.7H_2O$	mg/l	9,3	0,01 -100, 1 -50 ou 2-25
$CoCl_2$-$6H_2O$	mg/l	0,04	0-1, 0,001 -0,1 ou 0,01-0,1
Na_2MoO_4-$2H_2O$	mg/l	0,04	0,001- 1, 0,005-0,5 ou 0,01-0,1

$CuSO_4$-$5H_2O$	mg/l	2,07	0,1-100, 0,5-50 ou 1-25
$NiSO_4$-$6H_2O$	mg/l	2,07	0,1-100, 0,5-50 ou 1-25
Pós-autoclave (vitaminas)			
Tiamina	mg/l	9,75	0,1-100, 1-50 ou 5-25
Ca½-pantotenato	mg/l	3,33	0,1 -100, 0,1 -50 ou 1 -10
Biotina	mg/l	3,58	0,1-100, 0,1 -50 ou 1 – 10
Pós-autoclave (carbono)			
Glicose	g/l	30,0	5-150, 10-100 ou 20-50
Alimentação de nitrogênio:			
Ingrediente	**Concentração**		
NH_4OH	ml/l	23,6	0-150, 10-100 ou 15-50

Condições de cultivo típicas incluiriam o seguinte:

pH cerca de 6,5 - cerca de 8,5, cerca de 6,5 - cerca de 8,0 ou cerca de 7,0 - cerca de 8,0;

Temperatura: cerca de 17 - cerca de 30 graus Celsius, cerca de 20 – cerca de 28 graus Celsius ou cerca de 22 até cerca de 24 graus Celsius;

Oxigênio dissolvido: cerca de 2 - cerca de 100% de saturação, cerca de 5 - cerca de 50% de saturação, ou cerca de 7 - cerca de 20% de saturação; e/ou

Glicose controlada @: cerca de 5 - cerca de 50 g/l, cerca de 10 - cerca de 40 g/l ou cerca de 20 - cerca de 35 g/l.

[123] Em algumas modalidades, o volume de fermentação (volume de cultura) é de pelo menos cerca de 2 litros, pelo menos cerca de 10 litros, pelo menos cerca de 50 litros, pelo menos cerca de 100 litros, pelo menos cerca de 200 litros, pelo menos cerca de 500 litros, pelo menos cerca de 1.000 litros, pelo menos cerca de 10.000 litros, pelo menos cerca de 20.000 litros, pelo menos cerca de 50.000 litros,

pelo menos cerca de 100.000 litros, pelo menos cerca de 150.000 litros, pelo menos cerca de 200.000 litros, ou pelo menos cerca de 250.000 litros. Em algumas modalidades, o volume de fermentação é de cerca de 2 litros até cerca de 300.000 litros, cerca de 2 litros, cerca de 10 litros, cerca de 50 litros, cerca de 100 litros, cerca de 200 litros, cerca de 500 litros, cerca de 1.000 litros, cerca de 10.000 litros, cerca de 20.000 litros, cerca de 50.000 litros, cerca de 100.000 litros, cerca de 150.000 litros, cerca de 200.000 litros, cerca de 250.000 litros ou cerca de 300.000 litros.

[124] Em algumas modalidades, a invenção é dirigida a uma biomassa isolada que compreende um perfil de ácido graxo da invenção. Em algumas modalidades, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 25%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 35%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 45%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 55%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 65%, pelo menos cerca de 70%), pelo menos cerca de 75% ou pelo menos cerca de 80% da massa de células secas da biomassa são ácidos graxos. Em algumas modalidades, mais do que cerca de 20%, mais do que cerca de 25%, mais do que cerca de 30%, mais do que cerca de 35%, mais do que cerca de 40%, mais do que cerca de 45%), mais do que cerca de 50%, mais do que cerca de 55% ou mais do que cerca de 60% da massa de células secas da biomassa são ácidos graxos. Em algumas modalidades, cerca de 20% até cerca de 55%, cerca de 20% até cerca de 60%, cerca de 20% até cerca de 70%, cerca de 20% até cerca de 80%, cerca de 30% até cerca de 55%, cerca de 30% até cerca de 70%, cerca de 30% até cerca

de 80%, cerca de 40% até cerca de 60%, cerca de 40% até cerca de 70%, cerca de 40% até cerca de 80%, cerca de 50% até cerca de 60%, cerca de 50% até cerca de 70%, cerca de 50% até cerca de 80%, cerca de 55% até cerca de 70%, cerca de 55% até cerca de 80%, cerca de 60% até cerca de 70% ou cerca de 60% até cerca de 80% por peso da massa de células secas da biomassa são ácidos graxos. Em algumas modalidades, a biomassa compreende mais do que cerca de 10%, pelo menos cerca de 12%, pelo menos cerca de 15%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 25%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 35%, pelo menos cerca de 40% ou pelo menos cerca de 45% por peso dos ácidos graxos como EPA. Em algumas modalidades, a biomassa compreende cerca de 10% até cerca de 55%, cerca de 12% até cerca de 55%, cerca de 15% até cerca de 55%, cerca de 20% até cerca de 55%, cerca de 20% até cerca de 40% ou cerca de 20% até cerca de 30% por peso dos ácidos graxos como EPA. Em algumas modalidades, a biomassa compreende uma fração de triacilglicerol, em que pelo menos cerca de 12%, pelo menos cerca de 13%, pelo menos cerca de 14%, pelo menos cerca de 15%, pelo menos cerca de 16%, pelo menos cerca de 17%, pelo menos cerca de 18%, pelo menos cerca de 19% ou pelo menos cerca de 20% por peso da fração de triacilglicerol é EPA. Em algumas modalidades, a biomassa compreende uma fração de triacilglicerol, em que o teor de EPA da fração de triacilglicerol é de pelo menos cerca de 12% até cerca de 55%, cerca de 12% até cerca de 50%, cerca de 12% até cerca de 45%, pelo menos cerca de 12% até cerca de 40%, pelo menos cerca de 12% até cerca de 35% ou pelo menos cerca de 12% até cerca de 30%, cerca de 15% até cerca de 55%, cerca

de 15% até cerca de 50%, cerca de 15% até cerca de 45%, cerca de 15% até cerca de 40%, cerca de 15% até cerca de 35%, cerca de 15% até cerca de 30%, cerca de 20% até cerca de 55%, cerca de 20% até cerca de 50%, cerca de 20% até cerca de 45%, pelo menos cerca de 20% até cerca de 40%, pelo menos cerca de 20% até cerca de 35% ou cerca de 20% até cerca de 30% por peso. Em algumas modalidades, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 25%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 35%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50% ou pelo menos cerca de 60% por peso da massa de células secas da biomassa é DHA. Em algumas modalidades, cerca de 20% até cerca de 60%, cerca de 25% até cerca de 60%, cerca de 25%) até cerca de 50%, cerca de 25% até cerca de 45%, cerca de 30% até cerca de 50% ou cerca de 35% até cerca de 50% por peso da massa de células secas da biomassa é DHA. Em algumas modalidades, a biomassa compreende cerca de 10% ou menos, cerca de 9% ou menos, cerca de 8% ou menos, cerca de 7% ou menos, cerca de 6% ou menos, cerca de 5% ou menos, cerca de 4% ou menos, cerca de 3% ou menos, cerca de 2% ou menos, ou cerca de 1% ou menos por peso dos ácidos graxos como DHA. Em algumas modalidades, a biomassa compreende cerca de 1% até cerca de 10%, cerca de 1% até cerca de 5%, cerca de 2% até cerca de 5%, cerca de 3% até cerca de 5% ou cerca de 3% até cerca de 10% por peso dos ácidos graxos como DHA. Em algumas modalidades, a biomassa é substancialmente livre de DHA. Em algumas modalidades, a biomassa compreende cerca de 0,1% a menos do que cerca de 5%, cerca de 0,1% até cerca de 4%, cerca de 0,1% até cerca de 3%, cerca de 0,1% até cerca de 2%, cerca de 0,2% a menos do que cerca de 5%, cerca de 0,2%

até cerca de 4%, cerca de 0,2% até cerca de 3%, cerca de 0,2% até cerca de 2%, cerca de 0,3% até cerca de 2%, cerca de 0,1% até cerca de 0,5%, cerca de 0,2% até cerca de 0,5%, cerca de 0,1%) até cerca de 0,4%, cerca de 0,2% até cerca de 0,4%, cerca de 0,5% até cerca de 2%, cerca de 1% até cerca de 2%, cerca de 0,5% até cerca de 1,5% ou cerca de 1% até cerca de 1,5% por peso dos ácidos graxos como ARA. Em algumas modalidades, a biomassa compreende menos do que cerca de 5%, cerca de 4% ou menos, cerca de 3% ou menos, cerca de 2% ou menos, cerca de 1,5% ou menos, cerca de 1% ou menos, cerca de 0,5% ou menos, cerca de 0,4% ou menos, cerca de 0,3% ou menos, cerca de 0,2% ou menos, ou cerca de 0,1% ou menos por peso dos ácidos graxos como ARA. Em algumas modalidades, a biomassa é substancialmente livre de ARA. Em algumas modalidades, a biomassa compreende cerca de 0,4% até cerca de 2%, cerca de 0,4% até cerca de 3%, cerca de 0,4% até cerca de 4%, cerca de 0,4% até cerca de 5%, cerca de 0,4% a menos do que cerca de 5%, cerca de 0,5% até cerca de 1%, cerca de 0,5% até cerca de 2%, cerca de 0,5% até cerca de 3%, cerca de 0,5% até cerca de 4%, cerca de 0,5% até cerca de 5%, cerca de 0,5% a menos do que cerca de 5%, cerca de 1% até cerca de 2%, cerca de 1% até cerca de 3%, cerca de 1% até cerca de 4%, cerca de 1% até cerca de 5% ou cerca de 1% a menos do que cerca de 5% por peso dos ácidos graxos como DPA n-6. Em algumas modalidades, a biomassa compreende cerca de 5% ou menos, menos do que cerca de 5%, cerca de 4% ou menos, cerca de 3% ou menos, cerca de 2% ou menos, cerca de 1% ou menos, cerca de 0,75% ou menos, cerca de 0,6% ou menos, ou cerca de 0,5% ou menos por peso dos ácidos graxos como DPA n-6. Em algumas

modalidades, a biomassa é substancialmente livre de DPA n-6. Em algumas modalidades, a biomassa compreende ácidos graxos com cerca de 5% ou menos, menos do que cerca de 5%, cerca de 4% ou menos, cerca de 3% ou menos, ou cerca de 2% ou menos por peso de ácido oléico (18:1 n-9), ácido linoléico (18:2 n-6), ácido linolênico (18:3 n-3), ácido eicosenóico (20:1 n-9), ácido erúcico (22:1 n-9), ou combinações destes.

[125] As características de uma biomassa isolada da invenção estão associadas às propriedades endógenas ou nativas da biomassa isolada, e não com materiais introduzidas de forma exógena. Em algumas modalidades, a biomassa isolada não contém polivinilpirrolidona ou não é isolada de uma cultura que contém polivinilpirrolidona.

[126] A presente invenção é dirigida a um método de produção de uma biomassa. Em algumas modalidades, o método para produção de uma biomassa da invenção compreende o crescimento de qualquer um dos microorganismos isolados da invenção ou misturas destes em uma cultura para produzir uma biomassa. A presente invenção é dirigida a uma biomassa produzida pelo método.

[127] Em algumas modalidades, a biomassa compreende ácidos graxos, em que os ácidos graxos ainda compreendem ácidos graxos ômega-3 poliinsaturados, em que os ácidos graxos ômega-3 poliinsaturados compreendem DHA e EPA em uma quantidade de cerca de ≥90%, por peso, da quantidade total de ácidos graxos ômega-3 poliinsaturados e a quantidade de EPA, por peso, é de cerca de 6% até cerca de 65% da quantidade total de EPA e DHA. É particularmente fornecida uma biomassa em que a quantidade de EPA, por peso, é de

cerca de 6% até cerca de 28% da quantidade total de EPA e DHA. É ainda aqui fornecida uma biomassa em que a quantidade de EPA, por peso, é de cerca de 36% até cerca de 65 da quantidade total do EPA e DHA. Mais particularmente, é fornecida uma biomassa em que a quantidade de EPA, por peso, é de cerca de 28% até cerca de 36% da quantidade total de EPA e DHA.

[128] Algumas modalidades aqui fornecidas compreendem uma biomassa que compreende ácidos graxos, em que os ácidos graxos ainda compreendem DHA e EPA e a quantidade de EPA, por peso, é de cerca de 15 até cerca de 60% do peso total de EPA e DHA.

[129] Algumas modalidades da invenção são ainda dirigidas a uma cultura que compreende um traustoquitrídeo, ou uma cepa mutante, depositado sob o N° de Acesso na ATCC PTA-9695. Vários parâmetros de fermentação para inoculação, crescimento e recuperação de microflora são conhecidos na técnica como, por exemplo, descritos na Patente U.S. N° 5.130.242. Qualquer meio convencional para o crescimento de traustoquitrídeos pode ser usado. Meios líquidos ou sólidos podem conter água do mar natural ou artificial. Fontes de carbono incluem, sem limitação, glicose, frutose, xilose, sacarose, maltose, amido solúvel, melaço, fucose, glucosamina, dextrana, gorduras, óleos, glicerol, acetato de sódio e manitol. Fontes de nitrogênio incluem, sem limitação, peptona, extrato de levedura, polipeptona, extrato de malte, extrato de carne, ácido casamino, licor de maceração de milho, fontes de nitrogênio orgânico, glutamato de sódio, uréia, fontes de nitrogênio inorgânico, acetato de amônio, sulfato de amônio, cloreto de amônio,

amônio nitrato, sulfato de sódio. Um meio típico é mostrado na Tabela 3.

Tabela 3: Meio do vaso de Meio do vaso de PTA-9695.

Ingrediente	**Concentração**		**Faixas**
NaCl	g/l	12,5	0-25, 5-20 ou 10-15
KCl	g/l	1,0	0-5, 0,25-3 ou 0,5-2
$MgSO_4$-$7H_2O$	g/l	5,0	
$(NH_4)_2SO_4$	g/l	0,6	0-10, 0,25-5 ou 0,5-3
$CaCl_2$	g/l	0,29	0,1-5, 0,1 5-3 ou 0,2-1
T 154 (extrato de levedura)	g/l	6,0	0-20, 1-15 ou 5-10
KH_2PO_4	g/l	1,2	0,1-10, 0,5-5 ou 1-3
Pós-autoclave (metais)			
Ácido cítrico	mg/l	3,5	0,1-100, 1-50 ou 2-25
$FeSO_4$-$7H_2O$	mg/l	10,30	0,1-100, 1-50 ou 5-25
$MnCl_2$-$4H_2O$	mg/l	3,10	0,1-100, 1-50 ou 2-25
$ZnSO_4$ $7H_2O$	mg/l	3,10	0,1-100, 1-50 ou 2-25
$CoCl_2$-$6H_2O$	mg/l	0,04	0,001-1, 0,005-0,5 ou 0,01-0,1
Na_2MoO_4-$2H_2O$	mg/l	0,04	0,001 -1, 0,005-0,5 ou 0,01-0,1
$CuSO_4$-$5H_2O$	mg/l	2,07	0,1-100, 0,5-50 ou 1 -25
$NiSO_4$-$6H_2O$	mg/l	2,07	0,1-100, 0,5-50 ou 1 -25
Pós-autoclave (vitaminas)			
Tiamina**	mg/l	9,75	0,1-100, 1-50 ou 5-25
Vitamina B12**	mg/l	0,16	0,1-100, 0,1 -10 ou 0,1-1
Ca½-pantotenato**	mg/l	3,33	0,1 -100, 0,1-50 ou 1-10
** Esterilizada por filtro			

Pós-autoclave (carbono)			
Glicose	g/l	30,0	5-150, 10-100 ou 20-50
Alimentação de nitrogênio			
Ingrediente	**Concentração**		
NH_4OH	ml/l	21,6	0-150, 10- 100 ou 15-50

Condições de cultivo típicas incluiriam o seguinte:

pH cerca de 6,5 - cerca de 8,5, cerca de 6,5 - cerca de 8,0 ou cerca de 7,0 - cerca de 7,5.

Temperatura: cerca de 17 - cerca de 30 graus Celsius, cerca de 20 - cerca de 25 graus Celsius ou cerca de 22 até cerca de 23 graus Celsius;

Oxigênio dissolvido: cerca de 5 - cerca de 100% de saturação, cerca de 10 - cerca de 80% de saturação, ou cerca de 20 - cerca de 50% de saturação;

Glicose controlada @: cerca de 5 - cerca de 50 g/l, cerca de 10 - cerca de 40 g/l ou cerca de 20 - cerca de 35 g/l.

[130] Em algumas modalidades, o meio de cultura compreende pelo menos cerca de 5%, pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80% ou pelo menos cerca de 90% de oxigênio dissolvido, como uma percentagem do nível de saturação. Em algumas modalidades, o meio de cultura compreende de cerca de 5% até cerca de 20%, cerca de 5% até cerca de 50%, cerca de 5% até cerca de 100%, cerca de 10% até cerca de 20%, cerca de 10% até cerca de 50%, cerca de 10% até cerca de 100%, cerca de 20% até cerca de 50% ou cerca de 20% até cerca de 100% de oxigênio dissolvido, como uma percentagem do nível de

saturação.

[131] A invenção é ainda dirigida a uma biomassa isolada de um traustoquitrídeo da invenção. Uma biomassa de traustoquitrídeo isolado da invenção é uma biomassa celular colhida obtida por qualquer método convencional para o isolamento de uma biomassa de traustoquitrídeo, tal como descrito na Patente U.S. N° 5.130.242 e Publicação de Pedido U.S. N° 2002/0001833.

[132] Em algumas modalidades, a massa de células secas da biomassa isolada de cada litro de cultura é de pelo menos cerca de 50 g, pelo menos cerca de 60 g, pelo menos cerca de 70 g, pelo menos cerca de 80 g, pelo menos cerca de 100 g, pelo menos cerca de 120 g, pelo menos cerca de 140 g, pelo menos cerca de 160 g, pelo menos cerca de 180 g, ou pelo menos cerca de 200 g após crescimento por cerca de 7 dias a cerca de 17°C até cerca de 30°C em um meio de cultura de pH de cerca de 6,5 até cerca de 8,5 que compreende fontes de carbono, nitrogênio e nutrientes, e cerca de 950 ppm até cerca de 8.500 ppm de íons cloreto. Em algumas modalidades, a massa de células secas da biomassa isolada de cada litro de cultura é de pelo menos cerca de 50 g, pelo menos cerca de 60 g, pelo menos cerca de 70 g, pelo menos cerca de 80 g, pelo menos cerca de 100 g, pelo menos cerca de 120 g, pelo menos cerca de 140 g, pelo menos cerca de 160 g, pelo menos cerca de 180 g, ou pelo menos cerca de 200 g após crescimento por cerca de 7 dias a cerca de 17°C, a cerca de 18°C, a cerca de 19°C, a cerca de 20°C, a cerca de 21°C, a cerca de 22°C, a cerca de 23°C, a cerca de 24°C, a cerca de 25°C, a cerca de 26°C, a cerca de 27°C, a cerca de 28°C, a cerca de 29°C, ou a cerca de 30°C em um

meio de cultura de pH de cerca de 6,5, pH de cerca de 7, pH de cerca de 7,5, pH de cerca de 8,0 ou pH de cerca de 8,5 que compreende fontes de carbono, nitrogênio e nutrientes, e cerca de 950 ppm até cerca de 8.500 ppm de íons cloreto. Em algumas modalidades, a massa de células secas da biomassa isolada de cada litro de cultura é de cerca de 50 g até cerca de 200 g após crescimento por cerca de 7 dias a cerca de 17°C até cerca de 30°C em um meio de cultura de pH de cerca de 6,5 até pH de cerca de 8,5 que compreende fontes de carbono, nitrogênio e nutrientes, e cerca de 950 ppm até cerca de 8.500 ppm de íons cloreto. Em algumas modalidades, a massa de células secas da biomassa isolada de cada litro de cultura é de cerca de 50 g até cerca de 200 g após crescimento por cerca de 7 dias a cerca de 17°C, a cerca de 18°C, a cerca de 19°C, a cerca de 20°C, a cerca de 21°C, a cerca de 22°C, a cerca de 23°C, a cerca de 24°C, a cerca de 25°C, a cerca de 26°C, a cerca de 27°C, a cerca de 28°C, a cerca de 29°C, ou a cerca de 30°C em um meio de cultura de pH de cerca de 6,5, pH de cerca de 7, pH de cerca de 7,5, pH de cerca de 8,0 ou pH de cerca de 8,5 que compreende fontes de carbono, nitrogênio e nutrientes, e cerca de 950 ppm até cerca de 8.500 ppm de íons cloreto.

[133] Em algumas modalidades, a cultura de traustoquitrídeo isolado possui uma produtividade de ácido graxo ômega-3 de pelo menos cerca de 2 g/l/dia, pelo menos cerca de 4 g/l/dia ou pelo menos cerca de 8 g/l/dia após crescimento por cerca de 7 dias a cerca de 17°C até cerca de 30°C em um meio de cultura de pH de cerca de 6,5 até pH de cerca de 8,5 que compreende fontes de carbono, nitrogênio e nutrientes, e cerca de 950 ppm até cerca de

8.500 ppm de íons cloreto. Em algumas modalidades, a cultura de traustoquitrídeo isolado possui uma produtividade de ácido graxo ômega-3 entre cerca de 1 g/l/dia até cerca de 20 g/l/dia, cerca de 2 g/l/dia até cerca de 15 g/l/dia, cerca de 2 g/l/dia até cerca de 10 g/l/dia, cerca de 3 g/l/dia até cerca de 10 g/l/dia ou cerca de 4 g/l/dia até cerca de 9 g/l/dia, após crescimento por cerca de 7 dias a cerca de 17°C até cerca de 30°C em um meio de cultura de pH de cerca de 6,5 até pH de cerca de 8,5 que compreende fontes de carbono, nitrogênio e nutrientes, e cerca de 950 ppm até cerca de 8.500 ppm de íons cloreto.

[134| Em algumas modalidades, o volume de fermentação (volume de cultura) é de pelo menos cerca de 2 litros, pelo menos cerca de 10 litros, pelo menos cerca de 50 litros, pelo menos cerca de 100 litros, pelo menos cerca de 200 litros, pelo menos cerca de 500 litros, pelo menos cerca de 1.000 litros, pelo menos cerca de 10.000 litros, pelo menos cerca de 20.000 litros, pelo menos cerca de 50.000 litros, pelo menos cerca de 100.000 litros, pelo menos cerca de 150.000 litros, pelo menos cerca de 200.000 litros, ou pelo menos cerca de 250.000 litros. Em algumas modalidades, o volume de fermentação é de cerca de 2 litros até cerca de 300.000 litros, cerca de 2 litros, cerca de 10 litros, cerca de 50 litros, cerca de 100 litros, cerca de 200 litros, cerca de 500 litros, cerca de 1.000 litros, cerca de 10.000 litros, cerca de 20.000 litros, cerca de 50.000 litros, cerca de 100.000 litros, cerca de 150.000 litros, cerca de 200.000 litros, cerca de 250.000 litros ou cerca de 300.000 litros.

[135] Em algumas modalidades, a invenção é dirigida a uma biomassa de traustoquitrídeo isolado que compreende um perfil de ácido graxo da invenção. Em algumas modalidades, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70% ou pelo menos cerca de 80% da massa de células secas da biomassa são ácidos graxos. Em algumas modalidades, mais do que cerca de 50%, mais do que cerca de 55% ou mais do que cerca de 60% da massa de células secas da biomassa são ácidos graxos. Em algumas modalidades, de cerca de 50% até cerca de 60%, cerca de 50% até cerca de 70%, cerca de 50% até cerca de 80%, cerca de 55% até cerca de 70%, cerca de 55% até cerca de 80%, cerca de 60% até cerca de 70% ou cerca de 60% até cerca de 80% por peso da massa de células secas da biomassa são ácidos graxos. Em algumas modalidades, a biomassa compreende pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70% ou pelo menos cerca de 80% por peso dos ácidos graxos como ácidos graxos ômega-3. Em algumas modalidades, a biomassa compreende de cerca de 50% até cerca de 60%, cerca de 50% até cerca de 70%, cerca de 50% até cerca de 80% por peso dos ácidos graxos como ácidos graxos ômega-3. Em algumas modalidades, a biomassa compreende pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 55%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 65%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 75% ou pelo menos cerca de 80% por peso dos ácidos graxos como DHA. Em algumas modalidades, a biomassa compreende de cerca de 50% até cerca de 60%, cerca de 50% até cerca de 70% ou cerca de 50% até cerca de 80% por peso dos ácidos graxos como DHA. Em algumas modalidades, pelo menos cerca de 25%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos

cerca de 40%, pelo menos cerca de 50% ou pelo menos cerca de 60% por peso da massa de células secas da biomassa é ácido docosahexaenóico. Em algumas modalidades, cerca de 25% até cerca de 65%, cerca de 25% até cerca de 50%, cerca de 30% até cerca de 40% ou cerca de 25% até cerca de 35% por peso da massa de células secas da biomassa é ácido docosahexaenóico. Em algumas modalidades, a biomassa compreende cerca de 10% ou menos, cerca de 9% ou menos, cerca de 8% ou menos, cerca de 7% ou menos, cerca de 6% ou menos, cerca de 5% ou menos, cerca de 4% ou menos, cerca de 3% ou menos, cerca de 2% ou menos, ou cerca de 1% ou menos por peso dos ácidos graxos como EPA. Em algumas modalidades, a biomassa compreende de cerca de 1% até cerca de 10%, cerca de 1% até cerca de 5%, cerca de 2% até cerca de 5%, cerca de 3% até cerca de 5% ou cerca de 3% até cerca de 10% por peso dos ácidos graxos como EPA. Em algumas modalidades, a biomassa é substancialmente livre de EPA. Em algumas modalidades, a biomassa compreende uma proporção de peso de DHA para EPA de pelo menos cerca de 5:1, pelo menos cerca de 7:1, pelo menos cerca de 10:1, pelo menos cerca de 11:1, pelo menos cerca de 14:1, pelo menos cerca de 15:1, pelo menos cerca de 17:1, pelo menos cerca de 20:1, pelo menos cerca de 25:1, pelo menos cerca de 50:1 ou pelo menos cerca de 100:1, em que a biomassa compreende cerca de 10% ou menos por peso dos ácidos graxos como EPA. Em algumas modalidades, a biomassa compreende de cerca de 0,1% a 0,2%, cerca de 0,1% até cerca de 0,3%, cerca de 0,1% até cerca de 0,4%, cerca de 0,1% até cerca de 0,5% ou cerca de 0,1% até cerca de 1,5% por peso dos ácidos graxos como ARA. Em algumas modalidades, a biomassa compreende cerca de 1,5% ou

menos, cerca de 1% ou menos, cerca de 0,5% ou menos, cerca de 0,4% ou menos, cerca de 0,3% ou menos, cerca de 0,2% ou menos, ou cerca de 0,1% ou menos por peso dos ácidos graxos como ARA. Em algumas modalidades, a biomassa é substancialmente livre de ARA. Em algumas modalidades, a biomassa compreende uma proporção de peso de DHA para ARA de pelo menos cerca de 20:1, pelo menos cerca de 40:1, pelo menos cerca de 60:1, pelo menos cerca de 80:1, pelo menos cerca de 100:1, pelo menos cerca de 150:1, pelo menos cerca de 200:1, pelo menos cerca de 250:1 ou pelo menos cerca de 300:1. Em algumas modalidades, a biomassa compreende de cerca de 0,5% até cerca de 1%, cerca de 0,5% até cerca de 2%, cerca de 0,5% até cerca de 5%, cerca de 0,5% até cerca de 6%, cerca de 1% até cerca de 5%, cerca de 1% até cerca de 6%, cerca de 2% até cerca de 5% ou cerca de 2% até cerca de 6% por peso dos ácidos graxos como DPA n-6. Em algumas modalidades, a biomassa compreende cerca de 6% ou menos, cerca de 5% ou menos, cerca de 2% ou menos, cerca de 1% ou menos, ou cerca de 0,5% ou menos por peso dos ácidos graxos como DPA n-6. Em algumas modalidades, a biomassa é substancialmente livre de DPA n-6. Em algumas modalidades, a biomassa compreende uma proporção de peso de DHA para DPA n-6 de mais do que cerca de 6:1, pelo menos cerca de 8:1, pelo menos cerca de 10:1, pelo menos cerca de 15:1, pelo menos cerca de 20:1, pelo menos cerca de 25:1, pelo menos cerca de 50:1 ou pelo menos cerca de 100:1. Em algumas modalidades, a biomassa compreende ácidos graxos com cerca de 5% ou menos, cerca de 4% ou menos, cerca de 3% ou menos, ou cerca de 2% ou menos por peso de cada um de ácido linoléico (18:2 n-6), ácido linolênico (18:3 n-3), ácido

eicosenóico (20:1 n-9) e ácido erúcico (22:1 n-9).

[136] Em outra modalidade, é aqui fornecida uma biomassa que compreende ácidos graxos, em que os ácidos graxos ainda compreendem ácidos graxos ômega-3 poliinsaturados, em que os ácidos graxos ômega-3 poliinsaturados compreendem DHA e EPA em uma quantidade aproximadamente maior ou igual a cerca de 58-68%, particularmente cerca de 60%, por peso, da quantidade total de ácidos graxos ômega-3 poliinsaturados e a quantidade de EPA, por peso, é de cerca de 5% até cerca de 60% da quantidade total do peso total do EPA e DHA.

[137] As características de uma biomassa isolada da invenção estão associadas às propriedades endógenas ou nativas da biomassa isolada, e não do material introduzido de forma exógena.

Óleos microbianos

[138] São aqui fornecidos óleos, em particular óleos microbianos, feitos pelos métodos descritos acima.

[139] Em algumas modalidades, o óleo microbiano compreende ácidos graxos, em que os ácidos graxos ainda compreendem ácidos graxos ômega-3 poliinsaturados, em que os ácidos graxos ômega-3 poliinsaturados compreendem DHA e EPA em uma quantidade de cerca de ≥90%, por peso, da quantidade total de ácidos graxos ômega-3 poliinsaturados e a quantidade de EPA, por peso, é de cerca de 6% até cerca de 65% da quantidade total de EPA e DHA. É particularmente fornecido um óleo microbiano em que a quantidade de EPA, por peso, é de cerca de 6% até cerca de 28% da quantidade total de EPA e DHA. É ainda aqui fornecido um óleo microbiano em que a quantidade de EPA, por peso, é de cerca

de 36% até cerca de 65 da quantidade total do EPA e DHA. Mais particularmente, é fornecido um óleo microbiano em que a quantidade de EPA, por peso, é de cerca de 28% até cerca de 36% da quantidade total de EPA e DHA.

[140] Em uma modalidade adicional, é aqui fornecido um óleo microbiano que compreende ácidos graxos, em que os ácidos graxos ainda compreendem DHA e EPA e a quantidade de EPA, por peso, é de cerca de 15 até cerca de 60% do peso total de EPA e DHA.

[141] Em outra modalidade, é aqui fornecido um óleo microbiano que compreende ácidos graxos, em que os ácidos graxos ainda compreendem ácidos graxos ômega-3 poliinsaturados, em que os ácidos graxos ômega-3 poliinsaturados compreendem DHA e EPA em uma quantidade aproximadamente maior ou igual a cerca de 58-68%, particularmente cerca de 60%, por peso, da quantidade total de ácidos graxos ômega-3 poliinsaturados e a quantidade de EPA, por peso, é de cerca de 5% até cerca de 60% da quantidade total do peso total do EPA e DHA.

[142] A invenção é dirigida a um óleo microbiano que compreende um perfil de ácido graxo da invenção. Um óleo microbiano da invenção é um "óleo bruto" ou um "óleo refinado" que compreende uma fração de triacilglicerol de pelo menos cerca de 35% por peso. Um "óleo bruto" é um óleo que é extraído da biomassa do microorganismo sem processamento adicional. Um "óleo refinado" é um óleo que é obtido por tratamento de um óleo bruto com processamento-padrão de refinamento, branqueamento e/ou desodorização. Veja, por exemplo, a Patente U.S. N° 5.130.242, aqui incorporada por referência em sua totalidade. Um óleo

microbiano também inclui um "óleo final", como aqui descrito, que é um óleo refinado que foi diluído com um óleo vegetal. Em algumas modalidades, um óleo final é um óleo refinado que foi diluído com óleo girassol rico em oléico. O termo "microbiano", como aqui usado, inclui, sem limitação, os termos "microalga", "traustoquitrídeo" e classificações taxonômicas associadas com qualquer um dos microorganismos depositados aqui descritos. Os termos "Thraustochytriales", "traustoquitrídeo", "*Schizochytrium*", e "*Thraustochytrium*", como usados em referência a qualquer um dos óleos microbianos dos microorganismos depositados aqui descritos, são baseados em classificações taxonômicas presentes que incluem informação filogenética disponível e não visam ser limitantes caso as classificações taxonômicas sejam revisadas após a data de depósito do presente pedido.

[143] Em algumas modalidades, um ácido graxo como aqui descrito pode ser um éster de ácido graxo. Em algumas modalidades, um éster de ácido graxo inclui um éster de um ácido graxo ômega-3, ácido graxo ômega-6, e combinações destes. Em algumas modalidades, o éster de ácido graxo é um éster de DHA, um éster de EPA, ou uma combinação destes. Em algumas modalidades, um óleo ou fração deste, como aqui descrito, é esterificado para produzir um óleo ou fração deste que compreende ésteres de ácido graxo. O termo "éster" se refere à substituição do hidrogênio no grupo ácido carboxílico da molécula de ácido graxo com outro substituinte. Ésteres típicos são conhecidos por aqueles habilitados na técnica, cuja discussão é fornecida por Higuchi, T. e V. Stella em "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, e "Protective Groups in Organic Chemistry", McOmie ed., Plenum Press, Nova York, 1973. Exemplos de ésteres incluem metil, etil, propil, butil, pentil, t-butil, benzil, nitrobenzil, metoxibenzil, benzidril e tricloroetil. Em algumas modalidades, o éster é um grupo éster de proteção de ácido carboxílico, ésteres com aralquil (por exemplo, benzil, fenetil), ésteres com alquenil inferior (por exemplo, alil, 2-butenil), ésteres com alcóxi inferior-alquil inferior (por exemplo, metoximetil, 2-metoxietil, 2-etoxietil), ésteres com alcanoiloxi inferior-alquil inferior (por exemplo, acetoximetil, pivaloiloximetil, 1-pivaloiloxietil), ésteres com alcoxicarbonil inferior-alquil inferior (por exemplo, metoxicarbonilmetil, isopropoxicarbonilmetil), ésteres com carbóxi-alquil inferior (por exemplo, carboximetil), ésteres com alcoxicarboniloxi inferior-alquil inferior (por exemplo, 1- (etoxicarboniloxi)etil, 1-(ciclohexiloxicarboniloxi)etil), ésteres com carbamoiloxi-alquil inferior (por exemplo, carbamoiloximetil), e semelhantes. Em algumas modalidades, o substituinte adicionado é um grupo hidrocarboneto linear ou cíclico, por exemplo, um C_1-C_6 alquil, C_1-C_6 cicloalquil, C_1-C_6 alquenil ou C_1-C_6 aril éster. Em algumas modalidades, o éster é um alquil éster, por exemplo, um metil éster, etil éster ou propil éster. Em algumas modalidades, o substituinte éster é adicionado à molécula de ácido graxo livre quando o ácido graxo está em um estado purificado ou semipurificado. Alternativamente, o éster de ácido graxo é formado mediante

conversão de um triacilglicerol em um éster.

[144] A presente invenção é dirigida aos métodos de produção de óleos microbianos. Em algumas modalidades, o método compreende o crescimento de qualquer um dos microorganismos isolados da invenção ou misturas destes em uma cultura para produzir um óleo microbiano que compreende ácidos graxos ômega-3. Em algumas modalidades, o método ainda compreende a extração do óleo microbiano. Em algumas modalidades, o método compreende a extração de um óleo microbiano que compreende ácidos graxos ômega-3 de qualquer uma das biomassas da invenção ou misturas destas. Em algumas modalidades, o método compreende o crescimento heterotrófico do microorganismo isolado, em que a cultura compreende uma fonte de carbono como aqui descrita. O óleo microbiano pode ser extraído de uma biomassa recém colhida ou pode ser extraído de uma biomassa previamente colhida que foi armazenada sob condições que evitam a deterioração. Métodos conhecidos podem ser usados para cultivar um microorganismo da invenção, para isolar uma biomassa da cultura, para extrair um óleo microbiano da biomassa e para analisar o perfil de ácido graxo de óleos extraídos da biomassa. Veja, por exemplo, a Patente U.S. N° 5.130.242, aqui incorporada por referência em sua totalidade. A invenção é dirigida a um óleo microbiano produzido por qualquer um dos métodos da invenção.

[145] Em algumas modalidades, o óleo microbiano é extraído por um método de extração enzimática. Em algumas modalidades, o óleo microbiano é extraído por um método de extração mecânica. Em algumas modalidades, o método de extração mecânica compreende um ou mais de: (1)

processamento de um caldo de fermentação pasteurizado por meio de um homogeneizador para ajudar na lise da célula e liberar o óleo das células; (2) adição de álcool isopropílico ao caldo de fermentação após homogeneização para quebrar a emulsão de óleo e água; (3) centrifugação da mistura para recuperar a fase oleosa; e (4) secagem sob vácuo com adição de antioxidantes. Em algumas modalidades, o óleo bruto é purificado. Em algumas modalidades, purificação do óleo bruto compreende um ou mais de: (1) bombeamento do óleo bruto em um tanque de refinamento e aquecimento do óleo, seguido por adição de uma solução ácida com misturação; (2) adição de uma solução cáustica ao óleo após tratamento ácido; (3) reaquecimento do óleo bruto e depois centrifugação para separar a fase pesada do óleo refinado; (4) remoção dos compostos polares restantes, metais-traço e produtos de oxidação do óleo refinado por utilização de, por exemplo, ácido, TriSyl®, argila e/ou filtração; (5) filtração a frio do óleo branqueado para remover ainda mais componentes com ponto de fusão elevado do óleo para obter o nível desejado de limpidez; (6) aquecimento do óleo, e depois o óleo é então resfriado e mantido por um período de tempo fazendo com que os triglicerídeos com ponto de fusão elevado e ceras cristalizem; (7) adição de um auxiliar de filtração ao óleo resfriado e depois remoção de sólidos cristalizados por filtração; (8) utilização de um desodorizador após filtração a frio, operado sob temperatura elevada e vácuo, para remover, por exemplo, peróxidos e quaisquer compostos de baixo peso molecular restantes que possam causar odor e sabores desagradáveis; (9) transferência do óleo ao tanque

de alimentação de desodorizador, desaeração e desodorização, por exemplo, em uma desodorizador de coluna de recheio; e (10) resfriamento, por exemplo, sob uma manta de nitrogênio ao final do ciclo de desodorização e adição de antioxidantes adequados ao óleo desodorizado para fornecer estabilidade oxidativa.

[146] Em algumas modalidades, o óleo microbiano compreende uma fração de ésteres de esterol de cerca de 0%, pelo menos cerca de 0,1%, pelo menos cerca de 0,2%, pelo menos cerca de 0,5%, pelo menos cerca de 1%, pelo menos cerca de 1,5%, pelo menos cerca de 2% ou pelo menos cerca de 5% por peso. Em algumas modalidades, o óleo microbiano compreende uma fração de ésteres de esterol de cerca de 0% até cerca de 1,5%, cerca de 0% até cerca de 2%, cerca de 0% até cerca de 5%, cerca de 1% até cerca de 1,5%, cerca de 0,2% até cerca de 1,5%, cerca de 0,2% até cerca de 2% ou cerca de 0,2% até cerca de 5% por peso. Em algumas modalidades, o óleo microbiano compreende uma fração de ésteres de esterol de cerca de 5% ou menos, cerca de 4% ou menos, cerca de 3% ou menos, cerca de 2% ou menos, cerca de 1% ou menos, cerca de 0,5% ou menos, cerca de 0,3% ou menos, cerca de 0,2% ou menos, cerca de 0,5% ou menos, cerca de 0,4% ou menos, cerca de 0,3% ou menos, ou cerca de 0,2% ou menos por peso.

[147] Em algumas modalidades, o óleo microbiano compreende uma fração de triacilglicerol de pelo menos cerca de 35%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 45%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 55%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 65%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 75%, pelo menos cerca de

80%, pelo menos cerca de 85% ou pelo menos cerca de 90% por peso. Em algumas modalidades, o óleo microbiano compreende uma fração de triacilglicerol de cerca de 35% até cerca de 98%, cerca de 35% até cerca de 90%, cerca de 35% até cerca de 80%, cerca de 35% até cerca de 70%, cerca de 35% até cerca de 70%, cerca de 35% até cerca de 65%, cerca de 40% até cerca de 70%, cerca de 40% até cerca de 65%, cerca de 40% até cerca de 55%, cerca de 40% até cerca de 50%, cerca de 65% até cerca de 95%, cerca de 75% até cerca de 95%, cerca de 75% até cerca de 98%, cerca de 80% até cerca de 95%, cerca de 80% até cerca de 98%, cerca de 90% até cerca de 96%, cerca de 90% até cerca de 97%, cerca de 90% até cerca de 98%, cerca de 90%, cerca de 95%, cerca de 97% ou cerca de 98% por peso.

[148] Em algumas modalidades, o óleo microbiano compreende uma fração de diacilglicerol de pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 11%, pelo menos cerca de 12%, pelo menos cerca de 13%, pelo menos cerca de 14%, pelo menos cerca de 15%, pelo menos cerca de 16%, pelo menos cerca de 17%, pelo menos cerca de 18%, pelo menos cerca de 19% ou pelo menos cerca de 20% por peso. Em algumas modalidades, o óleo microbiano compreende uma fração de diacilglicerol de cerca de 10% até cerca de 45%, cerca de 10% até cerca de 40%, cerca de 10% até cerca de 35%, cerca de 10% até cerca de 30%, cerca de 15% até cerca de 40%, cerca de 15% até cerca de 35% ou cerca de 15% até cerca de 30% por peso. Em algumas modalidades, o óleo microbiano compreende uma fração de 1,2-diacilglicerol de pelo menos cerca de 0,2%, pelo menos cerca de 0,3%, pelo menos cerca de 0,4%; pelo menos cerca de 0,5%, pelo menos cerca de 1%,

pelo menos cerca de 5%, pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 11%, pelo menos cerca de 12%, pelo menos cerca de 13%, pelo menos cerca de 14%, pelo menos cerca de 15%, pelo menos cerca de 16%, pelo menos cerca de 17%, pelo menos cerca de 18%, pelo menos cerca de 19% ou pelo menos cerca de 20% por peso. Em algumas modalidades, o óleo microbiano compreende uma fração de diacilglicerol de cerca de 0,2% até cerca de 45%, cerca de 0,2% até cerca de 30%, cerca de 0,2% até cerca de 20%, cerca de 0,2% até cerca de 10%, cerca de 0,2% até cerca de 5%, cerca de 0,2% até cerca de 1%, cerca de 0,2% até cerca de 0,8%, cerca de 0,4% até cerca de 45%, cerca de 0,4% até cerca de 30%, cerca de 0,4% até cerca de 20%, cerca de 0,4% até cerca de 10%, cerca de 0,4% até cerca de 5%, cerca de 0,4% até cerca de 1%, cerca de 0,4% até cerca de 0,8%, cerca de 0,5% até cerca de 1%, cerca de 0,5% até cerca de 0,8%, cerca de 10% até cerca de 45%, cerca de 10% até cerca de 40%, cerca de 10% até cerca de 35%, cerca de 10% até cerca de 30%, cerca de 15% até cerca de 40%, cerca de 15% até cerca de 35%, cerca de 15% até cerca de 30% ou cerca de 15% até cerca de 25% por peso. Em algumas modalidades, o óleo microbiano compreende uma fração de 1,3-diacilglicerol de pelo menos cerca de 0,1%, pelo menos cerca de 0,2%, pelo menos cerca de 0,5%, pelo menos cerca de 1%, pelo menos cerca de 2%, pelo menos cerca de 2.5% ou pelo menos cerca de 3% por peso. Em algumas modalidades, o óleo microbiano compreende uma fração de esterol de pelo menos cerca de 0,3%, pelo menos cerca de 0,4%, pelo menos cerca de 0,5%, pelo menos cerca de 1%, pelo menos cerca de 1,5%, pelo menos cerca de 2% ou pelo menos cerca de 5% por peso.

[149] Em algumas modalidades, o óleo microbiano compreende uma fração de esterol de cerca de 0,3% até cerca de 5%, cerca de 0,3% até cerca de 2%, cerca de 0,3% até cerca de 1,5%, cerca de 0,5% até cerca de 1,5%, cerca de 1% até cerca de 1,5%, cerca de 0,5% até cerca de 2%, cerca de 0,5% até cerca de 5%, cerca de 1% até cerca de 2% ou cerca de 1% até cerca de 5% por peso. Em algumas modalidades, o óleo microbiano compreende uma fração de esterol de cerca de 5% ou menos, cerca de 4% ou menos, cerca de 3% ou menos, cerca de 2% ou menos, cerca de 1,5% ou menos, ou cerca de 1% ou menos por peso.

[150] Em algumas modalidades, o óleo microbiano compreende uma fração de fosfolipídeo de pelo menos cerca de 2%, pelo menos cerca de 5% ou pelo menos cerca de 8% por peso. Em algumas modalidades, o óleo microbiano compreende uma fração de fosfolipídeo de cerca de 2% até cerca de 25%, cerca de 2% até cerca de 20%, cerca de 2% até cerca de 15%, cerca de 2% até cerca de 10%, cerca de 5% até cerca de 25%, cerca de 5% até cerca de 20%, cerca de 5% até cerca de 20%, cerca de 5% até cerca de 10% ou cerca de 7% até cerca de 9% por peso. Em algumas modalidades, o óleo microbiano compreende uma fração de fosfolipídeo de menos do que cerca de 20%, menos do que cerca de 15%, menos do que cerca de 10%, menos do que cerca de 9% ou menos do que cerca de 8% por peso. Em algumas modalidades, o óleo microbiano é substancialmente livre de fosfolipídeos. Em algumas modalidades, o óleo microbiano compreende não saponificáveis de menos do que cerca de 2%, menos do que cerca de 1,5%, menos do que cerca de 1% ou menos do que cerca de 0,5% por peso do óleo. As classes de lipídeos

presentes no óleo microbiano, por exemplo, uma fração de triacilglicerol, podem ser separadas por cromatografia instantânea e analisadas por cromatografia de camada delgada (TLC), ou separadas e analisadas por outros métodos conhecidos na técnica.

[151] Em algumas modalidades, o óleo microbiano e/ou uma ou mais frações deste selecionadas da fração de triacilglicerol, da fração de ácido graxo livre, da fração de esterol, da fração de diacilglicerol, e combinações destas, compreende pelo menos cerca de 5%, pelo menos cerca de 10%, mais do que cerca de 10%, pelo menos cerca de 12%, pelo menos cerca de 13%, pelo menos cerca de 14%, pelo menos cerca de 15%, pelo menos cerca de 16%, pelo menos cerca de 17%, pelo menos cerca de 18%, pelo menos cerca de 19%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 25%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 35%, pelo menos cerca de 40% ou pelo menos cerca de 45% por peso de EPA. Em algumas modalidades, o óleo microbiano e/ou uma ou mais frações deste selecionadas da fração de triacilglicerol, da fração de ácido graxo livre, da fração de esterol, da fração de diacilglicerol, e combinações destas, compreende cerca de 5% até cerca de 55%, cerca de 5% até cerca de 50%, cerca de 5% até cerca de 45%, cerca de 5% até cerca de 40%, cerca de 5% até cerca de 35%, cerca de 5% até cerca de 30%, cerca de 10% até cerca de 55%, cerca de 10% até cerca de 50%, cerca de 10% até cerca de 45%, cerca de 10% até cerca de 40%, cerca de 10% até cerca de 35%, cerca de 10% até cerca de 30%, pelo menos cerca de 12% até cerca de 55%, pelo menos cerca de 12% até cerca de 50%, pelo menos cerca de 12% até cerca de 45%), pelo menos cerca de 12% até cerca

de 40%, pelo menos cerca de 12% até cerca de 35% ou pelo menos cerca de 12% até cerca de 30%, cerca de 15% até cerca de 55%, cerca de 1% até cerca de 50%, cerca de 15% até cerca de 45%, cerca de 15% até cerca de 40%, cerca de 15% até cerca de 35%, cerca de 15% até cerca de 30%, cerca de 15% até cerca de 25%, cerca de 15% até cerca de 20%, cerca de 20% até cerca de 55%, cerca de 20% até cerca de 50%, cerca de 20% até cerca de 45%, cerca de 20% até cerca de 40% ou cerca de 20% até cerca de 30% por peso de EPA. -Em algumas modalidades, o óleo microbiano e/ou uma ou mais frações deste selecionadas da fração de triacilglicerol, da fração de diacilglicerol, da fração de esterol, da fração de ésteres de esterol, da fração de ácidos graxos livres, da fração de fosfolipídeo, e combinações destas, compreende pelo menos cerca de 5%, pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 15%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 25%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 35%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 50% ou pelo menos cerca de 60% por peso de DHA. Em algumas modalidades, o óleo microbiano e/ou uma ou mais frações deste selecionadas da fração de triacilglicerol, da fração de diacilglicerol, da fração de esterol, da fração de ésteres de esterol, da fração de ácidos graxos livres, da fração de fosfolipídeo, e combinações destas, compreende cerca de 5% até cerca de 60%, cerca de 5% até cerca de 55%, cerca de 5% até cerca de 50%, cerca de 5% até cerca de 40%, cerca de 10% até cerca de 60%, cerca de 10% até cerca de 50%, cerca de 10% até cerca de 40%, cerca de 20% até cerca de 60%, cerca de 25% até cerca de 60%, cerca de 25% até cerca de 50%, cerca de 25% até cerca de 45%, cerca de 30% até cerca de 50%, cerca

de 35% até cerca de 50% ou cerca de 30% até cerca de 40% por peso de DHA. Em algumas modalidades, o óleo microbiano e/ou uma ou mais frações deste selecionadas da fração de triacilglicerol, da fração de diacilglicerol, da fração de esterol, da fração de ésteres de esterol, da fração de ácidos graxos livres, da fração de fosfolipídeo, e combinações destas, compreende cerca de 10% ou menos, cerca de 9% ou menos, cerca de 8% ou menos, cerca de 7% ou menos, cerca de 6% ou menos, cerca de 5% ou menos, cerca de 4% ou menos, cerca de 3% ou menos, cerca de 2% ou menos, ou cerca de 1% ou menos por peso de DHA. Em algumas modalidades, o óleo microbiano e/ou uma ou mais frações deste selecionadas da fração de triacilglicerol, da fração de diacilglicerol, da fração de esterol, da fração de ésteres de esterol, da fração de ácidos graxos livres, da fração de fosfolipídeo, e combinações destas, compreende cerca de 1% até cerca de 10%, cerca de 1% até cerca de 5%, cerca de 2% até cerca de 5%, cerca de 3% até cerca de 5% ou cerca de 3% até cerca de 10% por peso dos ácidos graxos como DHA. Em algumas modalidades, o óleo microbiano e/ou uma ou mais frações deste selecionadas da fração de triacilglicerol, da fração de diacilglicerol, da fração de esterol, da fração de ésteres de esterol, da fração de ácidos graxos livres, da fração de fosfolipídeo, e combinações destas, é substancialmente livre de DHA. Em algumas modalidades, o óleo microbiano e/ou uma ou mais frações deste selecionadas da fração de triacilglicerol, da fração de diacilglicerol, da fração de esterol, da fração de ésteres de esterol, da fração de ácidos graxos livres, da fração de fosfolipídeo, e combinações destas, compreende cerca de 0,1% até cerca de

5%, cerca de 0,1% a menos do que cerca de 5%, cerca de 0,1% até cerca de 4%, cerca de 0,1% até cerca de 3%, cerca de 0,1% até cerca de 2%, cerca de 0,2% até cerca de 5%, cerca de 0,2% a menos do que cerca de 5%, cerca de 0,2% até cerca de 4%, cerca de 0,2% até cerca de 3%, cerca de 0,2% até cerca de 2%, cerca de 0,3% até cerca de 2%, cerca de 0,1% até cerca de 0,5%, cerca de 0,2% até cerca de 0,5%, cerca de 0,1% até cerca de 0,4%, cerca de 0,2% até cerca de 0,4%, cerca de 0,5% até cerca de 2%, cerca de 1% até cerca de 2%, cerca de 0,5% até cerca de 1,5% ou cerca de 1% até cerca de 1,5% por peso de ARA. Em algumas modalidades, o óleo microbiano e/ou uma ou mais frações deste selecionadas da fração de triacilglicerol, da fração de diacilglicerol, da fração de esterol, da fração de ésteres de esterol, da fração de ácidos graxos livres, da fração de fosfolipídeo, e combinações destas, compreende cerca de 5% ou menos, menos do que cerca de 5%, cerca de 4% ou menos, cerca de 3% ou menos, cerca de 2% ou menos, cerca de 1,5% ou menos, cerca de 1% ou menos, cerca de 0,5% ou menos, cerca de 0,4% ou menos, cerca de 0,3% ou menos, cerca de 0,2% ou menos, ou cerca de 0,1% ou menos por peso de ARA. Em algumas modalidades, o óleo microbiano e/ou uma ou mais frações deste selecionadas da fração de triacilglicerol, da fração de diacilglicerol, da fração de esterol, da fração de ésteres de esterol, da fração de ácidos graxos livres, da fração de fosfolipídeo, e combinações destas, é substancialmente livre de ARA. Em algumas modalidades, o óleo microbiano e/ou uma ou mais frações deste selecionadas da fração de triacilglicerol, da fração de diacilglicerol, da fração de esterol, da fração de ésteres de esterol, da

fração de ácidos graxos livres, da fração de fosfolipídeo, e combinações destas, compreende cerca de 0,4% até cerca de 2%, cerca de 0,4% até cerca de 3%, cerca de 0,4% até cerca de 4%, cerca de 0,4% até cerca de 5%, cerca de 0,4% a menos do que cerca de 5%, cerca de 0,5% até cerca de 1%, cerca de 0,5% até cerca de 2%, cerca de 0,5% até cerca de 3%, cerca de 0,5% até cerca de 4%, cerca de 0,5% até cerca de 5%, cerca de 0,5% a menos do que cerca de 5%, cerca de 1% até cerca de 2%, cerca de 1% até cerca de 3%, cerca de 1% até cerca de 4%, cerca de 1% até cerca de 5% ou cerca de 1% a menos do que cerca de 5% por peso de DPA n-6. Em algumas modalidades, o óleo microbiano e/ou uma ou mais frações deste selecionadas da fração de triacilglicerol, da fração de diacilglicerol, da fração de esterol, da fração de ésteres de esterol, da fração de ácidos graxos livres, da fração de fosfolipídeo, e combinações destas, compreende cerca de 5%, menos do que cerca de 5%, cerca de 4% ou menos, cerca de 3% ou menos, cerca de 2% ou menos, cerca de 1% ou menos, cerca de 0,75% ou menos, cerca de 0,6% ou menos, ou cerca de 0,5% ou menos por peso de DPA n-6. Em algumas modalidades, o óleo microbiano e/ou uma ou mais frações deste selecionadas da fração de triacilglicerol, da fração de diacilglicerol, da fração de esterol, da fração de ésteres de esterol, da fração de ácidos graxos livres, da fração de fosfolipídeo, e combinações destas, é substancialmente livre de DPA n-6. Em algumas modalidades, o óleo microbiano e/ou uma ou mais frações deste selecionadas da fração de triacilglicerol, da fração de diacilglicerol, da fração de esterol, da fração de ésteres de esterol, da fração de ácidos graxos livres, da fração de

fosfolipídeo, e combinações destas, compreende ácidos graxos com cerca de 5% ou menos, menos do que cerca de 5%, cerca de 4% ou menos, cerca de 3% ou menos, ou cerca de 2% ou menos por peso de ácido oléico (18:1 n-9), ácido linoléico (18:2 n-6), ácido linolênico (18:3 n-3), ácido eicosenóico (20:1 n-9), ácido erúcico (22:1 n-9), ácido estearidônico (18:4 n-3), ou combinações destes.

[152] A molécula de triacilglicerol contém 3 átomos de carbono centrais (C(*sn*-1)H_2R1-(*sn*-2)H_2R2-C(*sn*-3)H_2R3), que permitem a formação de isômeros posicionais diferentes. Em algumas modalidades, o óleo microbiano compreende uma fração de triacilglicerol na qual pelo menos cerca de 2%, pelo menos cerca de 3%, pelo menos cerca de 5%, pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 15%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 35% ou pelo menos cerca de 40% dos triacilgliceróis na fração de triacilglicerol contêm DHA em duas posições no triacilglicerol (DHA dissubstituído) selecionadas de quaisquer duas das posições *sn*-1, *sn*-2 e *sn*-3, com base no percentual da área relativa de picos em um cromatográfico de HPLC. Em algumas modalidades, o óleo microbiano compreende uma fração de triacilglicerol na qual cerca de 2% até cerca de 55%, cerca de 2% até cerca de 50%, cerca de 2% até cerca de 45%, cerca de 2% até cerca de 40%, cerca de 2% até cerca de 35%, cerca de 2% até cerca de 30%, cerca de 2% até cerca de 25%, cerca de 5% até cerca de 55%, cerca de 5% até cerca de 50%, cerca de 5% até cerca de 45%, cerca de 5% até cerca de 40%, cerca de 5% até cerca de 35%, cerca de 5% até cerca de 30%, cerca de 5% até cerca de 25%, cerca de 10% até cerca de 55%, cerca de 10% até cerca de 50%, cerca

de 10% até cerca de 45%, cerca de 10% até cerca de 40%, cerca de 10% até cerca de 35%, cerca de 10% até cerca de 30%, cerca de 10% até cerca de 25%, cerca de 10% até cerca de 20%, cerca de 20% até cerca de 40%, cerca de 20% até cerca de 35% ou cerca de 20% até cerca de 25% dos triacilgliceróis na fração de triacilglicerol contêm EPA em duas posições no triacilglicerol selecionadas de quaisquer duas posições *sn*-1, *sn*-2 ou *sn*-3, com base no percentual da área relativa de picos em um cromatográfico de HPLC. Em algumas modalidades, o óleo microbiano compreende uma fração de triacilglicerol na qual pelo menos cerca de 0,5%, pelo menos cerca de 1%, pelo menos cerca de 1,5% ou pelo menos cerca de 2% dos triacilgliceróis na fração de triacilglicerol contêm DHA em todas as posições *sn*-1, *sn*-2 e *sn*-3 (DHA trissubstituído), com base no percentual da área relativa de picos em um cromatográfico de HPLC. Em algumas modalidades, o óleo microbiano compreende uma fração de triacilglicerol na qual cerca de 0,5% até cerca de 5%, cerca de 0,5% até cerca de 3%, cerca de 0,5% até cerca de 2,5%, cerca de 0,5% até cerca de 2%, cerca de 1% até cerca de 5%, cerca de 1% até cerca de 3% ou cerca de 1% até cerca de 2% dos triacilgliceróis na fração de triacilglicerol contêm DHA em todas as posições *sn*-1, *sn*-2 e *sn*-3, com base no percentual da área relativa de picos em um cromatográfico de HPLC. Em algumas modalidades, o óleo microbiano compreende uma fração de triacilglicerol na qual pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 15%, pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 25%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 35%, pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 45%, pelo menos cerca de 50%, pelo

menos cerca de 55% ou pelo menos cerca de 60% dos triacilgliceróis na fração de triacilglicerol contêm DHA em uma posição no triacilglicerol selecionada de qualquer uma das posições *sn*-1, *sn*-2 ou *sn*-3, com base no percentual da área relativa de picos em um cromatográfico de HPLC. Em algumas modalidades, o óleo microbiano compreende uma fração de triacilglicerol na qual cerca de 10% até cerca de 80%, cerca de 10% até cerca de 70%, cerca de 10% até cerca de 60%, cerca de 15% até cerca de 80%, cerca de 15% até cerca de 75%, cerca de 15% até cerca de 70%, cerca de 15% até cerca de 65%, cerca de 15% até cerca de 60%, cerca de 35% até cerca de 80%, cerca de 35% até cerca de 75%, cerca de 35% até cerca de 65%, cerca de 35% até cerca de 60%, cerca de 40% até cerca de 80%, cerca de 40% até cerca de 75%, cerca de 40% até cerca de 70%, cerca de 40% até cerca de 65%, cerca de 40% até cerca de 60% ou cerca de 40% até cerca de 55% dos triacilgliceróis na fração de triacilglicerol contêm DHA em uma posição no triacilglicerol selecionada de qualquer uma das posições *sn*-1, *sn*-2 e *sn*-3, com base no percentual da área relativa de picos em um cromatográfico de HPLC.

[153] A presente invenção é ainda dirigida aos métodos de produção de óleos microbianos. Em algumas modalidades, o método compreende o crescimento de um traustoquitrídeo da invenção em uma cultura para produzir uma biomassa e extração de um óleo que compreende ácidos graxos ômega-3 da biomassa. O óleo pode ser extraído de uma biomassa recém colhida ou pode ser extraído de uma biomassa previamente colhida que foi armazenada sob condições que evitam a deterioração. Métodos conhecidos podem ser usados para

cultivar um traustoquitrídeo da invenção, para isolar uma biomassa da cultura, para extrair um óleo microbiano da biomassa e para analisar o perfil de ácido graxo de óleos extraídos da biomassa. Veja, por exemplo, a Patente U.S. N° 5.130.242.

[154] A invenção é ainda dirigida a um óleo microbiano que compreende um perfil de ácido graxo da invenção. Um óleo microbiano da invenção pode ser qualquer óleo derivado de um microorganismo, incluindo, por exemplo: um óleo bruto extraído da biomassa do microorganismo sem processamento adicional; um óleo refinado que é obtido por tratamento de um óleo microbiano bruto com etapas adicionais de processamento como, por exemplo, refinamento, branqueamento e/ou desodorização; um óleo microbiano diluído obtido por diluição de um óleo microbiano bruto ou refinado; ou um óleo enriquecido que é obtido, por exemplo, por tratamento de um óleo microbiano bruto ou refinado com métodos de purificação adicionais para aumentar a concentração de um ácido graxo (por exemplo, DHA) no óleo.

[155] Em algumas modalidades, o óleo microbiano compreende uma fração de ésteres de esterol de cerca de 0%, pelo menos cerca de 0,1%, pelo menos cerca de 0,2%, pelo menos cerca de 0,5%, pelo menos cerca de 1%, pelo menos cerca de 1,5%, pelo menos cerca de 2% ou pelo menos cerca de 5% por peso. Em algumas modalidades, o óleo microbiano compreende uma fração de ésteres de esterol de cerca de 0% até cerca de 1,5%, cerca de 0% até cerca de 2%, cerca de 0% até cerca de 5%, cerca de 1% até cerca de 1,5%, cerca de 0,2% até cerca de 1,5%, cerca de 0,2% até cerca de 2% ou cerca de 0,2% até cerca de 5% por peso. Em algumas

modalidades, o óleo microbiano compreende uma fração de ésteres de esterol de menos do que cerca de 5%, menos do que cerca de 4%, menos do que cerca de 3% ou menos do que cerca de 2% por peso. Em algumas modalidades, o óleo microbiano compreende uma fração de triglicerídeo de pelo menos cerca de 65%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 75%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85% ou pelo menos cerca de 90% por peso. Em algumas modalidades, o óleo microbiano compreende uma fração de triglicerídeo de cerca de 65% até cerca de 95%, cerca de 75% até cerca de 95% ou cerca de 80% até cerca de 95% por peso, ou cerca de 97% por peso, ou cerca de 98% por peso. Em algumas modalidades, o óleo microbiano compreende uma fração de ácido graxo livre de pelo menos cerca de 0,5%, pelo menos cerca de 1%, pelo menos cerca de 1,5%, pelo menos cerca de 2%, pelo menos cerca de 2,5% ou pelo menos cerca de 5% por peso. Em algumas modalidades, o óleo microbiano compreende uma fração de ácido graxo livre de cerca de 0,5% até cerca de 5%, cerca de 0,5% até cerca de 2,5%, cerca de 0,5% até cerca de 2%, cerca de 0,5% até cerca de 1,5%, cerca de 0,5% até cerca de 1%, cerca de 1% até cerca de 2,5%, cerca de 1% até cerca de 5%, cerca de 1,5% até cerca de 2,5%, cerca de 2% até cerca de 2,5% ou cerca de 2% até cerca de 5% por peso. Em algumas modalidades, o óleo microbiano compreende uma fração de ácido graxo livre de menos do que cerca de 5%, menos do que cerca de 4%, menos do que cerca de 3%, menos do que cerca de 2% ou menos do que cerca de 1% por peso. Em algumas modalidades, o óleo microbiano compreende uma fração de esterol de pelo menos cerca de 0,5%, pelo menos cerca de

1%, pelo menos cerca de 1,5%, pelo menos cerca de 2% ou pelo menos cerca de 5% por peso. Em algumas modalidades, o óleo microbiano compreende uma fração de esterol de cerca de 0,5% até cerca de 1,5%, cerca de 1% até cerca de 1,5%, cerca de 0,5% até cerca de 2%, cerca de 0,5% até cerca de 5%, cerca de 1% até cerca de 2% ou cerca de 1% até cerca de 5% por peso. Em algumas modalidades, o óleo microbiano compreende uma fração de esterol de menos do que cerca de 5%, menos do que cerca de 4%, menos do que cerca de 3%, menos do que cerca de 2% ou menos do que cerca de 1% por peso. Em algumas modalidades, o óleo microbiano compreende uma fração de diglicerídeo de pelo menos cerca de 1,5%, pelo menos cerca de 2%, pelo menos cerca de 2,5%, pelo menos cerca de 3%, pelo menos cerca de 3,5% ou pelo menos cerca de 5% por peso. Em algumas modalidades, o óleo microbiano compreende uma fração de diglicerídeo de cerca de 1,5% até cerca de 3%, cerca de 2% até cerca de 3%, cerca de 1,5% até cerca de 3,5%, cerca de 1,5% até cerca de 5%, cerca de 2,5% até cerca de 3%, cerca de 2,5% até cerca de 3,5% ou cerca de 2,5% até cerca de 5% por peso. Em algumas modalidades, o óleo microbiano compreende não saponificáveis de menos do que cerca de 2%, menos do que cerca de 1,5%, menos do que cerca de 1% ou menos do que cerca de 0,5% por peso do óleo. As classes de lipídeos presentes no óleo microbiano, por exemplo, a fração de triglicerídeo, podem ser separadas por cromatografia instantânea e analisadas por cromatografia de camada delgada (TLC), ou separadas e analisadas por outros métodos conhecidos na técnica.

[156] Em algumas modalidades, o óleo microbiano e/ou

uma ou mais frações deste selecionadas da fração de triglicerídeo, da fração de ácido graxo livre, da fração de esterol, da fração de diglicerídeo, e combinações destas, compreende pelo menos cerca de 40%, pelo menos cerca de 45%, pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 55%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 65%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 75% ou pelo menos cerca de 80% por peso de DHA. Em algumas modalidades, o óleo microbiano e/ou uma ou mais frações deste selecionadas da fração de triglicerídeo, da fração de ácido graxo livre, da fração de esterol, da fração de diglicerídeo, e combinações destas, compreende de cerca de 40% até cerca de 45%, cerca de 40% até cerca de 50%, cerca de 40% até cerca de 60%, cerca de 50% até cerca de 60%, cerca de 55% até cerca de 60%, cerca de 40% até cerca de 65%, cerca de 50% até cerca de 65%, cerca de 55% até cerca de 65%, cerca de 40% até cerca de 70%, cerca de 40% até cerca de 80%, cerca de 50% até cerca de 80%, cerca de 55% até cerca de 80%, cerca de 60% até cerca de 80% ou cerca de 70% até cerca de 80% por peso de DHA. Em algumas modalidades, o óleo microbiano compreende uma fração de ésteres de esterol que compreende cerca de 45% ou menos, cerca de 40% ou menos, cerca de 35% ou menos, cerca de 30% ou menos, cerca de 25% ou menos, cerca de 20% ou menos, cerca de 15% ou menos, ou cerca de 13% ou menos por peso de DHA. Em algumas modalidades, o óleo microbiano e/ou uma ou mais frações deste selecionadas da fração de triglicerídeo, da fração de ácido graxo livre, da fração de esterol, da fração de diglicerídeo, e combinações destas, compreende cerca de 10% ou menos, cerca de 9% ou menos, cerca de 8% ou menos, cerca de 7% ou menos,

cerca de 6% ou menos, cerca de 5% ou menos, cerca de 4% ou menos, cerca de 3% ou menos, cerca de 2% ou menos, ou cerca de 1% ou menos por peso de EPA. Em algumas modalidades, o óleo microbiano e/ou uma ou mais frações deste selecionadas da fração de triglicerídeo, da fração de ácido graxo livre, da fração de esterol, da fração de diglicerídeo, e combinações destas, compreende de cerca de 2% até cerca de 3%, cerca de 2% até cerca de 3,5%, cerca de 2,5% até cerca de 3,5%, cerca de 2% até cerca de 6%, cerca de 2,5% até cerca de 6%, cerca de 3,0% até cerca de 6%, cerca de 3,5% até cerca de 6%, cerca de 5% até cerca de 6% ou cerca de 2% até cerca de 10% por peso de EPA. Em algumas modalidades, o óleo microbiano e/ou uma ou mais frações deste selecionadas da fração de ésteres de esterol, da fração de triglicerídeo, da fração de ácido graxo livre, da fração de esterol, da fração de diglicerídeo, da fração polar (incluindo a fração de fosfolipídeo), e combinações destas, é substancialmente livre de EPA. Em algumas modalidades, o óleo microbiano e/ou uma ou mais frações deste selecionadas da fração de ésteres de esterol, da fração de triglicerídeo, da fração de ácido graxo livre, da fração de esterol, da fração de diglicerídeo, da fração polar (incluindo a fração de fosfolipídeo), e combinações destas, compreende uma proporção de peso de DHA para EPA de pelo menos cerca de 5:1, pelo menos cerca de 7:1, pelo menos cerca de 9:1, pelo menos cerca de 10:1, pelo menos cerca de 15:1, pelo menos cerca de 20:1, pelo menos cerca de 25:1, pelo menos cerca de 30:1 ou pelo menos cerca de 50:1, em que o óleo microbiano e/ou uma ou mais frações deste compreende 10% ou menos por peso de EPA. Em algumas

modalidades, o óleo microbiano e/ou uma ou mais frações deste selecionadas da fração de ésteres de esterol, da fração de triglicerídeo, da fração de ácido graxo livre, da fração de esterol, da fração de diglicerídeo, da fração polar (incluindo a fração de fosfolipídeo), e combinações destas, compreende uma proporção de peso de DHA para EPA de pelo menos cerca de 5:1, mas menos do que cerca de 20:1. Em algumas modalidades, a proporção de peso de DHA para EPA é de cerca de 5:1 até cerca de 18:1, de cerca de 7: 1 até cerca de 16:1 ou de cerca de 10:1 até cerca de 15:1. Em algumas modalidades, o óleo microbiano e/ou uma ou mais frações deste selecionadas da fração de ésteres de esterol, da fração de triglicerídeo, da fração de ácido graxo livre, da fração de esterol, da fração de diglicerídeo, da fração polar (incluindo a fração de fosfolipídeo), e combinações destas compreende de cerca de 0,1% até cerca de 0,25%, cerca de 0,2% até cerca de 0,25%, cerca de 0,1% até cerca de 0,5% ou cerca de 0,1% até cerca de 1,5% por peso de ARA. Em algumas modalidades, o óleo microbiano e/ou uma ou mais frações deste selecionadas da fração de ésteres de esterol, da fração de triglicerídeo, da fração de ácido graxo livre, da fração de esterol, da fração de diglicerídeo, da fração polar (incluindo a fração de fosfolipídeo), e combinações destas, compreende cerca de 1,5% ou menos, cerca de 1% ou menos, cerca de 0,5% ou menos, cerca de 0,2% ou menos, ou cerca de 0,1% ou menos por peso de ARA. Em algumas modalidades, o óleo microbiano e/ou uma ou mais frações deste selecionadas da fração de ésteres de esterol, da fração de triglicerídeo, da fração de ácido graxo livre, da fração de esterol, da fração de diglicerídeo, da fração

polar (incluindo a fração de fosfolipídeo), e combinações destas, é substancialmente livre de ARA. Em algumas modalidades, o óleo microbiano e/ou uma ou mais frações deste selecionadas da fração de ésteres de esterol, da fração de triglicerídeo, da fração de ácido graxo livre, da fração de diglicerídeo, da fração polar (incluindo a fração de fosfolipídeo), e combinações destas, compreende uma proporção de peso de DMA para ARA de pelo menos cerca de 20:1, pelo menos cerca de 30:1, pelo menos cerca de 35:1, pelo menos cerca de 40:1, pelo menos cerca de 60:1, pelo menos cerca de 80:1, pelo menos cerca de 100:1, pelo menos cerca de 150:1, pelo menos cerca de 200:1, pelo menos cerca de 250:1 ou pelo menos cerca de 300:1. Em algumas modalidades, o óleo microbiano e/ou uma ou mais frações deste selecionadas da fração de ésteres de esterol, da fração de triglicerídeo, da fração de ácido graxo livre, da fração de esterol, da fração de diglicerídeo, da fração polar (incluindo a fração de fosfolipídeo), e combinações destas, compreende de cerca de 0,5% até cerca de 1%, cerca de 0,5% até cerca de 2%, cerca de 0,5% até cerca de 2,5%, cerca de 0,5% até cerca de 3%, cerca de 0,5% até cerca de 3,5%, cerca de 0,5% até cerca de 5%, cerca de 0,5% até cerca de 6%, cerca de 1% até cerca de 2%, cerca de 2% até cerca de 3%, cerca de 2% até cerca de 3,5%, cerca de 1% até cerca de 2,5%, cerca de 1% até cerca de 3%, cerca de 1% até cerca de 3,5%, cerca de 1% até cerca de 5% ou cerca de 1% até cerca de 6% por peso de DPA n-6. Em algumas modalidades, o óleo microbiano e/ou uma ou mais frações deste selecionadas da fração de ésteres de esterol, da fração de triglicerídeo, da fração de ácido graxo livre, da

fração de esterol, da fração de diglicerídeo, da fração polar (incluindo a fração de fosfolipídeo), e combinações destas, compreende cerca de 6% ou menos, cerca de 5% ou menos, cerca de 3% ou menos, cerca de 2,5% ou menos, cerca de 2% ou menos, cerca de 1% ou menos, ou cerca de 0,5% ou menos por peso de DPA n-6. Em algumas modalidades, o óleo microbiano e/ou uma ou mais frações deste selecionadas da fração de ésteres de esterol, da fração de triglicerídeo, da fração de ácido graxo livre, da fração de esterol, da fração de diglicerídeo, da fração polar (incluindo a fração de fosfolipídeo), e combinações destas, é substancialmente livre de DPA n-6. Em algumas modalidades, o óleo microbiano e/ou uma ou mais frações deste selecionadas da fração de ésteres de esterol, da fração de triglicerídeo, da fração de ácido graxo livre, da fração de esterol, da fração de diglicerídeo, da fração polar (incluindo a fração de fosfolipídeo), e combinações destas, compreende uma proporção de peso de DHA para DPA n-6 de mais do que cerca de 6:1, de pelo menos cerca de 8:1, pelo menos cerca de 10:1, pelo menos cerca de 15:1, pelo menos cerca de 20:1, pelo menos cerca de 25:1, pelo menos cerca de 50:1 ou pelo menos cerca de 100:1. Em algumas modalidades, o óleo microbiano e/ou uma ou mais frações deste selecionadas da fração de ésteres de esterol, da fração de triglicerídeo, da fração de ácido graxo livre, da fração de esterol, da fração de diglicerídeo, da fração polar (incluindo a fração de fosfolipídeo), e combinações destas, compreende cerca de 5% ou menos, cerca de 4% ou menos, cerca de 3% ou menos, cerca de 2% ou menos, cerca de 1,5% ou menos, cerca de 1% ou menos, ou cerca de 0,5% ou menos por peso de cada um de

ácido linoléico (18:2 n-6), ácido linolênico (18:3 n-3), ácido eicosenóico (20:1 n-9) e ácido erúcico (22:1 n- 9). Em algumas modalidades, o óleo microbiano e/ou uma ou mais frações deste selecionadas da fração de ésteres de esterol, da fração de triglicerídeo, da fração de ácido graxo livre, da fração de esterol, da fração de diglicerídeo, da fração polar (incluindo a fração de fosfolipídeo), e combinações destas, compreende cerca de 5% ou menos, cerca de 4% ou menos, cerca de 3% ou menos, cerca de 2% ou menos, cerca de 1,5% ou menos, ou cerca de 1% ou menos por peso de ácido heptadecanóico (17:0). Em algumas modalidades, o óleo microbiano e/ou uma ou mais frações deste compreendem cerca de 0,01% até cerca de 5% por peso, cerca de 0,05% até cerca de 3% por peso, ou cerca de 0,1% até cerca de 1% por peso de ácido heptadecanóico.

[157] A molécula de triglicerídeo contém 3 átomos de carbono centrais ($C_{sn\text{-}1}H_2R1\text{-}C_{sn\text{-}2}H_2R2\text{-}C_{sn\text{-}3}H_2R3$), que permitem a formação de isômeros posicionais diferentes. Em algumas modalidades, o óleo microbiano compreende uma fração de triglicerídeo na qual pelo menos cerca de 20%, pelo menos cerca de 30%, pelo menos cerca de 35% ou pelo menos cerca de 40% dos triglicerídeos na fração de triglicerídeo contêm DHA em duas posições no triglicerídeo (DHA dissubstituído) selecionadas de quaisquer duas das posições *sn*-1, *sn*-2 e *sn*-3, com base no percentual da área relativa de picos em um cromatográfico de HPLC. Em algumas modalidades, o óleo microbiano compreende uma fração de triglicerídeo na qual de cerca de 20% até cerca de 40%, cerca de 20% até cerca de 35%, cerca de 30% até cerca de 40% ou cerca de 30% até cerca de 35% dos triglicerídeos na fração de triglicerídeo

contêm DHA em duas posições no triglicerídeo selecionadas de quaisquer duas das posições *sn*-1, *sn*-2 ou *sn*-3, com base no percentual da área relativa de picos em um cromatográfico de HPLC. Em algumas modalidades, o óleo microbiano compreende uma fração de triglicerídeo na qual pelo menos cerca de 5%, pelo menos cerca de 10%, pelo menos cerca de 15% ou pelo menos cerca de 20% dos triglicerídeos na fração de triglicerídeo contêm DHA em todas as posições *sn*-1, *sn*-2 e *sn*-3 (DHA trissubstituído), com base no percentual da área relativa de picos em um cromatográfico de HPLC. Em algumas modalidades, o óleo microbiano compreende uma fração de triglicerídeo na qual de cerca de 5% até cerca de 20%, cerca de 5% até cerca de 15%, cerca de 10% até cerca de 20%, ou cerca de 10% até cerca de 15% dos triglicerídeos na fração de triglicerídeo contêm DHA em todas as posições *sn*-1, *sn*-2 e *sn*-3, com base no percentual da área relativa de picos em um cromatográfico de HPLC. Em contraste, as espécies de TAG relatadas na Patente U.S. N° 6.582.941 does não contêm DHA em todas as três posições. Em algumas modalidades, o óleo microbiano compreende uma fração de triglicerídeo na qual pelo menos cerca de 50%, pelo menos cerca de 55%, pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 65%, pelo menos cerca de 70% ou pelo menos cerca de 75% dos triglicerídeos na fração de triglicerídeo contêm DHA em uma posição no triglicerídeo selecionada de qualquer uma das posições *sn*-1, *sn*-2 ou *sn*-3, com base no percentual da área relativa de picos em um cromatográfico de HPLC. Em algumas modalidades, o óleo microbiano compreende uma fração de triglicerídeo na qual de cerca de 50% até cerca de 75%, cerca de 50% até cerca de 70%, cerca

de 50% até cerca de 65%, cerca de 60% até cerca de 75%, cerca de 60% até cerca de 70% ou cerca de 60% até cerca de 65% dos triglicerídeos na fração de triglicerídeo contêm DHA em uma posição no triglicerídeo selecionada de qualquer uma das posições *sn*-1, *sn*-2 e *sn*-3, com base no percentual da área relativa de picos em um cromatográfico de HPLC.

Composições

[158] A invenção é dirigida às composições que compreendem um microorganismo da invenção, uma biomassa isolada da invenção, um óleo microbiano da invenção, ou combinações destes.

[159] Um microorganismo, biomassa ou óleo microbiano da invenção pode ainda ser modificado ou processado química ou fisicamente com base nas necessidades da composição por qualquer técnica conhecida.

[160] Células de microorganismos ou biomassas podem ser secos antes do uso em uma composição por métodos que incluem, sem limitação, secagem por congelamento, secagem ao ar, secagem por atomização, secagem em túnel, secagem a vácuo (liofilização), e um processo similar. Alternativamente, a biomassa colhida e lavada pode ser usada diretamente em uma composição sem secagem. Veja, por exemplo, as Patentes U.S. N^{os} 5.130.242 e 6.812.009, cada uma aqui incorporada por referência em sua totalidade.

[161] Os óleos microbianos da invenção podem ser usados como material de partida para produzir mais eficientemente um produto enriquecido em um ácido graxo como, por exemplo, EPA. Por exemplo, os óleos microbianos da invenção podem ser submetidos a várias metodologias de purificação conhecidas na técnica, por exemplo, destilação

ou adução de uréia, para produzir um produto com potência maior com concentrações maiores de EPA ou de outro ácido graxo. Os óleos microbianos da invenção também podem ser usados em reações químicas para produzir compostos derivados de ácidos graxos nos óleos, por exemplo, ésteres e sais de EPA ou de outro ácido graxo.

[162] Uma composição da invenção pode incluir um ou mais excipientes. Como aqui usado, "excipiente" se refere a um componente, ou mistura de componentes, que é usado em uma composição da presente invenção para dar características desejáveis à composição, incluindo alimentos, bem como composições farmacêuticas, cosméticas e industriais. Um excipiente da presente invenção pode ser descrito como um excipiente "farmaceuticamente aceitável" quando adicionado a uma composição farmacêutica, o que significa que o excipiente é um composto, material, composição, sal e/ou forma de dosagem que é, dentro dos critérios de uma avaliação médica sólida, adequado ao contato com tecidos de seres humanos e animais não humanos sem toxicidade excessiva, irritação, resposta alérgica ou outras complicações problemáticas ao longo da duração desejada de contato compatível com uma proporção risco/benefício razoável. Em algumas modalidades, o termo "farmaceuticamente aceitável" significa aprovado por um órgão regulador do governo federal ou estadual ou listado na "U.S. Pharmacopeia" ou em outra farmacopéia internacional geralmente reconhecida para uso em animais e, mais particularmente, em humanos. Vários excipientes podem ser usados. Em algumas modalidades, o excipiente pode ser, sem limitação, um agente alcalino, um estabilizante, um

antioxidante, um agente de adesão, um agente de separação, um agente de revestimento, um componente de fase exterior, um componente de liberação controlada, um solvente, um tensoativo, um umectante, um agente de tamponamento, um enchimento, um emoliente, ou combinações destes. Excipientes além daqueles aqui discutidos podem incluir excipientes listados em, embora sem limitação, "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", 21ª Edição (2005). A inclusão de um excipiente em uma classificação particular aqui apresentada (por exemplo, "solvente") visa ilustrar, e não limitar, o papel do excipiente. Um excipiente particular pode se enquadrar em múltiplas classificações.

[163] As composições da invenção incluem, sem limitação, produtos alimentícios, composições farmacêuticas, cosméticos e composições industriais.

[164] Em algumas modalidades, a composição é um produto alimentício. Um produto alimentício é qualquer alimento para consumo por animal não humano ou humano, e inclui composições tanto sólidas quanto líquidas. Um produto alimentício pode ser um aditivo para alimentos animais ou humanos. Alimentos incluem, sem limitação, alimentos comuns; produtos líquidos, incluindo leites, bebidas, bebidas terapêuticas e bebidas nutricionais; alimentos funcionais; suplementos; nutracêuticos; fórmulas infantis, incluindo fórmulas para bebês prematuros; alimentos para mulheres grávidas ou em amamentação; alimentos para adultos; alimentos geriátricos; e alimentos para animais.

[165] Em algumas modalidades, um microorganismo, biomassa ou óleo microbiano da invenção pode ser usado

diretamente ou incluído como um aditivo dentro de um ou mais de: um óleo, gordura vegetal hidrogenada, pasta, outro ingrediente gorduroso, bebida, molho, alimento a base de laticínios ou de soja (por exemplo, leite, iogurte, queijo e sorvete), um produto assado, um produto nutricional, por exemplo, como um suplemento nutricional (em forma de cápsula ou comprimido), um suplemento vitamínico, um suplemento dietético, uma bebida em pó e um produto alimentício em pó acabado ou semi-acabado. Em algumas modalidades, o suplemento nutricional está na forma de uma cápsula vegetariana que não é formada por e não contém quaisquer componentes de uma fonte animal.

[166] Uma lista parcial de composições alimentícias que podem incluir um óleo microbiano da invenção inclui, sem limitação, produtos à base de soja (leites, sorvetes, iogurtes, bebidas, cremes, pastas, branqueadores); sopas e mistura para sopa; massas, massas de farinha com ovos e leite e itens alimentícios cozidos incluindo, por exemplo, produtos para confeitaria fina, cereais para o café da manhã, bolos, *cheesecakes*, tortas, bolinhos, biscoitos, barras, pães, brioches, biscuits, bolinhos redondos, artigos de confeitaria, *scones*, *croutons*, bolachas, doces, bolinhos para aperitivos, tortas, barras de granola/refeição e artigos tostados de confeitaria; balas; confeitos duros; chocolate e outros confeitos; goma de mascar; produtos alimentícios líquidos, por exemplo, leites, bebidas energéticas, fórmula infantil, bebidas carbonadas, chás, refeições líquidas, sucos de fruta, bebidas à base de frutas, bebidas à base de vegetais; xaropes multivitamínicos, substituintes de refeições,

alimentos e xaropes medicinais; misturas de bebida em pó; pasta; produtos processados de peixe; produtos processados de carne; produtos processados de aves; caldos e molhos; condimentos (ketchup, maionese etc.); pastas à base de óleo vegetal; laticínios; iogurte; manteigas; laticínios congelados; sorvetes; sobremesas congeladas; iogurtes congelados; produtos alimentícios semi-sólidos como, por exemplo, alimento infantil; pudins e sobremesas de gelatina; queijo processado e não processado; misturas par panqueca; barras alimentícias incluindo barras energéticas; misturas para *waffle*; molhos para saladas; misturas substitutas de ovos; pastas de nozes e à base de nozes; aperitivos salgados como, por exemplo, batatas fritas e outros chips ou salgadinhos crocantes, chips de milho, chips de tortilha, aperitivos extrusados, pipoca, pretzels, *crisps* de batata e nozes; e aperitivos especiais como, por exemplo, molhos, aperitivos de frutas secas, aperitivos de carne, torresmos, barras alimentícias saudáveis e bolos de arroz/milho.

[167] Em algumas modalidades, um óleo microbiano da invenção pode ser usado para suplementar uma fórmula infantil. Uma fórmula infantil pode ser suplementada com um óleo microbiano da invenção isoladamente ou em combinação com um óleo fisicamente refinado derivado de um microorganismo produtor de ácido araquidônico (ARA). Um microorganismo produtor de ARA, por exemplo, é *Mortierella alpina* ou *Mortierella* sect, *schmuckeri*. Alternativamente, fórmulas infantis podem ser suplementadas com um óleo microbiano da invenção in combinação com um óleo rico em ARA, incluindo ARASCO® (Martek Biosciences, Columbia, MD).

[168] Em algumas modalidades, a composição é uma ração animal. Um "animal" inclui organismos não humanos que pertencem ao reino Animalia, e inclui, sem limitação, animais aquáticos e animais terrestres. O termo "ração animal" ou "alimento animal" se refere a qualquer alimento destinado a animais não humanos, por exemplo, peixe; peixe comercial; peixe ornamental; larvas de peixe; bivalves; moluscos; crustáceos; marisco; camarão; camarão larval; artêmia; rotíferos; camarão de água salgada; coletores-filtradores; anfíbios; répteis; mamíferos; animais domésticos; animais de criação; animais de zoológico; animais de esportes; animais reprodutores; animais de corrida; animais de espetáculos; animais de patrimônio; animais raros ou em risco de extinção; animais de companhia; animais de estimação como, por exemplo, cães, gatos, porquinhos-da-índia, coelhos, ratos, camundongos ou cavalos; primatas como, por exemplo, macacos (por exemplo, micos, Rhesus, verde africano, patas, Cynomolgus e Cercopithecus), símios, orangotangos, babuínos, gibões e chimpanzés; canídeos como, por exemplo, cães e lobos; felídeos como, por exemplo, gatos, leões e tigres; eqüídeos como, por exemplo, cavalos, asnos e zebras; animais para alimentação como, por exemplo, vacas, gado, porcos e carneiros; ungulados como, por exemplo, veados e girafas; ou roedores como, por exemplo, camundongos, ratos, hamsters e porquinhos-da-índia; e assim por diante. Uma ração animal inclui, sem limitação, uma ração para aqüicultura, uma ração para animal doméstico, incluindo ração para animal de estimação, uma ração para animal de zoológico, uma ração para animal de trabalho, uma ração para animal de criação,

e combinações destas.

[169] Em algumas modalidades, a composição é uma ração ou suplemento de ração para qualquer animal cuja carne ou produtos sejam consumidos por humanos, por exemplo, qualquer animal do qual a carne, ovos ou leite seja derivada para consumo humano. Quando dada a esses animais, nutrientes como, por exemplo, LC-PUFAs, podem ser incorporados na carne, leite, ovos ou outros produtos desses animais para aumentar seu teor desses nutrientes.

[170] Em algumas modalidades, a composição é um material atomizado que pode ser esfarelado para formar partículas de um tamanho apropriado para consumo por zooplânctons, artêmias, rotíferos e coletores-filtradores. Em algumas modalidades, os zooplânctons, artêmias ou rotíferos alimentados pela composição servem, por sua vez, de alimento para larvas de peixe, peixes, mariscos, bivalves ou crustáceos.

[171] Em algumas modalidades, a composição é uma composição farmacêutica. Composições farmacêuticas adequadas incluem, sem limitação, uma composição antiinflamatória, um fármaco para o tratamento de doença cardíaca coronariana, um fármaco para o tratamento de arteriosclerose, um agente quimioterápico, um excipiente ativo, um fármaco para osteoporose, um antidepressivo, um anticonvulsivante, um fármaco anti-*Helicobacter pilori*, um fármaco para o tratamento de doença neurodegenerativa, um fármaco para o tratamento de doença hepática degenerativa, um antibiótico, uma composição para redução do colesterol e uma composição para redução do triacilglicerol. Em algumas modalidades, a composição é um alimento médico. Um alimento

médico inclui um alimento que está em uma composição a ser consumida ou administrada externamente sob a supervisão de um médico e que se destina ao gerenciamento dietético específico de uma condição, para a qual necessidades nutricionais distintas, com base em princípios científicos reconhecidos, são estabelecidas por avaliação médica.

[172] Em algumas modalidades, o óleo microbiano pode ser formulado em uma forma de dosagem. Formas de dosagem podem incluir, sem limitação, comprimidos, cápsulas, sinetes, péletes, pílulas, pós e grânulos, e formas de dosagem parenterais, que incluem, sem limitação, soluções, suspensões, emulsões, e pós secos que compreendem uma quantidade eficaz do óleo microbiano. Sabe-se também na técnica que essas formulações também podem conter diluentes farmaceuticamente aceitáveis, enchimentos, desintegrantes, aglutinantes, lubrificantes, tensoativos, veículos hidrofóbicos, veículos hidrossolúveis, emulsificantes, tampões, umectantes, hidratantes, solubilizantes, conservantes e semelhantes. As formas de administração podem incluir, sem limitação, comprimidos, drágeas, cápsulas, pastilhas e pílulas, que contêm o óleo microbiano e um ou mais veículos farmaceuticamente aceitáveis adequados.

[173] Para administração oral, o óleo microbiano pode ser combinado com veículos farmaceuticamente aceitáveis bem conhecidos na técnica. Esses veículos permitem que os óleos microbianos da invenção sejam formulados como comprimidos, pílulas, drágeas, cápsulas, líquidos, géis, xaropes, caldos, suspensões e semelhantes, para ingestão oral por um indivíduo a ser tratado. Em algumas modalidades, a forma de

dosagem é um comprimido, pílula ou pastilha. Preparações farmacêuticas para uso oral podem ser obtidas por adição de um excipiente sólido, opcionalmente trituração da mistura resultante e processamento da mistura de grânulos, após adição de auxiliares adequados, se desejado, para obter comprimidos ou núcleos de drágeas. Excipientes adequados incluem, sem limitação, enchimentos como, por exemplo, açúcares, incluindo, sem limitação, lactose, sacarose, manitol e sorbitol; preparações de celulose como, por exemplo, sem limitação, amido de milho, amido de trigo, amido de arroz, amido de batata, gelatina, goma tragacanto, metil celulose, hidroxipropilmetil celulose, carboximetil celulose sódica e polivinilpirrolidona (PVP). Se desejado, agentes desintegrantes podem ser adicionados como, por exemplo, sem limitação, a polivinilpirrolidona reticulada, ágar ou ácido algínico ou um sal deste como, por exemplo, alginato de sódio. Preparações farmacêuticas que podem ser usadas oralmente incluem, sem limitação, cápsulas *push-fit* feitas de gelatina, bem como cápsulas lacradas macias feitas de gelatina e um plastificante, por exemplo, glicerol ou sorbitol. Em algumas modalidades, a forma de dosagem é uma forma de dosagem vegetariana, em que a forma de dosagem não é formada por e não contém nenhum componente de uma fonte animal. Em algumas modalidades, a forma de dosagem vegetariana é uma cápsula vegetariana.

[174] Em algumas modalidades, a composição é um cosmético. Cosméticos incluem, sem limitação, emulsões, cremes, loções, máscaras, sabonetes, shampoos, lavagens, cremes faciais, condicionadores, maquiagens, agentes de banho e líquidos de dispersão. Agentes cosméticos podem ser

medicinais ou não medicinais.

[175] Em algumas modalidades, a composição é uma composição industrial. Em algumas modalidades, a composição é um material de partida para uma ou mais manufaturas. Uma manufatura inclui, sem limitação, um polímero, um material fotográfico fotossensível; um detergente; um óleo industrial; ou um detergente industrial. Por exemplo, a Patente U.S. N° 7.259.006 descreve uso de gordura e óleo contendo DHA para produção de ácido behênico e produção de materiais fotográficos sensíveis que utilizam ácido behênico.

Métodos de utilização das composições

[176] Em algumas modalidades, as composições podem ser usadas no tratamento de uma condição em humanos ou animais não humanos. Em algumas modalidades, as composições podem ser usadas para nutrição em humanos ou animais não humanos.

[177] Os termos "tratar" e "tratamento" se referem tanto ao tratamento terapêutico quanto às medidas profiláticas ou preventivas, em que o objetivo é evitar ou tornar mais lenta (reduzir) uma condição, doença ou distúrbio fisiológico indesejado, ou para obter resultados clínicos benéficos ou desejados. Para os objetivos dessa invenção, resultados clínicos benéficos ou desejados incluem, sem limitação, alívio ou eliminação dos sintomas ou sinais associados a uma condição, doença ou distúrbio; diminuição da extensão de uma condição, doença ou distúrbio; estabilização de uma condição, doença ou distúrbio, (ou seja, em que a condição, doença ou distúrbio não esteja piorando); retardo no surgimento ou progressão da condição, doença ou distúrbio; melhora da condição,

doença ou distúrbio; remissão (seja ela parcial ou total e seja ela detectável ou indetectável) da condição, doença ou distúrbio; ou melhora de uma condição, doença ou distúrbio. O tratamento inclui desenvolver uma resposta clinicamente significante sem efeitos colaterais excessivos. O tratamento também inclui o prolongamento da sobrevida, quando comparada com a sobrevida esperada caso não receba tratamento.

[178] Em algumas modalidades, a composição é usada para tratar uma condição, doença ou distúrbio como, por exemplo, acne, inflamação aguda, maculopatia relacionada à idade, alergia, doença de Alzheimer, artrite, asma, aterosclerose, doença autoimune, distúrbio de lipídeos sangüíneos, cistos da mama, caquexia, câncer, reestenose cardíaca, doenças cardiovasculares, inflamação crônica, doença cardíaca coronariana, fibrose cística, distúrbio degenerativo do fígado, diabetes, eczema, distúrbio gastrointestinal, doença cardíaca, níveis elevados de triacilglicerol, hipertensão, hiperatividade, doenças imunológicas, inibição de crescimento tumoral, condições inflamatórias, distúrbios intestinais, disfunção renal, leucemia, depressão maior, esclerose múltipla, distúrbio neurodegenerativo, osteoartrite, osteoporose, distúrbio do peroxissomo, pré-eclâmpsia, parto prematuro, psoríase, distúrbio pulmonar, artrite reumatóide, risco de doença cardíaca ou trombose.

[179] Em algumas modalidades, a composição é usada para aumentar a duração da gestação de um feto no terceiro trimestre.

[180] Em algumas modalidades, a composição é usada

para controlar a pressão arterial.

[181] Em algumas modalidades, a composição é usada para melhorar ou manter a função cognitiva.

[182] Em algumas modalidades, a composição é usada para melhorar ou manter a memória.

[183] A composição ou forma de dosagem pode ser administrada no corpo de um indivíduo por qualquer via compatível com a composição ou forma de dosagem. Uma substância é considerada como sendo "administrada" se a substância é introduzida no corpo do indivíduo pelo indivíduo, ou se outra pessoa, uma máquina ou um dispositivo introduz a substância no corpo do indivíduo. "Administração", portanto, inclui, por exemplo, auto-administração, administração por outros e administração indireta. O termo "contínua" ou "consecutiva", como aqui usado, em referência à "administração", significa que a freqüência de administração é pelo menos uma vez ao dia. Observe, no entanto, que a freqüência de administração pode ser mais do que uma vez ao dia e ainda ser "contínua" ou "consecutiva", por exemplo, duas vezes ou até mesmo três vezes ao dia, desde que os níveis de dosagem como aqui especificados não sejam excedidos. Os meios e métodos para administração são conhecidos na técnica e um profissional pode consultar várias referências farmacológicas para obter diretrizes. Por exemplo, "Modern Pharmaceutics", Banker & Rhodes, Informa Healthcare, USA, 4ª Edição (2002); e "Goodman & Gilman's The Pharmaceutical Basis of Therapeutics", McGraw-Hill Companies, Inc., Nova York, 10ª Edição (2001), podem ser consultados.

[184] O termo "pessoa", "indivíduo" ou "paciente"

significa qualquer indivíduo, seja ele humano ou não humano, para o qual o diagnóstico, prognóstico, terapia ou administração da composição ou forma de dosagem é desejado. Indivíduos mamíferos incluem, sem limitação, humanos; animais domésticos; animais de criação; animais de zoológico; animais de esportes; animais de estimação como, por exemplo, cães, gatos, porquinhos-da-índia, coelhos, ratos, camundongos ou cavalos; primatas como, por exemplo, macacos (por exemplo, micos, Rhesus, verde africano, patas, Cynomolgus, e Cercopithecus), símios, orangotangos, babuínos, gibões e chimpanzés; canídeos como, por exemplo, cães e lobos; felídeos como, por exemplo, gatos, leões e tigres; eqüídeos como, por exemplo, cavalos, asnos e zebras; animais para alimentação como, por exemplo, vacas, gado, porcos e carneiros; ungulados como, por exemplo, veados e girafas; roedores como, por exemplo, camundongos, ratos, hamsters e porquinhos-da-índia; e assim por diante. O termo "indivíduo" também engloba animais de modelo, por exemplo, animais de modelo de doença. Em algumas modalidades, o termo "indivíduo" inclui animais valiosos, economicamente ou de alguma outra forma, por exemplo, animais reprodutores economicamente importantes, animais de corrida, animais de espetáculos, animais de patrimônio, animais raros ou em risco de extinção ou animais de companhia. Em certas modalidades, o indivíduo é um indivíduo humano. Em certas modalidades, o indivíduo é um indivíduo não humano.

[185] A composição pode ser administrada como uma "quantidade nutricional", "quantidade terapeuticamente eficaz", uma "quantidade profilaticamente eficaz", uma

"dose terapêutica" ou uma "dose profilática". Uma "quantidade nutricional" se refere a uma quantidade eficaz, em dosagens e por períodos de tempo necessários, para obter um resultado nutricional desejado. Um resultado nutricional pode ser, por exemplo, níveis aumentados de um componente de ácido graxo desejável em um indivíduo. Uma "quantidade terapeuticamente eficaz" ou "dose terapêutica" se refere a uma quantidade eficaz, em dosagens e por períodos de tempo necessários, para obter um resultado terapêutico desejado. Um resultado terapêutico pode ser, por exemplo, redução de sintomas, sobrevida prolongada, mobilidade aumentada, e semelhantes. Um resultado terapêutico não precisa ser uma "cura". Uma "quantidade profilaticamente eficaz" ou "dose profilática" se refere a uma quantidade eficaz, em dosagens e por períodos de tempo necessários, para obter o resultado profilático desejado. Tipicamente, na medida em que uma dose profilática seja usada em indivíduos antes ou em um estágio inicial de doença, uma quantidade profilaticamente eficaz será menor do que uma quantidade terapeuticamente eficaz para o tratamento de um estágio avançado de doença.

[186] Várias quantidades de dosagem da composição, forma de dosagem ou composição farmacêutica podem ser administradas a um indivíduo, com base na quantidade de EPA ou de outro componente de ácido graxo do microorganismo, biomassa ou óleo microbiano a ser administrada ao indivíduo. Os termos "dosagem diária", "nível de dosagem diária" e "quantidade de dosagem diária" se referem aqui à quantidade total de EPA ou de outro componente de ácido graxo administrada por dia (por período de 24 horas). Dessa forma, por exemplo, a administração de EPA a um indivíduo

em uma dosagem diária de 2 mg significa que o indivíduo recebe um total de 2 mg de EPA diariamente, seja o EPA administrada como uma forma de dosagem única que compreende 2 mg de EPA ou, alternativamente, quatro formas de dosagem que compreendem 0,5 mg de EPA cada (para um total de 2 mg de EPA). Em algumas modalidades, a quantidade diária de EPA é administrada em uma forma de dosagem única, ou em duas formas de dosagem. As formas de dosagem da presente invenção podem ser tomadas em uma aplicação única ou em múltiplas aplicações. Por exemplo, se quatro comprimidos são tomados diariamente, cada comprimido compreendendo 0,5 mg de EPA, então todos os quatro comprimidos serão tomados uma vez ao dia, ou 2 comprimidos podem ser tomados duas vezes ao dia, ou 1 comprimido pode ser tomado a cada 6 horas. Em algumas modalidades, a dosagem diária é de cerca de 100 mg até cerca de 15 g de EPA. Em algumas modalidades, a dosagem diária é de cerca de 0,5 mg até cerca de 250 mg, cerca de 100 mg até cerca de 250 mg, cerca de 100 mg até cerca de 500 mg, cerca de 100 mg até cerca de 1 g, cerca de 1 g até cerca de 2,5 g, cerca de 1 g até cerca de 5 g, cerca de 1 g até cerca de 10 g, cerca de 1 g até cerca de 15 g, cerca de 5 g até cerca de 10 g, cerca de 5 g até cerca de 15 g, cerca de 10 g até cerca de 15 g, cerca de 100 mg até cerca de 10 g, cerca de 100 mg até cerca de 5 g, ou cerca de 100 mg até cerca de 2,5 g de EPA, DHA, ou uma combinação destes. Em algumas modalidades, a composição é uma forma de dosagem que compreende cerca de 0,5 mg até cerca de 250 mg, 100 mg até cerca de 250 mg, cerca de 0,5 mg até cerca de 500 mg, cerca de 100 mg até cerca de 500 mg, cerca de 0,5 mg até cerca de 1 g, ou cerca de 100 mg

até cerca de 1 g de EPA, DHA, ou uma combinação destes por forma de dosagem.

[187] A administração das composições ou formas de dosagem da presente invenção pode ser obtida usando vários regimes. Por exemplo, em algumas modalidades, a administração ocorre diariamente em dias consecutivos ou, alternativamente, ocorre em dias alternados (a cada dois dias). A administração pode ocorrer em um ou mais dias.

[188] A administração das composições e formas de dosagem pode ser combinada com outros regimes usados para o tratamento da condição. Por exemplo, o método da presente invenção pode ser combinado com regimes dietéticos (por exemplo, dietas com pouco carboidrato, dietas ricas em proteína, dietas ricas em fibras etc.), regimes de exercícios, regimes de perda de peso, regimes de cessação do tabagismo, ou combinações destes. O método da presente invenção também pode ser usado em combinação com outros produtos farmacêuticos no tratamento da condição. As composições ou formas de dosagem da presente invenção podem ser administradas antes ou depois de outros regimes ou produtos farmacêuticos.

Kits que compreendem as composições

[189] A invenção é ainda dirigida a kits ou embalagens que contêm uma ou mais unidades de uma composição da invenção. Kits ou embalagens podem incluir unidades de um produto alimentício, composição farmacêutica, cosmético ou composição industrial que compreende o microorganismo isolado, biomassa ou óleo microbiano da invenção, ou combinações destes. Kits ou embalagens também podem incluir um aditivo que compreende o microorganismo isolado,

biomassa ou óleo microbiano da invenção, ou combinações destes, para preparação de um alimento, cosmético, composição farmacêutica ou composição industrial.

[190] Em algumas modalidades, o kit ou embalagem contém uma ou mais unidades de uma composição farmacêutica a ser administrada de acordo com os métodos da presente invenção. O kit ou embalagem pode conter uma unidade de dosagem, ou mais de uma unidade de dosagem (ou seja, múltiplas unidades de dosagem). Se múltiplas unidades de dosagem estão presentes no kit ou embalagem, as múltiplas unidades de dosagem podem ser opcionalmente dispostas para administração seqüencial.

[191] Os kits da presente invenção podem opcionalmente conter instruções associadas às unidades ou formas de dosagem dos kits. Essas instruções podem estar em uma forma prescrita por um órgão governamental que regula a fabricação, uso ou venda de produtos farmacêuticos, cujo alerta reflete a aprovação pelo órgão da fabricação, uso ou venda para administração humana para tratar uma condição ou distúrbio. As instruções podem estar em qualquer forma que forneça informações sobre o uso das unidades ou formas de dosagem no kit de acordo com os métodos da invenção. Por exemplo, as instruções podem estar na forma de material impresso, ou na forma de um dispositivo de meios pré-gravados.

[192] Na evolução do exame de um paciente, um profissional médico pode determinar que a administração de um dos métodos da presente invenção é adequada ao paciente, ou o médico pode determinar que a condição do paciente pode ser melhorada pela administração de um dos métodos da

presente invenção. Antes de prescrever qualquer regime, o médico pode aconselhar o paciente, por exemplo, sobre os vários riscos e benefícios associados ao regime. O paciente pode receber informações totais sobre todos os riscos conhecidos e suspeitos associados ao regime. Esse aconselhamento pode ser fornecido verbalmente, bem como em forma escrita. Em algumas modalidades, o médico pode fornecer ao paciente materiais de literatura sobre o regime, por exemplo, informações sobre o produto, materiais educativos, e semelhantes.

[193] A presente invenção é dirigida aos métodos de educação de consumidores sobre os métodos de tratamento, o método compreendendo a distribuição das formas de dosagem com informação ao consumidor em um ponto de venda. Em algumas modalidades, a distribuição ocorrerá em um ponto de venda que possui um farmacêutico ou profissional de saúde.

[194] O termo "informação ao consumidor" pode incluir, sem limitação, um texto em inglês, um texto em um idioma diferente de inglês, imagem visual, tabelas, gravação telefônica, página da Internet e acesso a um representante do atendimento ao consumidor. Em algumas modalidades, a informação ao consumidor fornecerá instruções para uso das formas de dosagem de acordo com os métodos da presente invenção, idades de uso apropriadas, indicações, contra-indicações, dosagem apropriadas, avisos, número de telefone e endereço da Internet. Em algumas modalidades, o método ainda compreende o fornecimento de informações profissionais para pessoas relevantes em condição de responder às questões do consumidor em relação ao uso dos regimes revelados de acordo com os métodos da presente

invenção. O termo "informação profissional" inclui, sem limitação, informação em relação ao regime quando administrado de acordo com os métodos da presente invenção que é projetado para permitir que um profissional médico responda às questões do consumidor. Um "profissional médico" inclui, por exemplo, um médico, assistente médico, enfermeira, farmacêutico e representante do serviço ao consumidor.

[195] Após essa invenção ter sido geralmente descrita, uma compreensão adicional pode ser obtida por referência aos exemplos aqui fornecidos. Esses exemplos têm finalidade apenas ilustrativa, e não visam ser limitantes.

Exemplo 1

[196] Nesse exemplo, *Schizochytrium sp.* foi cultivado em frascos de Erlenmeyer agitados de 250 ml contendo 50 ml de meio de cultura. Um inóculo foi preparado no mesmo meio que consistia em 0,625 g de NaCl, 1,0 g de KCl, 5 g de $MgSO_4.7H_2O$, 0,1 g de $(NH_4)_2SO_4$, 0,29 g de $CaCl_2.2H_2O$, 1,0 g de monoidrato de glutamato monossódico, 1,0 g de extrato de levedura e 23,8 g de tampão HEPES dissolvidos em aproximadamente 900 ml de água destilada. O meio foi levado até o pH 7 usando NaOH. O volume final do meio foi levado até 896 ml, e o meio foi esterilizado por autoclavagem. Após autoclavagem, os seguintes componentes foram adicionados de forma estéril ao meio: 0,89 ml de 56,5 g/l de KH_2PO_4, 100 ml de 500 g/l de glicose, 2 ml de solução de estoque de metal-traço e 1 ml de solução de estoque de vitamina. A solução de estoque de metal-traço continha o seguinte: 90 g de ácido cítrico, 5,15 g de $FeSO_4.7H_2O$, 1,55 g de $MnCl_2.4H_2O$, 0,965 g de $ZnSO_4.7H_2O$, 0,02 g de $CoCl_2.6H_2O$,

0,02 g de $Na_2MoO_4.2H_2O$, 1,035 g de $CuSO_4.5H_2O$, 1,035 g de $NiSO_4.6H_2O$ dissolvidos em um litro de água destilada e pH levado até 2.5 com HCl. A solução de estoque de vitamina continha o seguinte: 0,16 g de vitamina B12, 9,75 g de tiamina e 3,33 g de pantotenato de cálcio dissolvidos em um litro de água destilada. Os frascos agitados foram inoculados com 1 ml de inóculo. Frascos em triplicata foram colocados em uma incubadora de CO_2 ajustada para manter uma atmosfera de 5, 10 ou 1% de CO_2 no ar. Outro conjunto de frascos em triplicata foi colocado em uma incubadora em níveis ambientes de CO_2. Todos os conjuntos de frascos foram agitados a 200 rpm e todas as incubadoras ajustadas em 22,5°C. Após sete dias de crescimento, a biomassa foi coletada dos frascos agitados por centrifugação, a biomassa foi seca por congelamento e o perfil de ácido graxo da biomassa foi determinado usando procedimentos padronizados de metil esterificação. Níveis elevados de CO_2 produziram alterações significantes na biomassa, no % de gordura e nos perfis de ácido graxo. Foi notável a alteração produzida nos valores de % de EPA e % de DHA entre condições de CO_2 e condições ambientes. Além disso, as alterações nesses ácidos graxos se tornava mais pronunciadas à medida que o nível de CO_2 aumentava. Os resultados são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4

AMOSTRA	Biomassa (g/l)	% de 16:0	% de EPA	% de DHA	% de gordura
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

15% de CO_2 (1)	2,96	28,41	26,12	29,52	53,31
15% de CO_2 (2)	2,94	28,13	26,20	29,98	55,46
15% de CO_2 (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
10% de CO_2 (1)	4,91	33,35	12,94	41,13	69,98
10% de CO_2 (2)	5,03	33,28	12,99	41,15	, 69,58
10% de CO_2 (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
5% de CO_2 (1)	4,18	32,03	5,59	40,55	42,89
5% de CO_2 (2)	4,16	31,87	5,85	40,36	43,47
5% de CO_2 (3)	4,14	31,58	6,13	40,43	44,13

Exemplo 2

[197] Nesse exemplo, *Schizochytrium sp.* foi cultivado em frascos de Erlenmeyer agitados de 250 ml contendo 50 ml de meio de cultura. Um inóculo foi preparado no mesmo meio que consistia em 0,625 g de NaCl, 1,0 g de KCl, 5 g de $MgSO_4.7H_2O$, 0,1 g de $(NH_4)_2SO_4$, 0,29 g de $CaCl_2.2H_2O$, 1,0 g de monoidrato de glutamato monossódico, 1,0 g de extrato de levedura e 23,8 g de tampão HEPES dissolvidos em aproximadamente 900 ml de água destilada. O meio foi levado até o pH 7 usando NaOH. O volume final do meio foi levado até 896 ml, e o meio foi esterilizado por autoclavagem. Após autoclavagem, os seguintes componentes foram adicionados de forma estéril ao meio: 0,89 ml de 56,5 g/l de KH_2PO_4, 100 ml de 500 g/l de glicose, 2 ml de solução de estoque de metal-traço e 1 ml de solução de estoque de

vitamina. A solução de estoque de metal-traço continha o seguinte: 90 g de ácido cítrico, 5,15 g de $FeSO_4.7H_2O$, 1,55 g de $MnCl_2.4H_2O$, 0,965 g de $ZnSO_4.7H_2O$, 0,02 g de $CoCl_2.6H_2O$, 0,02 g de $Na_2MoO_4.2H_2O$, 1,035 g de $CuSO_4.5H_2O$, 1,035 g de $NiSO_4.6H_2O$ dissolvidos em um litro de água destilada e pH levado até 2,5 com HCl. A solução de estoque de vitamina continha o seguinte: 0,16 g de vitamina B12, 9,75 g de tiamina e 3,33 g de pantotenato de cálcio dissolvidos em um litro de água destilada. Os frascos agitados foram inoculados com 1 ml de inóculo. Frascos em duplicata foram colocados em uma incubadora de CO_2 ajustada para manter uma atmosfera de 5, 10 ou 15% de CO_2 no ar. Outro conjunto de frascos em duplicata foi colocado em uma incubadora em níveis ambientes de CO_2. Todos os conjuntos de frascos foram agitados a 200 rpm e todas as incubadoras ajustadas em 22,5°C. Após sete dias de crescimento, a biomassa foi coletada dos frascos agitados por centrifugação, a biomassa foi seca por congelamento e o perfil de ácido graxo da biomassa foi determinado usando procedimentos padronizados de metil esterificação. Níveis elevados de CO_2 produziram alterações significantes na biomassa, no % de gordura e nos perfis de ácido graxo. Foi notável a alteração produzida nos valores de % de EPA e % de DHA entre condições de CO_2 e condições ambientes. Além disso, as alterações nesses ácidos graxos se tornava mais pronunciadas à medida que o nível de CO_2 aumentava. Os resultados são fornecidos na Tabela 5 abaixo.

Tabela 5

AMOSTRA	Biomassa (g/l)	% de 16:0	% de EPA	% de DHA	% de gordura

Ambiente (1)	5,81	28,22	3,88	58,69	60,86
Ambiente (2)	6,03	26,54	3,89	60,87	66,74
15% de CO_2 (1)	4,38	14,67	36,12	35,84	62,44
15% de CO_2 (2)	4,44	14,31	36,09	36,59	63,00
10% de CO_2 (1)	5,36	21,44	19,88	46,40	64,94
10% de CO_2 (2)	5,63	21,39	19,88	46,74	65,82
5% de CO_2 (1)	6,40	24,71	11,56	54,04	77,16
5% de CO_2 (2)	6,33	24,62	11,74	54,36	67,94

Exemplo 3

[198] Nesse exemplo, *Thraustochytrium sp.* foi cultivado em frascos de Erlenmeyer agitados de 250 ml contendo 50 ml de meio de cultura. Um inóculo foi preparado no mesmo meio que consistia em 42 g de Na_2SO_4, 0,625 g de NaCl, 1,0 g de KCl, 5 g de $MgSO_4.7H_2O$, 0,1 g de $(NH_4)_2SO_4$, 0,29 g de $CaCl_2.2H_2O$, 1,0 g de monoidrato de glutamato monossódico, 1,0 g de extrato de levedura e 23,8 g de tampão HEPES dissolvidos em aproximadamente 900 ml de água destilada. O meio foi levado até o pH 7 usando NaOH. O volume final do meio foi levado até 961 ml, e o meio foi esterilizado por autoclavagem. Após autoclavagem, os seguintes componentes foram adicionados de forma estéril ao meio: 0,89 ml de 56,5 g/l de KH_2PO_4, 35 ml de 500 g/l glicerol, 2 ml de solução de estoque de metal-traço, e 1 ml de solução de estoque de vitamina. A solução de estoque de metal-traço continha o seguinte: 9 g de ácido cítrico, 5,15 g de $FeSO_4.7H_2O$, 1,55 g de $MnCl_2.4H_2O$, 0,965 g de $ZnSO_4.7H_2O$,

0,02 g de $CoCl_2$ $6H_2O$, 0,02 g de $Na_2MoO_4.2H_2O$, 1,035 g de $CuSO_4.5H_2O$, 1,035 g de $NiSO_4.6H_2O$ dissolvidos em um litro de água destilada e o pH ajustado até 2,5 com HCl. A solução de estoque de vitamina continha o seguinte: 0,16 g de vitamina B12, 9,75 g de tiamina e 3,33 g de pantotenato de cálcio dissolvidos em um litro de água destilada. Os frascos agitados foram inoculados com 1 ml de inóculo. Frascos em triplicata foram colocados em uma incubadora de CO_2 ajustada para manter uma atmosfera de 15% de CO_2 no ar. Outro conjunto de frascos em triplicata foi colocado em uma incubadora em níveis ambientes de CO_2. Ambos os conjuntos de frascos foram agitados a 200 rpm e ambas as incubadoras foram ajustadas a 22,5°C. Após sete dias de crescimento, a biomassa foi coletada dos frascos agitados por centrifugação, a biomassa foi seca por congelamento e o perfil de ácido graxo da biomassa foi determinado usando procedimentos padronizados de metil esterificação. Uma atmosfera de 15% de CO_2 no ar produziu alterações substanciais na cultura de *Thraustochytrium*. Em CO_2 elevado, a biomassa e o % de gordura foram menores do que sob condições ambientes. O %de 16:0 e o % de DHA foram menores e o % de EPA foi significativamente maior do que sob condições ambientes. Os resultados são apresentados na Tabela 6 abaixo.

Tabela 6

Atmosfera	Biomassa (g/l)	% de 16:0	% de EPA	% de DHA	% de gordura
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

15% de CO_2 (1)	2,23	22,12	36,94	19,04	38,73
15% de CO_2 (2)	2,05	21,40	37,14	18,57	39,34
15% de CO_2 (3)	2,11	21,68	36,83	18,52	40,86

Exemplo 4

[199] Nesse exemplo [NBx0614et10], espécie de *Schizochytrium* (ATCC PTA-10208), foi cultivado em quatro fermentadores de 100 litros New Brunswick Scientific BioFlo 6000 em um volume final-alvo (receita) de 80 litros com um processo de batelada alimentada de carbono (glicose) e nitrogênio (hidróxido de amônio) em várias condições pressão em excesso para avaliar a sensibilidade da cultura ao dióxido de carbono dissolvido aumentado. Cada uma das fermentações foi inoculada com 8 litros de cultura. Para propagação do inóculo, um fermentador New Brunswick Scientific BioFlo 5000 de 80 litros foi utilizado. O meio do inóculo consistiu em 65 litros de meio preparados em seis grupos separados. O Grupo 1 consistia em 585 g de MSG.1H_2O, 65 g de KCl, 325 g de $MgSO_4.7H_2O$, 24,05 g de $(NH_4)_2SO_4$, 40,625 g de NaCl, 390 g de T154 (extrato de levedura) e 13 ml de Dow 1520US (antiespuma). O Grupo 1 foi esterilizado em batelada a 121 graus no fermentador de inóculo em um volume de aproximadamente 60 litros. O Grupo 2 consistia em 18,85 g de $CaCl_2.2H_2O$. O Grupo 3 consistia em 33,8 g de KH_2PO_4. Cada um dos Grupos 2 e 3 foi autoclavado em soluções separadas por aproximadamente 45-60 minutos e adicionado ao Grupo 1 assepticamente pós-esterilização. O Grupo 4 consistia em 201,5 mg de $MnCl_2.4H_2O$, 201,5 mg de $ZnSO_4.7H_2O$, 2,6 mg de $CoCl_2.6H_2O$, 2,6 mg de $Na_2MoO_4.2H_2O$, 134,6 mg de $CuSO_4.5H_2O$, 134,6 mg de $NiSO_4.6H_2O$, 669,4 mg de $FeSO_4.7H_2O$ e 1,522 g de ácido

cítrico. O Grupo 4 foi autoclavado da mesma forma que os Grupos 2 e 3. O Grupo 5 consistia em 633,75 mg de tiamina-HCl, 10,4 mg de vitamina B12 e 216,5 mg de sal hemicálcico de ácido pantotênico. O Grupo 5 foi dissolvido em água tratada por osmose reversa e depois esterilizado por filtro. O Grupo 6 consistia em 3.250 g de glicose dissolvidos em um volume de 3.000 ml de água tratada por osmose reversa (*RO water*). Após o fermentador de inóculo ter sido resfriado até 22,5 graus Celsius, Os Grupos 2, 3, 4, 5 e 6 foram adicionados ao fermentador. Usando hidróxido de sódio e ácido sulfúrico, o fermentador teve o pH ajustado até 7 e o oxigênio dissolvido foi aumentado para 100% antes da inoculação. O fermentador de inóculo foi inoculado com 1.300 ml de uma cultura de fermentação menor (a cultura de fermentação menor foi preparada e cultivada da mesma forma que a cultura de inóculo de 65 litros) e cultivada a 22,5 graus Celsius, pH 7, agitação a 180 rpm e 32,5 l/min de ar por um período de 37 horas, quando então 8 litros de caldo de inóculo foram transferidos para cada fermentador de 100 litros. Cada fermentador de 100 litros continha 80 litros de meio de fermentação. O meio de fermentação foi preparado de forma similar ao fermentador de inóculo. Para cada fermentador de 100 litros, o meio de fermentação consistia em 6 grupos de meios em batelada. Para os vasos NB5, NB6 e NB7, o Grupo 1 continha 704 g de Na_2SO_4, 50 g de NaCl, 80 g de KCl, 400 g de $MgSO_4.7H_2O$, 33,6 g de $(NH_4)_2SO_4$, 80 g de extrato de levedura T154 e 8 ml de antiespuma Dow 1520-US. O Grupo 1 foi esterilizado a vapor a 122 graus Celsius por 60 minutos nos fermentadores de 100 litros em um volume de aproximadamente 35 litros. O Grupo 2

continha 23,2 g de $CaCl_2.2H_2O$ em um volume de aproximadamente 300 ml. O Grupo 3 continha 141,2 g de KH_2PO_4 dissolvidos em água tratada por osmose reversa. O Grupo 4 continha 248 mg de $MnCl_2.4H_2O$, 744 mg de $ZnSO_4.7H_2O$, 3,2 mg de $Na_2MoO_4.2H_2O$, 165,6 mg de $CuSO_4.5H_2O$ e 165,6 mg de $NiSO_4.6H_2O$, 824 mg de $FeSO_4.7H_2O$ e 80 g de ácido cítrico, todos dissolvidos em água tratada por osmose reversa. O Grupo 5 continha 780 mg de tiamina-HCl, 266,4 mg de sal hemicálcico de ácido pantotênico e 286,4 µg de biotina, todos dissolvidos e esterilizados por filtro em água tratada por osmose reversa. O Grupo 6 continha 2.400 g de glicose em aproximadamente 3 litros de água tratada por osmose reversa. Os Grupos 2, 3, 4, 5 e 6 foram combinados e adicionados ao fermentador após o fermentador ter alcançado uma temperatura de operação de 22,5 graus Celsius. Para o vaso NB8, todos os grupos eram iguais às outras três condições, com a exceção do ácido cítrico. Em NB8, o Grupo 4 continha apenas aproximadamente 3,75 g de ácido cítrico. Cada volume de fermentador antes da inoculação era de aproximadamente 52-53 litros. Cada fermentador foi inoculado com 8 litros de caldo da fermentação de inóculo descrito acima. A fermentação teve o pH controlado por utilização de uma solução de 7,3 litros de hidróxido de amônio 4 N em um pH de 7 até exaustão do nitrogênio, quando então hidróxido de sódio 4 N e ácido sulfúrico 4 N foram utilizados para controle do pH. O oxigênio dissolvido foi controlado para manter um alvo de 20% por toda a fermentação usando agitação de 180 a 480 rpm e fluxo de ar de 40 l/min a 80 l/min. Cada um desses vasos foi controlado em uma pressão de entrada diferente (B5 = 13,78, NB6 =

103,42 e NB7 = 137,89 kPa) para avaliar a sensibilidade do organismo ao dióxido de carbono dissolvido aumentado. Por toda a fermentação, uma solução de 850 g/l de dextrose 95% (xarope de milho) foi alimentada para manter uma concentração de glicose menor do que 50 g/l. Após 8 dias, a massa de células secas e a titulação de ômega-3 de cada fermentador de 80 litros eram similares com NB5 a 110,1 g/l de DCW e 44,37 g/l de ômega-3; NB6 a 117,7 g/l de DCW e 45,78 g/l de ômega-3; NB7 a 114,1 g/l de DCW e 48,43 g/l de ômega-3; NB8 a 119,5 g/l de DCW e 43,55 g/l de ômega-3. À medida que a pressão era aumentada, o % de DHA/FAME diminuía, o % de EPA/FAME aumentava, e a proporção de DHA para EPA diminuía. Quando se compara o teor final de ácido graxo de 13,78 kPa com 137,89 kPa, o % de DHA/FAME diminuiu de 50,48% para 41,26% e o % de EPA/FAME aumentou de 18,95% para 23,28%. Os resultados são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7

% de EPA/FAME				
Horas	**NB5 (13,78 kPa)**	**NB6 (103,42 kPa)**	**NB7 (137,89 kPa)**	**NB8 (137,89 kPa)**
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
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

% de DHA/FAME				
Horas	**NB5 (13,78 kPa)**	**NB6 (103,42 kPa)**	**NB7 (137,89 kPa)**	**NB8 (137,89 kPa)**
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	4035	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

Proporção DHA/FPA				
Horas	**NB5 (13,78 kPa)**	**NB6 (103,42 kPa)**	**NB7 (137,89 kPa)**	**NB8 (137,89 kPa)**
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

Exemplo 5

[200] Nesse exemplo [Nx0719et10], uma espécie de *Schizochytrium* (ATCC PTA-10208), foi cultivado em quatro fermentadores New Brunswick Scientific BioFlo 310 de 14 litros em um volume final-alvo (receita) de 10 litros com

um processo de batelada alimentada de carbono (glicose) e nitrogênio (hidróxido de amônio). Três dos quatro fermentadores foram suplementados com dióxido de carbono em pontos do tempo diferentes durante a fermentação para avaliar a sensibilidade da cultura ao dióxido de carbono dissolvido aumentado. NBS1, NBS2 e NBS3 foram suplementados com dióxido de carbono começando em log 12, 24 e 48 horas, respectivamente. Cada uma das fermentações foi inoculada com 1 litro de cada cultura. Para propagação do inóculo, um fermentador Virtis de 14 litros foi utilizado. O meio do inóculo consistiu em 10 litros de meio preparados em quatro grupos separados. O Grupo 1 consistia em 90 g de MSG.$1H_2O$, 10 g de KCl, 50 g de $MgSO_4.7H_2O$, 3,3 g de $(NH_4)_2SO_4$, 6,25 g de NaCl, 60 g de T154 (extrato de levedura), 4,97 g de KH_2PO_4, 2,9 g de $CaCl_2.2H_2O$ e 2 ml de Dow 1520US (antiespuma). O Grupo 1 foi autoclavado a 121 graus por 120 minutos em um volume de aproximadamente 9,8 litros. O Grupo 2 consistia em 500 g de glicose dissolvidos em um volume de 800 ml de água tratada por osmose reversa. O Grupo 3 consistia em 31 mg de $MnCl_2.4H_2O$, 31 mg de $ZnSO_4.7H_2O$, 0,4 mg de $CoCl_2.6H_2O$, 0,4 mg de $Na_2MoO_4.2H_2O$, 20,7 mg de $CuSO_4.5H_2O$, 20,7 mg de $NiSO_4.6H_2O$, 103 mg de $FeSO_4.7H_2O$ e 234,1 mg de ácido cítrico. Cada um dos Grupos 2 e 3 foi autoclavado por 60 minutos. O Grupo 4 consistia em 97,5 mg de tiamina-HCl, 1,6 mg de vitamina B12 e 33,3 mg de sal hemicálcico de ácido pantotênico. O Grupo 4 foi dissolvido em água tratada por osmose reversa e depois esterilizado por filtro. Após o fermentador ter sido resfriado até 22,5 graus Celsius, os Grupos 2, 3, 4 e 5 foram adicionados ao fermentador. Usando hidróxido de sódio e ácido sulfúrico, o

fermentador teve o pH ajustado até 7 e o oxigênio dissolvido foi aumentado para 100% antes da inoculação. O fermentador de inóculo foi inoculado com 150 ml de uma cultura de fermentação menor (a cultura de fermentação menor foi preparada e cultivada da mesma forma que a cultura de inóculo de 10 litros) e cultivada a 22,5 graus Celsius, pH 7, agitação a 433 rpm e 5 l/min de ar por um período de 44,5 horas, quando então 1 litro de caldo de inóculo foi transferido para cada fermentador de 14 litros. Cada fermentador de 14 litros continha 10 litros de meio de fermentação. O meio de fermentação foi preparado de forma similar ao fermentador de inóculo. Para cada fermentador de 14 litros, o meio de fermentação consistia em 6 grupos de meios em batelada. Para todos os vasos, o Grupo 1 continha 60 g de Na_2SO_4, 6,25 g de NaCl, 10 g de KCl, 50 g de $MgSO_4.7H_2O$, 0,43 g de $(NH_4)_2SO_4$, 10 g de extrato de levedura T154 e 1 ml de antiespuma Dow 1520-US. O Grupo 1 foi autoclavado a 121 graus Celsius por 120 minutos nos fermentadores de 14 litros em um volume de aproximadamente 6,5 litros. O Grupo 2 continha 2,9 g de $CaCl_2.2H_2O$ em um volume de aproximadamente 20 ml de água tratada por osmose reversa. O Grupo 3 continha 17,61 g de KH_2PO_4 dissolvidos em 100 ml de água tratada por osmose reversa. O Grupo 4 continha 31 mg de $MnCl_2.4H_2O$, 93 mg de $ZnSO_4.7H_2O$, 0,4 mg de $Na_2MoO_4.2H_2O$, 20,7 mg de $CuSO_4.5H_2O$, 20,7 mg de $NiSO_4.6H_2O$, 103 mg de $FeSO_4.7H_2O$ e 10 g de ácido cítrico, todos dissolvidos em 50 ml de água tratada por osmose reversa. O Grupo 5 continha 97,5 mg de tiamina-HCl, 33,3 mg de sal hemicálcico de ácido pantotênico e 36,3 µg de biotina, todos dissolvidos e esterilizados por filtro em 10 ml de

água tratada por osmose reversa. O Grupo 6 continha 300 g de glicose em aproximadamente 0,5 litro de água tratada por osmose reversa. Os Grupos 2, 3, 4, 5 e 6 foram combinados e adicionados ao fermentador após o fermentador ter alcançado uma temperatura de operação de 22,5 graus Celsius. Cada volume de fermentador antes da inoculação era de aproximadamente 6,5 litros. Cada fermentador foi inoculado com 1 litro de caldo da fermentação de inóculo descrito acima. A fermentação teve o pH controlado por utilização de a 0,85 litro de solução de hidróxido de amônio 4 N em um pH de 7 até exaustão do nitrogênio, quando então hidróxido de sódio 4 N e ácido sulfúrico 3 N foram utilizados para controle do pH em um ponto predeterminado de 7,5. O oxigênio dissolvido foi controlado para manter um alvo de 20% por toda fermentação usando agitação de 357 a 833 rpm e fluxo de ar de 7 l/min a 7 l/min. Cada um dos vasos NBS1, NBS2 e NBS3 foi suplementado com dióxido de carbono por diferentes intervalos de tempo para avaliar a sensibilidade do organismo ao dióxido de carbono dissolvido aumentado. Por toda a fermentação, uma solução de 850 g/l de dextrose 95% (xarope de milho) foi alimentada para manter uma concentração de glicose menor do que 50 g/l. Após 8 dias, a massa de células secas e a titulação de ômega-3 de cada fermentador de 10 litros variaram dependendo das condições de suplementação de dióxido de carbono. Em 183 horas, NBS1 estava a 109,1 g/l de DCW e 45,87 g/l de ômega-3; NBS2 estava a 108,9 g/l de DCW e 45,41 g/l de ômega-3; NBS3 estava a 116,4 g/l de DCW e 50,6 g/l de ômega-3; NBS4 estava a 95,7 g/l de DCW e 40,36 g/l de ômega-3. Logo após a suplementação de dióxido de carbono ter sido iniciada, o

% de DHA/FAME diminuiu, o % de EPA/FAME aumentou e a proporção de DHA para EPA diminuiu. Quando se compara o teor máximo do % de EPA/FAME das condições de dióxido de carbono suplementado e da condição ambiente, há um aumento de 65% no teor máximo de EPA sob condições de CO_2 suplementado. Os resultados são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8

% de EPA/FAME				
Horas	**NBS1 (+CO_2 @ 12 horas)**	**NBS2 (+CO_2 @ 24 horas)**	**NBS3 (+CO_2 @ 48 horas)**	**NBS4 (sem CO_2 adicionado)**
15	12,29	10,67	10,22	10,14
39	22,82	10,32	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	20,47	27,94	26,76	17,81
159	29,13	27,20	28,52	17,81
183	27,62	25,50	25,62	17,09

Vo DHA / FAME				
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	36,22	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

Proporção de 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	1,3	1,40	2,98

Dióxido de carbono suplementado durante intervalo de tempo realçado.

Exemplo 6

[201] Nesse exemplo [Nx0106et10], espécie de *Schizochytrium* (ATCC PTA-10208), foi cultivado em quatro fermentadores New Brunswick Scientific BioFlo 310 de 14 litros em um volume final-alvo (receita) de 10 litros com um processo de batelada alimentada de carbono (glicose) e nitrogênio (hidróxido de amônio). A temperatura foi controlada por toda a rodada de fermentação para manter um alvo de 21,0°C, 22,5°C, 24,0°C e 25,5°C para NBS1, NBS2, NBS3 e NBS4, respectivamente. Cada uma das fermentações foi inoculada com 1 litro de cada cultura. Para propagação do inóculo, um fermentador Virtis de 14 litros foi utilizado. O meio do inóculo consistiu em 10 litros de meio preparados em quatro grupos separados. O Grupo 1 consistia em 90 g de MSG.1H_2O, 10 g de KCl, 50 g de $MgSO_4$.7H_2O, 3,7 g de $(NH_4)_2SO_4$, 6,25 g de NaCl, 60 g de T154 (extrato de

levedura), 5,2 g de KH_2PO_4, 2,9 g de $CaCl_2.2H_2O$ e 2 ml de Dow 1520US (antiespuma). O Grupo 1 foi autoclavado a 121 graus por 120 minutos em um volume de aproximadamente 9,8 litros. O Grupo 2 consistia em 500 g de glicose dissolvidos em um volume de 800 ml de água tratada por osmose reversa. O Grupo 3 consistia em 31 mg de $MnCl_2.4H_2O$, 31 mg de $ZnSO_4.7H_2O$, 0,4 mg de $CoCl_2.6H_2O$, 0,4 mg de $Na_2MoO_4.2H_2O$, 20,7 mg de $CuSO_4.5H_2O$, 20,7 mg de $NiSO_4.6H_2O$, 103 mg de $FeSO_4.7H_2O$ e 234,1 mg de ácido cítrico. Cada um dos Grupos 2 e 3 foi autoclavado por 60 minutos. O Grupo 4 consistia em 97,5 mg de tiamina-HCl, 1,6 mg de vitamina B12 e 33,3 mg de sal hemicálcico de ácido pantotênico. O Grupo 4 foi dissolvido em água tratada por osmose reversa e depois esterilizado por filtro. Após o fermentador ter sido resfriado até 22,5 graus Celsius, os Grupos 2, 3, 4 e 5 foram adicionados ao fermentador. Usando hidróxido de sódio e ácido sulfúrico, o fermentador teve o pH ajustado até 7 e o oxigênio dissolvido foi aumentado para 100% antes da inoculação. O fermentador de inóculo foi inoculado com 200 ml de uma cultura de fermentação menor (a cultura de fermentação menor foi preparada e cultivada da mesma forma que a cultura de inóculo de 10 litros) e cultivada a 22,5 graus Celsius, pH 7, agitação a 433 rpm e 5 l/min de ar por um período de 42 horas, quando então 1 litro de caldo de inóculo foi transferido para cada fermentador de 14 litros. Cada fermentador de 14 litros continha 10 litros de meio de fermentação. O meio de fermentação foi preparado de forma similar ao fermentador de inóculo. Para cada fermentador de 14 litros, o meio de fermentação consistia em 4 grupos de meios em batelada. Para todos os vasos, o Grupo 1 continha

88 g de Na_2SO_4, 6,25 g de NaCl, 10 g de KCl, 50 g de $MgSO_4.7H_2O$, 4,2 g de $(NH_4)_2SO_4$, 2,9 g de $CaCl_2.2H_2O$, 17,65 g de KH_2PO_4, 10 g de extrato de levedura T154 e 1 ml de antiespuma Dow 1520-US. O Grupo 1 foi autoclavado a 121 graus Celsius por 120 minutos nos fermentadores de 14 litros em um volume de aproximadamente 7,0 litros. O Grupo 2 continha 31 mg de $MnCl_2.4H_2O$, 93 mg de $ZnSO_4.7H_2O$, 0,4 mg de $Na_2MoO_4.2H_2O$, 20,7 mg de $CuSO_4.5H_2O$, 20,7 mg de $NiSO_4.6H_2O$, 103 mg de $FeSO_4.7H_2O$ e 468 mg de ácido cítrico dissolvidos em 50 ml de água tratada por osmose reversa. O Grupo 2 foi autoclavado por 60 minutos. O Grupo 3 continha 97,5 mg de tiamina-HCl, 33,3 mg de sal hemicálcico de ácido pantotênico e 35,8 µg de biotina, todos dissolvidos e esterilizados por filtro em 10 ml de água tratada por osmose reversa. O Grupo 4 continha 300 g de glicose em aproximadamente 0,5 litro de água tratada por osmose reversa e autoclavado por 60 minutos. Os Grupos 2, 3 e 4 foram combinados e adicionados ao fermentador após o fermentador ter alcançado uma temperatura de operação de 22,5 graus Celsius. Cada volume de fermentador antes da inoculação era de aproximadamente 6,5 litros. Cada fermentador foi inoculado com 1 litro de caldo da fermentação de inóculo descrito acima. O pH da fermentação foi controlado em 7,0 por toda a fermentação utilizando uma solução de 0,85 litro de hidróxido de amônio 4 N até exaustão do nitrogênio, quando então hidróxido de sódio 4 N e ácido sulfúrico 3 N foram utilizados para controle do pH em um ponto predeterminado. O oxigênio dissolvido foi controlado para manter um alvo de 20% até exaustão do nitrogênio. Após exaustão do nitrogênio, o oxigênio

dissolvido foi controlado para manter um alvo de 10% até o final da fermentação usando agitação de 357 a 714 rpm e 8 l/min de fluxo de ar. Por toda a fermentação, uma solução de 850 g/l de dextrose 95% (xarope de milho) foi alimentada para manter uma concentração de glicose menor do que 50 g/l. Após 8 dias, a massa de células secas ou a titulação de ômega-3 variaram ligeiramente para as diferentes temperaturas avaliadas; no entanto, as temperaturas de fermentação menores resultaram em % maior de EPA/FAME. Em 184 horas, NBS1 estava a 85,2 g/l de DCW e 29,9 g/l de ômega-3; NBS2 estava a 92,0 g/l de DCW e 35,0 g/l de ômega-3; NBS3 estava a 86,8 g/l de DCW e 31,7 g/l de ômega-3; NBS4 estava a 84,2 g/l DCW e 29,4 g/l de ômega-3,

[202] Para NBS1, o % de EPA/FAME variou de 12,36% a 19,02% desde o início até o final da rodada de fermentação, com um máximo de 21,57%. Para NBS2, o % de EPA/FAME variou de 11,72% a 18,11% desde o início até o final da rodada de fermentação, com um máximo de 20,21%. Para NBS3, o % de EPA/FAME variou de 11,49% a 15,43% desde o início até o final da rodada de fermentação, com um máximo de 18,09%. Para NBS4, o % de EPA/FAME variou de 11,65% a 13,65% desde o início até o final da rodada de fermentação, com um máximo de 15,70%. Quando se compara o % máximo de EPA/FAME, a menor temperatura de fermentação resultou em um aumento de 37% no teor máximo de EPA em relação à maior temperatura de fermentação avaliada. Os resultados são fornecidos na Tabela 9 abaixo.

Tabela 9

% de 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

% de 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

Proporção de 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

Exemplo 7

[203] Nesse exemplo [Nx0614et10], espécie de *Schizochytrium* (ATCC PTA-10208), foi cultivado em dois fermentadores New Brunswick Scientific BioFlo 310 de 14 litros em um volume final-alvo (receita) de 10 litros com um processo de batelada alimentada de carbono (glicose) e nitrogênio (hidróxido de amônio). Um fermentador (NBS15) foi aspergido com ar suplementado com dióxido de carbono 15% desde o início até o final da rodada de fermentação, e o outro fermentador (NBS17) foi aspergido com ar apenas para avaliar a sensibilidade da cultura ao dióxido de carbono dissolvido aumentado. Cada uma das fermentações foi inoculada com 1 litro de cada cultura. Para propagação do inóculo, um fermentador Virtis de 14 litros foi utilizado. O meio do inóculo consistiu em 10 litros de meio preparados em quatro grupos separados. O Grupo 1 consistia em 90 g de MSG.$1H_2O$, 10 g de KCl, 50 g de $MgSO_4.7H_2O$, 3,3 g de $(NH_4)_2SO_4$, 6,25 g de NaCl, 60 g de T154 (extrato de levedura), 4,97 g de KH_2PO_4, 2,9 g de $CaCl_2.2H_2O$ e 2 ml de Dow 1520US (antiespuma). O Grupo 1 foi autoclavado a 121 graus por 120 minutos em um volume de aproximadamente 9,8 litros. O Grupo 2 consistia em 500 g de glicose dissolvidos em um volume de 800 ml de água tratada por osmose reversa. O Grupo 3 consistia em 31 mg de $MnCl_2.4H_2O$, 31 mg de $ZnSO_4.7H_2O$, 0,4 mg de $CoCl_2.6H_2O$, 0,4 mg de $Na_2MoO_4.2H_2O$, 20,7 mg de $CuSO_4.5H_2O$, 20,7 mg de $NiSO_4.6H_2O$, 103 mg de

$FeSO_4.7H_2O$ e 234,1 mg de ácido cítrico. Cada um dos Grupos 2 e 3 foi autoclavado por 60 minutos. O Grupo 4 consistia em 97,5 mg de tiamina-HCl, 1,6 mg de vitamina B12 e 33,3 mg de sal hemicálcico de ácido pantotênico. O Grupo 4 foi dissolvido em água tratada por osmose reversa e depois esterilizado por filtro. Após o fermentador ter sido resfriado até 22,5 graus Celsius, os Grupos 2, 3, 4 e 5 foram adicionados ao fermentador. Usando hidróxido de sódio e ácido sulfúrico, o fermentador teve o pH ajustado até 7 e o oxigênio dissolvido foi aumentado para 100% antes da inoculação. O fermentador de inóculo foi inoculado com 200 ml de uma cultura de fermentação menor (a cultura de fermentação menor foi preparada e cultivada da mesma forma que a cultura de inóculo de 10 litros) e cultivada a 22,5 graus Celsius, pH 7, agitação a 433 rpm e 5 l/min de ar por um período de 40 horas, quando então 1 litro de caldo de inóculo foi transferido para cada fermentador de 14 litros. Cada fermentador de 14 litros continha 10 litros de meio de fermentação. O meio de fermentação foi preparado de forma similar ao fermentador de inóculo. Para cada fermentador de 14 litros, o meio de fermentação consistia em 6 grupos de meios em batelada. Para todos os vasos, o Grupo 1 continha 88 g de Na_2SO_4, 6,25 g de NaCl, 10 g de KCl, 50 g de $MgSO_4.7H_2O$, 4,2 g de $(NH_4)_2SO_4$, 10 g de extrato de levedura T154 e 1 ml de antiespuma Dow 1520-US. O Grupo 1 foi autoclavado a 121 graus Celsius por 120 minutos nos fermentadores de 14 litros em um volume de aproximadamente 6,5 litros. O Grupo 2 continha 2,9 g de $CaCl_2.2H_2O$ em um volume de aproximadamente 20 ml de água tratada por osmose reversa. O Grupo 3 continha 17,65 g de KH_2PO_4 dissolvidos

em 100 ml de água tratada por osmose reversa. O Grupo 4 continha 31 mg de $MnCl_2.4H_2O$, 93 mg de $ZnSO_4.7H_2O$, 0,4 mg de $Na_2MoO_4.2H_2O$, 20,7 mg de $CuSO_4.5H_2O$, 20,7 mg de $NiSO_4.6H_2O$, 103 mg de $FeSO_4.7H_2O$ e 468 mg de ácido cítrico dissolvidos em 50 ml de água tratada por osmose reversa. Cada um dos Grupos 2, 3 e 4 foi autoclavado por 60 minutos. O Grupo 5 continha 97,5 mg de tiamina-HCl, 33,3 mg de sal hemicálcico de ácido pantotênico e 36,3 µg de biotina, todos dissolvidos e esterilizados por filtro em 10 ml de água tratada por osmose reversa. O Grupo 6 continha 300 g de glicose em aproximadamente 0,5 litro de água tratada por osmose reversa e autoclavado por 60 minutos. Os Grupos 2, 3, 4, 5 e 6 foram combinados e adicionados ao fermentador após o fermentador ter alcançado uma temperatura de operação de 22,5 graus Celsius. Cada volume de fermentador antes da inoculação era de aproximadamente 6,5 litros. Cada fermentador foi inoculado com I litro de caldo da fermentação de inóculo descrito acima. O pH da fermentação foi controlado em 7,0 por toda a fermentação utilizando uma solução de 0,85 litro de hidróxido de amônio 4 N até exaustão do nitrogênio, quando então hidróxido de sódio 4 N e ácido sulfúrico 3 N foram utilizados para controle do pH em um ponto predeterminado. O oxigênio dissolvido foi controlado para manter um alvo de 20% até exaustão do nitrogênio. Após exaustão do nitrogênio, o oxigênio dissolvido foi controlado para manter um alvo de 10% até o final da fermentação usando agitação de 357 a 833 rpm e 8 l/min de fluxo de ar. Por toda a fermentação, uma solução de 850 g/l de dextrose 95% (xarope de milho) foi alimentada para manter uma concentração de glicose menor do que 50

g/l. Após 8 dias, a massa de células secas e a titulação de ômega-3 de cada fermentador de 10 litros variaram dependendo das condições de suplementação de dióxido de carbono. Em 188 horas, NBS15 estava a 54,5 g/l de DCW e 13,7 g/l de ômega-3; NBS17 estava a 96,1 g/l de DCW e 37,5 g/l de ômega-3, % de EPA/FAME foi maior em NBS15 (condição de CO_2 suplementado por toda a rodada) do que NBS17 (em suplementação de CO_2). Para NBS15, o % de EPA/FAME variou de 25,50% a 35,48% desde o início até o final da rodada de fermentação, com um máximo de 38,34%. Para NBS17, o % de EPA/FAME variou de 12,31% a 19,80% desde o início até o final da rodada de fermentação, com um máximo de 22,29%. Quando se compara o teor máximo do % de EPA/FAME das condições de dióxido de carbono suplementado e da condição ambiente, há um aumento de 73% no teor máximo de EPA sob condições de CO_2 suplementado.

[204] O % de DHA/FAME foi menor para as condições de CO_2 suplementado do que para a condição ambiente por toda a rodada de fermentação. Os resultados são fornecidos na Tabela 10 abaixo.

Tabela 10

% de 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

% de 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

Proporção de 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

Exemplo 8

[205] Nesse exemplo [K019], espécie de *Schizochytrium* (ATCC PTA-10208), foi cultivado em um fermentador agitado de 157.000 litros em um peso final-alvo (receita) de 100.000 kg com um processo de batelada alimentada de carbono (glicose) e nitrogênio (gás amônia anidro). A

fermentação foi inoculada com 4.500 kg de cultura. Para propagação do inóculo, um fermentador de semeadura agitado de 7.500 litros foi utilizado. O meio do inóculo consistiu em 4.500 kg de meio preparado em quatro grupos separados. O Grupo 1 consistia em 40,5 kg de MSG.$1H_2O$, 4,5 kg de KCl, 22,5 kg de $MgSO_4.7H_2O$, 1,7 kg de $(NH_4)_2SO_4$, 2,81 kg de NaCl, 27 kg de T154 (extrato de levedura), 2 kg de KH_2PO_4, 985 g de $CaCl_2$ e 0,9 kg de Dow 1520US (antiespuma) dissolvidos em água processada com um peso total de 2.300 kg. O Grupo 2 consistia em 247,5 kg de glicose.$1H_2O$ dissolvidos em água processada com um peso total de 1.500 kg. O Grupo 1 foi esterilizado no fermentador de semeadura, e o Grupo 2 foi esterilizado em um vaso separado, com *steam-in-place* a 122-123 graus Celsius por 30 minutos. O Grupo 3 consistia em 14 g de $MnCl_2.4H_2O$, 14 g de $ZnSO_4.7H_2O$, 180 mg de $CoCl_2.6H_2O$, 180 mg de $Na_2MoO_4.2H_2O$, 9,3 g de $CuSO_4.5H_2O$, 9,3 g de $NiSO_4.6H_2O$, 46,4 g de $FeSO_4.7H_2O$ e 105,3 g de ácido cítrico dissolvidos em 5 litros de água destilada. O Grupo 3 foi autoclavado a 121 graus Celsius por 60 minutos. O Grupo 4 consistia em 43,9 g Tiamina-HCl, 720 mg de vitamina B12 e 15 g de sais hemicálcicos de ácido pantotênico dissolvidos em 5 litros de água destilada e depois esterilizado por filtro. Após o fermentador de semeadura ter sido resfriado até 22,5 graus Celsius, os Grupos 2, 3, 4 foram adicionados ao fermentador. Usando hidróxido de sódio e ácido sulfúrico, o fermentador teve o pH ajustado até 7 e o oxigênio dissolvido foi aumentado para 100% antes da inoculação. O fermentador de semeadura foi inoculado com 12 litros de uma cultura de fermentação menor (a cultura de fermentação menor foi preparada e cultivada da mesma forma

que a cultura de semeadura) e cultivada a 22,5 graus Celsius, pH 7, agitação a 90 rpm, e 130-170 Nm^3/h de ar por um período de 4-5 dias para obter uma massa de células secas de cerca de 15 g/l. O meio de fermentação foi preparado de forma similar ao fermentador de inóculo. O meio de fermentação consistia em 5 grupos. O Grupo 1 continha 177 kg de KH_2PO_4, 880 kg de Na_2SO_4, 500 kg de $MgSO_4.7H_2O$, 42 kg de $(NH_4)_2SO_4$, 100 kg de extrato de levedura T154 e 10 kg de antiespuma Dow 1520-US em uma solução de 9.000 kg. O Grupo 2 continha 21,9 kg de $CaCl_2$, 62,5 kg de NaCl, 100 kg de KCl, em uma solução de 9.000 kg. Os Grupos 1 e 2 foram bombeados através de um trocador de calor para dentro fermentador, seguido por água para obter 67.000 kg de peso no fermentador. O Grupo 3 continha 310 g de $MnCl_2.4H_2O$, 930 g de $ZnSO_4.7H_2O$, 4 g de $Na_2MoO_4.2H_2O$, 207 g de $CuSO_4.5H_2O$, 207 g de $NiSO_4.6H_2O$, 1,03 kg de $FeSO_4.7H_2O$ e 4,68 kg de ácido cítrico dissolvidos em 1.500 kg de água processada. O Grupo 4 continha 4.300 kg de xarope de milho (DE-95, 70,5%). O Grupo 3 e o Grupo 4 foram esterilizados em vasos diferentes, com *steam-in-place* a 122-123 graus Celsius por 30 minutos. O Grupo 5 continha 975 g de tiamina-HCl, 333 g de sal hemicálcico de ácido pantotênico, e 358 mg de biotina, dissolvidos e esterilizados por filtro em 5 litros de água destilada. Os Grupos 3, 4 e 5 foram adicionados ao fermentador após o fermentador ter sido resfriado até 22,5 graus Celsius. O peso no volume de fermentador antes da inoculação foi de aproximadamente 73.500 kg. Após o início, a condição de fermentação foi ajustada (temperatura: 22,5°C, pressão: 0,34 bar, fluxo de ar: 3.000 Nm^3/h, agitação, 40 rpm), o pH da fermentação foi

ajustado até 7 e o oxigênio dissolvido foi aumentado para 100%. O peso após inoculação era de cerca de 78.000 kg. No começo, o pH foi controlado em 7 utilizando amônia anidra até que 550 kg de amônia fossem adicionados, e depois solução a 30% de hidróxido de sódio foi utilizada para controle do pH em um ponto predeterminado de 7,5. O oxigênio dissolvido foi controlado para manter um alvo de 20% durante a alimentação de amônia e 10% posteriormente usando agitação de 40 a 100 rpm e fluxo de ar de 2.000 a 8000 Nm^3/h. Por toda a fermentação, uma solução a 65% de xarope de milho DE-95 foi alimentada para manter uma concentração de glicose em torno de g/l. Em outro exemplo [K020], foram feitas três alterações em relação ao Exemplo K019: 1) a pressão foi reduzida para 0,15 bar, 2) o peso após inoculação foi reduzido para 68.000 kg, 3) o fluxo de ar foi aumentado para mais de 5.000 Nm^3/h em 60 horas após inoculação e foi mantido elevado por toda a rodada, independentemente da concentração de oxigênio dissolvido. As três alterações acima reduziram a concentração de dióxido de carbono dissolvido no caldo. Os resultados mostraram que com o CO_2 reduzido, o % de DHA/FAME foi aumentado de 38,38% para 43,8%, e o % de EPA/FAME foi reduzido de 24,42% para 20,68%. A proporção de DHA/EPA foi aumentada de 1,57 para 2,12. Os resultados são apresentados na Tabela 11 abaixo.

Tabela 11

K019			
Horas	**% de DHA/FAME**	**% de EPA/FAME**	**Proporção de 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

Tabela 12

K020 (CO_2 dissolvido reduzido)			
Horas	**% de DHA/FAME**	**% de EPA/FAME**	**Proporção de 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

Exemplo 9

[206] Na tabela abaixo, o CO_2 dissolvido máximo é calculado para vários dos exemplos usando constante de Henry. A primeira condição, "10 L (NBS4 0719et10) em

pressão de retorno de 0 kPa e 45,5 mmol/l/hora de CER" é o CO_2 dissolvido calculado para NBS4 na Tabela 8 em uma taxa de evolução de dióxido de carbono de 45,5 mmol/l/hora, um volume de fermentação de 10 litros, uma taxa de aeração de 0,8 vvm e pressão de retorno de 0 kPa. A segunda condição, "10 L (NBS2 0719et10) em pressão de retorno de 0 kPa com 6% de CO_2 no gás de entrada e 50 mmol/l/hora de CER" é o CO_2 dissolvido calculado para NBS2 na Tabela 8 em uma taxa de evolução de dióxido de carbono de 50 mmol/l/hora, um volume de fermentação de 10 litros, uma taxa de aeração de 0,8 vvm, em pressão de retorno de 0 kPa, e com CO_2 suplementado na corrente de entrada a 6% do gás total, como medido por espectrometria de massa usando um espectrômetro de massa Thermo Prima dB. A terceira condição, "80 litros (NB5 0614et10) em pressão de retorno de 13,78 kPa e 55 mmol/l/hora de CER" é o CO_2 dissolvido calculado para NB5 na Tabela 7 em uma taxa de evolução de dióxido de carbono de 55 mmol/l/hora, um volume de fermentação de 80 litros, uma taxa de aeração de 1,0 vvm e pressão de retorno de 13,78 kPa. A quarta condição, "80 litros (NB6 0614et10) em pressão de retorno de 103,42 kPa e 50 mmol/l/hora de CER" é o CO_2 dissolvido calculado para NB6 na Tabela 7 em uma taxa de evolução de dióxido de carbono de 50 mmol/l/hora, um volume de fermentação de 80 litros, uma taxa de aeração de 1,0 vvm e pressão de retorno de 103,42 kPa. A quinta condição, "80 litros (NB7 & NB8 0614et10) em pressão de retorno de 137,89 kPa e 50 mmol/l/hora de CER" é o CO_2 dissolvido calculado para NB7 e NB8 na Tabela 7 em uma taxa de evolução de dióxido de carbono de 50 mmol/l/hora, um volume de fermentação de 80 litros, uma taxa de aeração de

1,0 vvm e pressão de retorno de 137,89 kPa. Todos os valores de CER foram calculados usando dados de CO_2 *offgas* coletados com um espectrômetro de massa Thermo Prima dB. Os resultados dos cálculos são fornecidos nas Tabelas 13 e 14 abaixo.

Tabela 13

10 L (NBS4 0719et10) em pressão de retorno de 0 kPa e 45,5 mmol/l/hora de CER	RV	10 litros
Pressão absoluta	Entrada	1,01 bar
Fluxo de ar	Entrada	8 l/min
Vvm		0,8
CO_2 necessário na entrada de ar	Saída	0,14%
Delta CO_2 no *offgas*		2,309125%
CO_2 no *offgas*		2,446301%
Pressão parcial de CO_2		**0,024708 bar**
	CO_2 dissolvido	0,000785 mol/l
	CO_2 dissolvido	34,53 ppm
10 L (NBS2 0719et10) em pressão de retorno de 0 kPa com 6% de CO_2 no gás de entrada e 50 mmol/l/hora de CER	RV	10 litros
Pressão absoluta	Entrada	1,01 bar
Fluxo de ar	Entrada	8 l/min
Vvm		0,8
CO_2 necessário na entrada de ar	Saída	7,00%

Delta CO_2 no *offgas*		2,5375%
CO_2 no *offgas*		9,534653%
Pressão parcial de CO_2		**0,0963 bar**
	CO_2 dissolvido	0,003059 mol/l
	CO_2 dissolvido	134,58 ppm
80 litros (NB5 0614et10) em pressão de retorno de 13,78 kPa e 55 mmol/l/hora de CER	RV	80 litros
Pressão de retorno	Entrada	0,138 bar
Pressão total		1,21 bar
Fluxo de ar	Entrada	80 l/min
Vvm		1
Delta CO_2	De CPR	2,233%
CO_2 na saída		2,233%
Pressão parcial de CO_2		**0,026975 bar**
	CO_2 dissolvido	0,000857 mol/l
	CO_2 dissolvido	37,70 ppm
80 litros (NB6 0614et10) em pressão de retorno de 103,42 kPa e 50 mmol/l/hora de CER	RV	80 litros
Pressão de retorno	Entrada	1,0345 bar
Pressão total		2,10 bar
Fluxo de ar	Entrada	80 l/min
Vvm		1
Delta CO_2	De CPR	2,03%
CO_2 na saída		2,03%
Pressão parcial de CO_2		**0,042721 bar**
	CO_2 dissolvido	0,001357 mol/l

	CO_2 dissolvido	59,71 ppm
80 litros (NB7 & NB8 0614et10) em pressão de retorno de 137,89 kPa e 50 mmol/l/hora de CER	RV	80 litros
Pressão de retorno	Entrada	1,38 bar
Pressão total		2,45 bar
Fluxo de ar	Entrada	80 l/min
Vvm		1
Delta CO_2	De CPR	2,03%
CO_2 na saída		2,03%
Pressão parcial de CO_2		**0,049735 bar**
	CO_2 dissolvido	0,00158 mol/l
	CO_2 dissolvido	69,51 ppm

Tabela 14

	NB5 (13,78 kPa)	**NB6 (103,42 kPa)**	**NB7 (137,89 kPa)**	**NB8 (137,89 kPa)**	**NBS2 (+CO_2 @ 24 horas)**	**NBS4 (sem CO_2 adicionado)**
% de EPA/FAME	21,99	21,57	25,85	25,25	27,94	17,81
% de DHA/FAME	40,35	39,22	34,14	32,42	24,36	38,81
CO_2 dissolvido máximo	37,70	59,71	69,51	69,51	134,58	34,53

Exemplo 10

[207] Foram feitos experimentos para determinar o efeito de gradientes de vitamina sobre o desempenho (massa de células secas de biomassa (DW), % de DHA, % de gordura e % de EPA) usando N° de Acesso na ATCC PTA-9695 em Meio de Frasco Agitado de *Thraustochytrium* (TSFM) sob nível de CO_2 ambiente.

[208] **Materiais e métodos**: Quatro vitaminas (Tiamina.HCl, B12, biotina e Ca-pantotenato) foram usadas em meio TSFM com 0,25 g/l de tastona e 0,625 g/l de NaCl (veja a Tabela 16). Mais MSG e KH_2PO_4 foram adicionados ao meio para manter seu teor total de nitrogênio e fósforo. As concentrações globais de vitamina no meio foram, 0, 0,5x, 1x, 5x, 10x, 20x ou 30x a quantidade-padrão, dependendo das vitaminas estudadas (veja a Tabela 17). O estudo de gradiente foi realizado em cada vitamina separadamente. No entanto, no caso de biotina e Ca-pantotenato, quantidades-padrão de Tiamina.HCl e B12 também foram incorporadas no meio, na medida em que as concentrações das últimas duas eram muito baixas no TSFM regular. Três controles de TSFM também foram incluídos no experimento para comparação. Esses controles eram TSFM-padrão com 2 g/l de tastona (veja a Tabela 15) e 1x Tiamina.HCl e 1x B 12 (CI); TSFM livre de tastona sem nenhuma vitaminas (A); e TSFM livre de tastona com 1x Tiamina.HCl e 1x B12 (B). Todos os controles continham 0,625 g/l de NaCl. Uma cultura com 3 dias de idade de PTA-9695 foi usada para inocular frascos agitados de 250 ml em duplicata a 0,1 g de DW/l. Todos os frascos (de fundo achatado, com total de 50 ml de meio) foram incubados aerobicamente a 22,5 +/- 1°C em uma agitadora

rotatória (200 RPM). Todas as culturas foram colhidas após 7 dias, e a análise FAME foi realizada nas amostras de biomassa secas por congelamento finais.

Tabela 15

Meio de Frasco Agitado de *Thraustochytrium* (TSFM) com 2 g/l de tastona.

Componente	**Quantidade por litro (g)**	**[Estoque] (g/l)**	**ml de estoque para usar por litro**	
NaCl	0,625	Seco		
KCl	1	50	20 ml	
$MgSO_4.7H_2O$	5	227	22 ml	
$(NH_4)_2SO_4$	0,2	190	1,05 ml	
$CaCl_2.2H_2O$	0,29	Seco		
Monoidrato de MSG	2	Seco		
Tastona 154	2	Seco		
HEPES (100 mM) pH 7	23,8	Seco		
KH_2PO_4	0,1	56,5	1,77 ml	Adicionar após autoclavagem
Glicose	50	500	100 ml	Adicionar após autoclavagem
Metais-traço		Veja abaixo	1 ml	Adicionar após autoclavagem

Vitaminas		Veja abaixo	1 ml	Adicionar após autoclavagem
Solução de metal-traço				
$FeCl_3.6H_2O$	2,9 mg	2,9		
$CuSO_4.5H_2O$	0,02 mg	0,02		
$MnCl_2.4H_2O$	8,6 mg	8,6		
$CoCl_2.6H_2O$	0,26 mg	0,26		
$ZnCl_2$	0,6 mg	0,6		
Ácido cítrico	12 mg	12 g (seco)		
Solução de vitamina				
Tiamina	10 µg	10 mg/l		
Vitamina B12	1 µg	1 mg/l		

Tabela 16

Meio de Frasco Agitado de *Thraustochytrium* (TSFM) com 0,25 g/l de tastona.

Componente	**Quantidade por litro (g)**	**[Estoque] (g/l)**	**ml de estoque para usar por litro**	
NaCl	0,625	Seco		
KCl	1	50	20 ml	
$MgSO_4.7H_2O$	5	227	22 ml	
$(NH_4)_2SO_4$	0,2	190	1,05 ml	

$CaCl_2.2H_2O$	0,29	Seco		
Monoidrato de MSG	4,554	Seco		
Tastona GC 7189-1	0,25	Seco		
HEPES (100 mM) pH 7	23,8	Seco		
KH_2PO_4	0,1	56,5	4,28 ml	Adicionar após autoclavagem
Glicose	50	500	100 ml	Adicionar após autoclavagem
Metais-traço		Veja abaixo	1 ml	Adicionar após autoclavagem
Vitaminas		Veja abaixo	1 ml	Adicionar após autoclavagem
Metal-traço-TSFM				
$FeCl_3.6H_2O$	2,9 mg	2,9		
$CuSO_4.5H_2O$	0,02 mg	0,02		
$MnCl_2.4H_2O$	8,6 mg	8,6		
$CoCl_2.6H_2O$	0,26 mg	0,26		
$ZnCl_2$	0,6 mg	0,6		
Ácido cítrico	12 mg	12 g (seco)		
Solução de				

vitamina				
Tiamina	10 µg	10 mg/l		
Vitamina B12	1 µg	1 mg/l		

Tabela 17

Concentrações de vitamina usadas nesse estudo (mg/l):

Conc. de vitamina [X]	**Tiamina.HCl**	**B12**	**Biotina**	**Ca-Pantotenato**
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	

[209] **Resultados:** Os maiores DW e % de gordura (6,7 g/l e 38,5%, respectivamente) para o gradiente de tiamina foram obtidos quando a quantidade adicionada dessa vitamina ao meio foi 5 vezes o nível-padrão (Figura 1). O % de DHA nesse nível de tiamina foi de 44,1%. Abaixo e acima de 5x tiamina, tanto DW quanto o % de gordura começaram a declinar. O % de DHA também declinou no meio com menos do que 5x tiamina, e ligeiramente flutuou acima de 5x tiamina, sem aumento significante. O % de EPA na culturas de gradiente de tiamina variou entre 8,6 e 11,5. Quando não foi adicionada tastona ou vitaminas ao meio (Figura 5, meio A), tudo, exceto o % de DHA, declinou significativamente. O aumento no % de DHA, no entanto, pareceu ser artificial, na medida em que tanto a DW quanto o % de gordura estavam

extremamente baixos para essa condição. A concentração de 1x de B12 pareceu ser ótima para DW, % de DHA, % de gordura e % de EPA (Figura 2). Nesse nível de vitamina B12, foram obtidos os seguintes: 7,1 g/l de DW, 50,6% de DHA, 42,7% de gordura e 2,1% de EPA. O maior % de EPA (11,5) foi obtido quando não foi adicionada nenhuma B12 ao meio. Meio livre de tastona sem vitaminas adicionadas não aumentou mais o desempenho do organismo, e o % maior de DHA pareceu ser artificial, como descrito previamente (Figura 5, meio A).

[210] Similarmente, a concentração de 1x de biotina foi ótima para DW, % de DHA e % de gordura (Figura 3). Os valores correspondentes para esses parâmetros foram: 6,8 g/l, 47,7% e 37,9%, respectivamente. O percentual de EPA nesse ponto foi de 1,9. Meio livre de tastona com 1x tiamina e 1x B12 (Figura 5, meio B) comprometeu significativamente o desempenho global de PTA-9695.

[211] Ca-pantotenato produziu os maiores DW, % de DHA e % de gordura quando essa vitamina foi adicionada ao meio a 10x a quantidade-padrão (Figura 4). As concentrações ótimas desses parâmetros foram: 7,0 g/l, 47,3% e 39,1%, respectivamente. O teor de EPA em todo o experimento de gradiente de Ca-pantotenato foi menor do que 2%. Uma redução significante no desempenho global de PTA-9695 foi observada quando o organismo foi desenvolvido em meio livre de tastona com apenas 1x tiamina e 1x B12 (Figura 5, meio B).

|212] Os resultados também são mostrados nas tabelas de dados abaixo.

Trt ID →	1a	1b	2a	2b	3a	3b	4a	4b	5a	5b	6a	6b
Tiamina.HCl [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
Ca-Pantotenato [x]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
% de DHA	38.31	38.49	40.43	44.27	45.32	43.95	41.48	46.61	42.87	48.90	44.14	42.28
% médio de DHA		38.90		42.35		44.63		44.06		45.89		43.21
% de gordura	32.31	31.47	32.40	37.62	37.25	32.74	34.92	42.03	38.85	39.11	36.63	35.27
% médio de gordura		31.88		35.01		35.00		38.48		37.98		36.45
% de EPA	11.48	11.61	10.36	8.11	8.94	8.28	10.26	8.06	10.45	8.88	8.73	10.03
% médio de EPA		11.54		8.74		8.61		8.17		8.57		8.38
% de 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
% médio de 16:0		29.53		31.26		31.13		30.59		30.58		30.80
% de ARA	1.33	1.38	1.25	1.12	1.03	0.96	1.29	1.05	1.34	0.88	1.06	1.24
% médio de ARA		1.36		1.18		1.09		1.17		1.10		1.15

Conc-padrão de vitamina (g/l)

Tiamina.HCl [1x]	1.00E-05
B12 [1x]	1.00E-06
Biotina [1x]	4.68E-06
Ca-pantotenato [1x]	3.33E-03

gradiente de vitamina [x]→	0	0.5	1	5	10	20	30
Tiamina.HCl (g/l)	0	5.00E-06	1.00E-05	5.00E-05	1.00E-04	2.00E-04	3.00E-04
B12 (g/l)	0	5.00E-07	1.00E-06	5.00E-06	1.00E-05	2.00E-05	3.00E-05
Biotina (g/l)	0	2.34E-06	4.68E-06	2.34E-05	4.68E-05	9.36E-05	1.40E-04
Ca-pantotenato (g/l)	0	1.67E-03	3.33E-03	1.67E-02	3.33E-02	6.66E-02	9.99E-02

Concentrações totais de vitamina, incluindo as levadas pelo 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
Ca-pantotenato (g/l)	3.10E-05	1.70E-03	3.36E-03	1.67E-02	3.33E-02	6.66E-02	9.99E-02

Concentrações totais de vitamina (mg/l), incluindo as levadas pelo inóculo:

Tiamina.HCl	2.38E-02	2.88E-02	3.38E-02	7.38E-02	1.24E-01	2.24E-01	3.24E-01
B12	1.37E-05	5.14E-04	1.01E-03	5.01E-03	1.00E-02	2.00E-02	3.00E-02
Biotina	2.49E-01	2.51E-01	2.53E-01	2.72E-01	2.96E-01	3.42E-01	3.89E-01
Ca-pantotenato	3.10E-02	1.70E+00	3.36E+00	1.67E+01	3.33E+01	6.66E+01	9.99E+01

Trt ID -->	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
Ca-Pantotenato [x]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
% de 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
% médio de DHA		38.90		50.60		50.44		46.21		45.69		42.41
% de gordura	32.31	31.47	42.05	43.40	44.43	38.30	36.47	34.72	34.99	33.14	32.04	28.89
% médio de gordura		31.89		42.73		41.36		35.59		34.06		30.46
% de 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
% médio de EPA		11.54		2.06		2.01		2.17		2.10		1.95
% de 16:0	29.58	29.48	36.76	36.69	36.75	37.41	41.05	40.83	40.33	42.66	44.55	43.42
% médio de 16:0		29.53		36.74		37.08		40.95		41.50		43.99
% de 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
% médio de ARA		1.36		0.15		0.15		0.07		0.00		0.00

Trt ID -->	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	5	1	10	10	20	20	30	30	0	0
Ca-Pantotenato [x]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
% de DHA	48.32	46.94	46.19	49.19	48.43	43.63	44.37	41.79	44.36	42.19	42.07	42.74
% médio de DHA		47.63		47.65		44.53		43.08		43.28		42.41
% de gordura	28.16	35.67	34.34	41.39	35.67	32.04	33.84	31.41	35.51	31.11	32.04	28.89
% médio de gordura		31.92		37.87		33.85		32.63		33.31		30.46
% de EPA	2.38	1.83	1.82	1.91	1.81	1.77	1.62	1.84	1.94	1.68	1.76	2.14
% médio de EPA		2.09		1.82		1.79		1.83		1.81		1.95
% de 16:0	39.16	40.33	40.70	38.13	41.64	43.28	42.34	44.57	42.40	44.10	44.55	43.42
% médio de 16:0		39.26		39.42		42.46		43.48		43.28		43.99
% de 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
% médio de ARA		0.11		0.08		0.00		0.00		0.00		0.00

Trt ID -->	18a	18b	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
Ca-Pantotenato [x]	1	1	5	5	10	10	20	20	0	0
% de DHA	45.05	41.28	44.94	46.70	50.66	43.87	44.23	38.53	56.95	56.92
% médio de DHA		43.16		45.82		47.27		41.38		56.93
% de gordura	32.05	31.10	32.32	36.07	45.61	32.51	25.50	27.42	50.11	53.39
% médio de gordura		31.57		34.20		30.08		26.46		51.75
% de EPA	1.84	1.73	1.86	1.83	1.87	1.82	2.21	1.73	2.50	2.45
% médio de EPA		1.83		1.84		1.85		1.97		2.47
% de 16:0	41.55	45.27	41.70	40.38	37.09	42.91	42.30	47.56	31.04	31.08
% médio de 16:0		43.41		41.08		40.00		44.93		31.05
% de ARA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.15	0.00	0.00	0.00	0.20	0.21
% médio de ARA		0.00		0.00		0.08		0.00		0.20

Trt ID -->	Aa	Ab	Ba	Bb
Tiamina.HCl [x]	0	0	0	0
B12 [x]	0	0	0	0
Biotina [x]	0	0	0	0
Ca-Pantotenato [x]	0	0	0	0
% de DHA	51.82	56.09	50.74	54.23
% médio de DHA		53.96		52.48
% de gordura	9.02	7.13	20.86	26.64
% médio de gordura		8.07		23.70
% de EPA	5.91	6.63	3.71	3.36
% médio de EPA		6.27		3.54
% de 16:0	25.07	20.69	34.01	31.44
% médio de 16:0		22.88		32.72
% de ARA	0.00	0.00	0.00	0.23
% médio de ARA		0.00		0.11

Trt ID ——>	1	2	3	4	5	6	7	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
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
Ca-Pantotenato [x]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
% médio de DHA	38.90	42.35	44.63	44.05	45.89	43.21	38.90	50.60	50.44	46.21	45.69
% médio de gordura	31.89	35.01	35.00	38.48	37.98	36.45	31.89	42.73	41.36	35.59	34.06
% médio de EPA	11.54	9.74	8.61	9.17	8.57	9.38	11.54	2.06	2.01	2.17	2.10
% médio de 16:0	29.53	31.26	31.13	30.59	30.58	30.80	29.53	36.74	37.08	40.94	41.50
% médio de ARA	1.36	1.18	1.00	1.17	1.10	1.15	1.36	0.15	0.15	0.07	0.00

Trt ID ——>	1	2	3	4	5	6	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
Tiamina/B12/Ca-Pant [x]	0/0/0/0	0.5/0/0/0	1/0/0/0	5/0/0/0	10/0/0/0	20/0/0/0	0/0/0/0	0/1/0/0	0/5/0/0	0/10/0/0	0/20/0/0
Conc. de 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	0.0002/0/0/0	0/0/0/0	0/0.000001/0/0	0/0.000005/0/0	0/0.00001/0/0	0/0.00002/0/0
% médio de DHA	38.90	42.35	44.63	44.05	45.89	43.21	38.90	50.60	50.44	46.21	45.69
% médio de gordura	31.89	35.01	35.00	38.48	37.98	36.45	31.89	42.73	41.36	35.59	34.06
% médio de EPA	11.54	9.74	8.61	9.17	8.57	9.38	11.54	2.06	2.01	2.17	2.10
% médio de 16:0	29.53	31.26	31.13	30.59	30.58	30.80	29.53	36.74	37.08	40.94	41.50
% médio de ARA	1.36	1.18	1.00	1.17	1.10	1.15	1.36	0.15	0.15	0.07	0.00
Conc. total de vitaminas (mg/l)	2.38E-02	2.88E-02	3.38E-02	7.38E-02	1.24E-01	2.24E-01	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]
DW médio (g/l)	5.863	6.214	6.112	6.658	6.356	6.277	5.863	7.079	7.001	6.505	6.442

Trt ID ——>	T2	T3	T4	T5	T6
Tiamina.HCl [x]	1	1	1	1	1
Bl2 [x]	1	1	1	1	1
Biotina [x]	0	0.5	1	10	20
Ca-Pantotenato [x]	0	0	0	0	0
% médio de DHA	42.41	47.63	47.85	44.53	43.08
% médio de gordura	30.46	31.92	37.87	33.65	32.63
% médio de EPA	1.95	2.09	1.92	1.79	1.83
% médio de 16:0	43.99	39.26	39.42	42.46	43.46
% médio de ARA	0.00	0.11	0.08	0.00	0.00

Trt ID ——>	T2	T3	T4	T5	T6
Tiamina/Bl2/Ca-Pant [x]	1/1/0/0	1/1/0.5/0	1/1/1/0	1/1/10/0	1/1/20/0
Conc. de vitaminas (g/l)	0.0300/0.0000/0.0000	0.0000/0.0000/0.0500/0.2340	0.0000/0.0000/0.0000/0.4680	0.0000/0.0000/0.0000/0.4680	0.0000/0.0000/0.0000/0.9360
% médio de DHA	42.41	47.63	47.85	44.53	43.08
% médio de gordura	30.46	31.92	37.87	33.65	32.63
% médio de EPA	1.95	2.09	1.92	1.79	1.83
% médio de 16:0	43.99	39.26	39.42	42.46	43.46
% médio de ARA	0.00	0.11	0.08	0.00	0.00
Conc. total de vitaminas (mg/l)	2.49E-01	2.51E-01	2.53E-01	2.96E-01	3.42E-01
DW médio (g/l)	6.029	5.705	6.813	6.458	6.286

Trt ID ——>	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
Ca-Pantotenato [x]	0	0	1	5	10
% médio de DHA	43.28	42.41	43.16	45.82	47.27
% médio de gordura	33.31	30.46	31.57	34.20	39.06
% médio de EPA	1.91	1.95	1.83	1.84	1.85
% médio de 16:0	43.28	43.99	43.41	41.09	40.00
% médio de ARA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.08

Trt ID ——>	17	18	19	20	21
Tiamina/B12/Ca-Pant [x]	1/1/30/0	1/1/0/0	1/1/0/1	1/1/0/5	1/1/0/10
Conc. de vitaminas (g/l)	0.000001/0.000001/0.000145/0	0.000001/0.000001/0/0	0.000001/0.000001/0/0.0333	0.000001/0.000001/0/0.1665	0.000001/0.000001/0/0.3333
% médio de DHA	43.28	42.41	43.16	45.82	47.27
% médio de gordura	33.31	30.46	31.57	34.20	39.06
% médio de EPA	1.91	1.95	1.83	1.84	1.85
% médio de 16:0	43.28	43.99	43.41	41.09	40.00
% médio de ARA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.08
Conc. total de vitaminas (mg/l)	3.69E-01	3.10E-02	3.36E+00	1.67E+01	3.33E+01
DW médio (g/l)	6.358	6.029	6.058	6.349	6.961

Trt ID ——>	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
Ca-Pantotenato [x]	20	0	0	0
% médio de DHA	41.39	56.93	53.96	52.48
% médio de gordura	26.46	51.75	8.07	23.70
% médio de EPA	1.97	2.47	6.27	3.54
% médio de 16:0	44.93	31.05	22.88	32.72
% médio de ARA	0.00	0.26	0.00	0.11

Trt ID ——>	22	C1	A	B
Tiamina/B12/Ca-Pant [x]	1/1/20	1/1/0	0/0/0	0/0/0
Conc. de vitaminas (g/L)	0.000001/0.000001/0.0665	0.000001/0.000001/0.0	0/0/0	0.000001/0.000001/0.0
% médio de DHA	41.39	56.93	53.96	52.48
% médio de gordura	26.46	51.75	8.07	23.70
% médio de EPA	1.97	2.47	6.27	3.54
% médio de 16:0	44.93	31.05	22.88	32.72
% médio de ARA	0.00	0.26	0.00	0.11
Conc. total de vitaminas (mg/L)	6.665E+01			
DW médio (g/L)	5.492	7.651	0.428	4.809

Exemplo 11

[213] Foram feitos experimentos para determinar a necessidade mínima de N° de Acesso na ATCC PTA-9695 para vitamina B12 para obter desempenho máximo a CO_2 10%, incluindo a quantidade mínima de vitamina B12 que é necessária para cultura de PTA-9695 para produzir peso seco e rendimento de DHA máximos sob condições de CO_2 10%.

[214] Temperatura: 22,5 +/- 1°C (@ CO_2 10%)

[215] Velocidade da agitadora: 200 rpm

[216] Meio de base: Meio de Fermentador Definido Reduzido Proporcionalmente (DSDFM-B) (Tabela 20).

[217] Inóculo: cultura de 3 dias de idade de PTA-9695 desenvolvida em DSDFM-B com diferentes concentrações de vitamina B12.

[218] Um novo criofrasco de PTA-9695 foi inicialmente descongelado em SDFM-B (Tabela 19), e foi subseqüentemente desenvolvido e transferido várias vezes em SDFM-B Definido sob CO_2 10%. Uma cultura de 3 dias de idade de PTA-9695 em DSDFM-B foi usada (a 4%) para preparar os frascos de inóculo iniciais contendo DSDFM-B com várias concentrações de vitamina B12 (ou seja, de 7,68 mg/l a zero mg/l de B12 para os tratamentos A a I, conseqüentemente; veja a Tabela 18). Os frascos de inóculo para cada concentração de vitamina B12 foram mantidos sob CO_2 10% e por transferência das culturas em seus respectivos meios frescos a cada 7 dias. A transferência semanal das culturas era essencial para a retirada por lavagem de qualquer vitamina B12 em excesso que possa ter sido armazenada dentro das células, de tal forma que a necessidade mínima para essa vitamina pudesse ser determinada com mais precisão. Frascos em

duplicata agitados foram inoculados com seus respectivos inóculos de 3 dias de idade em um DW teorético de 0,1 g/l, usando a densidade óptica a 600 nm. As culturas foram desenvolvidas sob CO_2 10% por 9 dias, antes de serem colhidas e posteriormente analisadas por ensaio FAME.

[219] **Resultados**:

[220] Observação: Os pontos de dados para a semana 3 estão sendo desconsiderados nesse estudo, uma vez que o suprimento de CO_2 para a incubadora foi interrompido, e os frascos tiveram quer ser removidos da incubadora por 6 horas durante renovação do laboratório.

[221] A exposição prolongada (até 4 semanas) de PTA-9695 a concentrações elevadas de vitamina B12 (mais do que 3,84 mg/l) pode afetar adversamente o peso seco, o % de gordura e o rendimento de DHA, enquanto uma concentração de entre 1,5 a 768 µg/l de vitamina B12 não possui efeito significante sobre o DW, % de gordura, % de EPA, e rendimento de DHA de PTA-9695.

[222] Um aumento no número de células únicas (até 15, em oposição a 3-4) foi observado em culturas que foram desenvolvidas na presença de 7,68 mg/l de vitamina B12 (tratamento A).

[223] *A* eliminação da vitamina B12 da receita do meio aumenta significativamente o % de EPA por cerca de 10%, enquanto diminui ligeiramente tanto o % de DHA quanto o % de 16:0. As Figuras 6-19 e a Tabela 21 abaixo mostram os resultados dos experimentos.

[224] **Conclusão:**

[225] Um mínimo de cerca de 1,5 µg/l vitamina B12 (1/500° da concentração-padrão em SDF-B) é essencial para

obtenção de DW, % de DHA, % de gordura e rendimento de DHA máximos. Enquanto concentrações muito elevadas de vitamina B12 (mais do que 3,84 mg/l) possam reduzir substancialmente o DW, o % de gordura e o rendimento de DHA, uma privação completa de PTA-9695 dessa vitamina pode aumentar significativamente (aproximadamente 10%) seu % de EPA. Níveis muito elevados de vitamina B12 também podem ter um papel na promoção da transformação da cultura “agrupada” em “células únicas”.

Tabela 18. Tratamentos de vitamina B12.

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

Tabela 19. Meio de Fermentador Definido Reduzido Proporcionalmente para PTA-9695 (SDFM-B), pH 7 ml.

Componente	MW	[Estoque] (g/l)	ml de estoque em frasco agitado de 1 litro	Gramas de ingrediente seco em frasco agitado de 1 litro	Concentração final (g/l)
NaCl	58,44			0,625	0,625
KCl	74,56	56	17,9		1,0
$MgSO_4.7H_2O$	246,5	227	22		5,0
$(NH_4)_2SO_4$	132,14	190	0,525		0,1
$CaCl_2.2H_2O$	147	60	4,833		0,290
MSG (W/ 1 mole H_2O)	187,1			1,0	1,0
Na_2SO_4	142,04			6,0	6,0
K_2SO_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_2PO_4	136,07	56,5	0,885		0,05
Glicose	180	500	100,		50
Mistura de metal-traço					
$FeSO_4.7H_2O$	278,02	1,03	10		0,0103
$MnCl_2.4H_2O$	198	3,1	1		0,0031
$ZnSO_4.7H_2O$	287,4	9,3	1		0,0093
$Na_2MoO_4.2H_2O$	241,95	0,04	1		0,00004
$CuSO_4.5H_2O$	249,5	2,07	1		0,00207
$NiSO_4.6H_2O$	262,84	2,07	1		0,00207
Ácido cítrico (em $FeSO_4.7H_2O$)		117,5			1,175
Solução de vitamina					
Vitamina B12	1355,4	0,768	1		0,000768
Tiamina.HCl	337,3	11,7	1		0,0117
Ca-Pantotenato	476,54	3,996	1		0,003996

Biotina	244,3	0,002	2,17		0,00000434

Tabela 20. SDFM-B Definido (DSDFM-B), pH 7.

Componente	MW	[Estoque] (g/l)	ml de estoque em frasco agitado de 1 litro	Gramas de ingrediente seco em frasco agitado de 1 litro	Concentração final (g/l)
NaCl	58,44			0,625	0,625
KCl	74,56	56	17,9		1,0
$MgSO_4.7H_2O$	246,5	227	22		5,0
$(NH_4)_2SO_4$	132,14	190	1,1483		0,218
$CaCl_2.2H_2O$	147	60	4,833		0,290
MSG (p/ 1 mol de H_2O)	187,1			2,188	2,188
Na_2SO_4	142,04			6,0	6,0
K_2SO_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_2PO_4	136,07	56,5	2,475		0,140
Glicose	180	500	100		50

Mistura de metal-traço					
$FeSO_4.7H_2O$	278,02	1,03	10		0,0103
$MnCl_2.4H_2O$	198	3,1	1		0,0031
$ZnSO_4.7H_2O$	287,4	9,3	1		0,0093
$Na_2MoO_4.2H_2O$	241,95	0,04	1		0,00004
$CuSO_4.5H_2O$	249,5	2,07	1		0,00207
$NiSO_4.6H_2O$	262,84	2,07	1		0,00207
Ácido cítrico (em $FeSO_4.7H_2O$)		117,5			1,175
Solução de vitamina					
Vitamina B12	1355,4	0,768	1		0,000768
Tiamina. HCl	337,3	11,7	1		0,0117
Ca-Pantotenato	476,54	3,996	1		0,003996
Biotina	244,3	0,002	2,65		0,0000053

Tabela 21. Dados de experimentos.

Série de frascos agitados (SF)	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**	**1**

Tratamento ID	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Conc. de vit. B12 (mg/l)	7680	3840	768	384	153,6	76,8	15,36	7,68	1,536	0
Conc. de 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)										
Frasco 1	2,832	3,48	3,64	4,186	3,728	3,952	3,71	3,96	4,5	3,868
Frasco 2	3,03	3,324	3,88	3,412	3,626	3,746	4,024	3,682	4,17	4,094
Média	2,931	3,402	3,76	3,799	3,677	3,849	3,867	3,821	4,335	3,981
% de gordura (por % da área)										
Frasco 1	56,9	55,5	58,9 ,	63,9	61,6	60,5	60,4	64,7	66,6	60,4
Frasco 2	52,4	56,7	61,6	59,8	58,7	60,7	64,1	57,9	66,3	62,9
Média	54,6	56,1	60,3	61,9	60,1	60,6	62,2	61,3	66,5	61,7
% de DHA										
Frasco 1	45,4	45,8	46,6	48,2	45,3	46,4	47,9	47,4	48,9	46,4

Frasco 2	45,7	44,0	47,1	46,4	46,3	46,0	48,8	46,6	48,0	46,5
Média	45,5	44,9	46,9	47,3	45,8	46,2	48,4	47,0	48,4	46,5
DHA (mg/g)										
Frasco 1	260,1	256,6	277,2	310,6	281,1,	283,0	291,7	309,4	328,2	283,0
Frasco 2	241,4	251,1	292,7	279,8	274,2	281,7	315,4	271,9	320,9	294,9
Média	250,8	253,9	285,0	295,2	277,7	282,3	303,5	290,6	324,6	289,0
% de gordura (por mg/l)										
Frasco 1	57,3	56,0	59,4	64,4	62,1	61,0	60,9	65,2	67,1	60,9
Frasco 2	52,8	57,1	62,1	60,3	59,2	61,2	64,6	58,4	66,9	63,4
Média	55,1	56,5	60,8	62,4	60,6	61,1	62,7	61,8	67,0	62,2
Fat(g/l)										
Frasco 1	1,6	1,9	2,2	2,7	2,3	2,4	2,3	2,6	3,0	2,4
Frasco 2	1,6	1,9	2,4	2,1	2,1	2,3	2,6	2,1	2,8	2,6

Média	1,6	1,9	2,3	2,4	2,2	2,4	2,4	2,4	2,9	2,5
Rendimento de DHA (g/l)										
Frasco 1	0,7	0,9	1,0	1,3	1,0	1,1	1,1	1,2	1,5	1,1
Frasco 2	0,7	0,8	1,1	1,0	1,0	1,1	1,3	1,0	1,3	1,2
Média	0,7	0,9	1,1	1,1	1,0	1,1	1,2	1,1	1,4	1,2
% de EPA										
Frasco 1	19,2	20,1	18,7	16,7	20,4	19,0	16,1	17,5	15,5	19,3
Frasco 2	18,6	21,6	18,2	18,3	19,0	19,5	15,2	18,9	16,7	19,2
Média	18,9	20,8	18,5	17,5	19,7	19,2	15,6	18,2	16,1	19,3
EPA (mg/g)										
Frasco 1	108,2	110,3	109,2	105,8	124,7	113,6	96,1	112,2	102,5,	115,5
Frasco 2	96,3	121,4	111,1	108,4	110,6	117,3	96,3	108,1	110,0	120,0
Média	102,3	115,8	110,2	107,1	117,7	115,5	96,2	110,1	106,3	117,7

Rendimento de EPA (g/l)										
Frasco 1	0,3	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5	0,4	0,5	0,5	0,5
Frasco 2	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5
Média	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)										
Frasco 1	1,2	1,5	1,5	1,5	1,4	1,5	1,5	1,4	1,5	1,5
Frasco 2	1,4	1,4	1,5	1,4	1,5	1,5	1,4	1,5	1,4	1,5
Média	,1,3	1,5	1,5	1,4	1,4	1,5	1,4	1,5	1,4	1,5
% de 16:0										
Frasco 1	24,0	22,8	23,1	23,6	22,6	23,0	24,4	23,4	23,9	22,5
Frasco 2	24,2	22,7	23,1	23,8	23,1	22,8	24,5	23,0	23,6	22,5
Média	24,1	22,7	23,1	23,7	22,9	22,9	24,4	23,2	23,7	22,5
% de DPA n-3										

Frasco 1	1,1	1,0	1,2	1,0	1,2	1,1	1,1	1,1	1,0	1,1
Frasco 2	1,1	1,1	1,1	1,2	1,1	1,2	1,1	1,1	1,0	1,1
Média	1,1	1,1	1,1	1,1	1,2	1,2	1,1	1,1	1,0	1,1
% de DPA n-6										
Frasco a	2,1	2,1	2,3	2,5	2,1	2,2	2,4	2,4	2,6	2,2
Frasco 2	2,2	2,0	2,3	2,2	2,2	2,2	2,5	2,2	2,5	2,2
Média	2,1	2,0	2,3	2,3	2,2	2,2	2,5	2,3	2,5	2,2
% Total de ômega-3										
Frasco 1	65,7	66,9	66,5	66,0	66,9	66,5	65,1	66,0	65,4	66,9
Frasco 2	65,4	66,7	66,5	65,9	66,5	66,7	65,1	66,5	65,8	66,9
Média	65,6	66,8’	66,5	65,9	66,7	66,6	65,1	66,3	65,6	66,9
PH										
Frasco 1	6,81	6,83	6,84	6,83	6,82	6,82	6,83	6,83	6,82	6,81
Frasco 2	6,81	6,83	6,81	6,82	6,83	_ 6,82	6,82	6,82	6,82	6,81
Média	6,81	6,83	6,83	6,83	6,83	6,82	6,83	6,83	6,82	6,81

Tabela 21 (CONTINUAÇÃO)

Série de frascos agitados (SF)	**2**	**2**	**2**	**2**	**2**	**2**	**2**	**2**	**2**	**2**
ID do tratamento	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**	**1**	**J**
Conc. de vit. B12 (mg/l)	7680	3840	768	384	153,6	76,8	15,36	7,68	1,536	0
Conc. de 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)										
Frasco 1	2,01	4,17	4,176	3,764	4,276	4,218	3,916	4,44	4,59	3,676
Frasco 2	2,574	3,354	4,106	3,824	3,922	4,21	4,046	4,352	4,518	3,174
Média	2,292	3,762	4,141	3,794	4,099	4,214	3,981	4,396	4,554	3,425
% de gordura (por % da área)	28,8	62,2	64,4	60,5	65,3	58,8	58,2	66,4	63,0	61,4
Frasco 1	39,2	55,6	65,0	55,9	62,6	62,2	65,4	62,0	66,3	53,0,
Frasco 2	34,0	58,9	64,7	58,2	63,9	60,5	61,8	64,2	64,7	57:2
Média										

DHA	38,9	46,4	47,5	46,1	48,0	45,7	43,2	47,7	47,9	38,5
Frasco 1	40,9	41,3	46,9	43,6	46,3	47,1	45,2	47,6	47,5	35,3
Frasco 2	39,9	43,9	47,2	44,9	47,1	46,4	44,2	47,6	47,7	36,9
Média										
DHA (mg/g)	109,7	283,1	300,1	273,9	307,2	263,4	246,7	310,6	296,0	232,1
Frasco 1	157,3	225,4	299,0	239,5	284,4	287,8	290,3	289,4	309,4	183,6
Frasco 2	133,5	254,3	299,6	256,7	295,8	275,6	268,5	300,0	302,7	207,8
Média	28,8	62,2	64,4	60,5	65,3	58,8	58,2	66,4	63,0	61,4
% de gordura (por mg/g)										
Frasco 1	28,2	61,0	63,1	59,4	64,0	57,7	57,1	65,1	61,9	60,2
Frasco 2	38,5	54,5	63,7	54,9	61,4	61,1	64,2	60,8	65,1	52,0
Média	33,3	57,8	63,4	57,2	62,7	59,4	60,6	63,0	63,5	56,1
Gordura (g/l)										

Frasco 1	0,6	2,5	2,6	2,2	2,7	2,4	2,2	2,9	2,8	2,2
Frasco 2	1,0	1,8	2,6	2,1	2,4	2,6	2,6	2,6	2,9	1,7
Média	0,8	2,2	2,6	2,2	2,6	2,5	2,4	2,8	2,9	1,9
Rendimento de DHA (g/l)										
Frasco 1	0,2	1,2	1,3	1,0	1,3	1,1	1,0	1,4	1,4	0,9
Frasco 2	0,4	0,8	1,2	0,9	1,1	1,2	1,2	1,3	1,4	0,6
Média	0,3	1,0	1,2	1,0	1,2	1,2	1,1	1,3	1,4	0,7
% de EPA										
Frasco 1	22,9	19,0	18,8	17,4	17,1	18,8	21,6	18,0	16,4	28,3
Frasco 2	20,8	24,5	18,8	19,6	18,8	17,0	20,0	16,1	16,8	31,4
Média	21,8	21,8	18,8	18,5	17,9	17,9	20,8	17,0	16,6	29,8
EPA (mg/g)										
Frasco 1	63,9	114,9	117,4	102,4	108,3	107,6	122,1	115,8	100,5	168,9
Frasco 2	79,1	132,4	118,6	106,6	114,4	102,8	127,0	96,9	108,3	161,6

Média	71,5	123,6	118,0	104,5	111,4	105,2	124,5	106,4	104,4	165,2
Rendimento de EPA (g/l)										
Frasco 1	0,1	0,5	0,5	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,6
Frasco 2	0,2	0,4	0,5	0,4	0,5	0,4	0,5	0,4	0,5	0,5
Média	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)										
Frasco 1	1,4	1,6	1,5	1,5	1,5	1,8	1,7	1,5	1,8	1,5
Frasco 2	1,6	1,5	1,5	1,7	1,5	1,6	1,5	1,7	1,6	1,5
Média	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,7	1,6	1,6	1,7	1,5
% de 16:0										
Frasco 1	26,0	22,5	21,7	24,3	22,5	23,1	23,0	22,0	23,2	20,2
Frasco 2	25,9	22,1	21,9	24,2	22,6	23,3	22,5	23,5	23,1	19,9
Média	26,0	22,3	21,8	24,3	22,5	23,2	22,7	22,8	23,2	20,0

% de DPA n-3										
Frasco 1	1,5	1,0	1,1	1,0	1,0	1,0	1,0	0,9	1,0	1,4
Frasco 2	1,2	1,1	1,0	1,0	1,0	1,0	0,9	1,0	0,9	1,4
Média	1,4	1,0	1,1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,9	1,4
% de DPA n-6										
Frasco 1	1,3	2,3	2,3	2,3	2,5	2,3	1,9	2,4’	2,6	1,3
Frasco 2	1,7	1,6	2,3	2,1	2,3	2,5	2,1	2,6	2,5	1,1
Média	1,5	1,9	2,3	2,2	2,4	2,4	2,0	2,5	2,6	1,2
% Total de ômega-3										
Frasco 1	63,2	66,4	67,4	64,5	66,1	65,5	65,8	66,6	65,2	68,2
Frasco 2	62,9	66,9	66,7	64,2	66,1	65,1	66,1	64,6	65,2	68,1
Média	63,1	66,7	67,0	64,4	66,1	65,3	66,0	65,6	65,2	68,1
pH										
Frasco 1	6,70	6,69	6,72	6,71	6,71	6,72	6,71	6,71	6,72	6,71
Frasco 2	6,67	6,71	6,72	6,71	6,72	6,72	6,71	6,71	6,72	6,71

Média	6,69	6,70	6,72	6,71	6,72	6,72	6,71	6,71	6,72	6,71

Tabela 21 (CONTINUAÇÃO)

Série de frascos agitados (SN)	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**	**3**
ID do tratamento	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**	**I**	**J**
Conc. de vit. B12 (mg/l)	7680	3840	768	384	153,6	76,8	15,36	7,68	1,536	0
Conc. de 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)										
Frasco 1	2,786	2,92	4,108	3,258	3,524	4,258	3,974	3,794	3,74	3,902
Frasco 2	2,868	3,106	2,87	3,376	3,234	4,39	4,834	3,374	4,434	3,82
Média	2,827	3,013	3,489	3,317	3,379	4,324	4,404	3,584	4,087	3,861
% de gordura (por % da área)										
Frasco 1	42,6	41,0	54,5	46,5	50,7	59,8	57,0	51,0	55,9	62,3
Frasco 2	44,0	43,1	48,4	49,8	49,3	56,8	62,2	52,3	56,4	56,5

Média	43,3	42,0	51,4	48,1	50,0	58,3	59,6	51,7	56,2	59,4
% de DHA										
Frasco 1	42,0	39,8	43,0	43,1	43,1	44,8	45,4	44,0	43,4	45,4
Frasco 2	41,9	39,9	40,5	42,8	42,5	44,2	46,3	43,8	37,7	38,3
Média	41,9	39,9	41,8	42,9	42,8	44,5	45,9	43,9	40,6	41,9
DHA (mg/g)										
Frasco 1	177,2	161,7	232,4	198,4	216,2	265,6	256,5	222,5	240,8	280,2
Frasco 2	182,6	170,3	194,2	210,9	207,6	248,8	285,6	227,2	211,0	214,4
Média	179,9	166,0	213,3	204,6	211,9	257,2	271,1	224,8	225,9	247,3
% de gordura (por mg/g)										
Frasco 1	42,2	40,6	54,0	46,1	50,2	59,2	56,4	50,5	55,4	61,7
Frasco 2	43,6	42,7	47,9	49,3	48,9	56,3	61,7	51,9	55,9	56,0
Média	42,9	41,7	51,0	47,7	49,5	57,8	59,1	51,2	55,7	58,8

Gordura (g/l)										
Frasco 1	1,2	1,2	2,2	1,5	1,8	2,5	2,2	1,9	2,1	2,4
Frasco 2	1,2	1,3	1,4	1,7	1,6	2,5	3,0	1,7	2,5	2,1
Média	1,2	1,3	1,8	1,6	1,7	2,5	2,6	1,8	2,3	2,3
Rendimento de DHA (g/l)										
Frasco 1	0,5	0,5	1,0	0,6	0,8	1,1	1,0	0,8	0,9	1,1
Frasco 2	0,5	0,5	0,6	0,7	0,7	1,1	1,4	0,8	0,9	0,8
Média	0,5	0,5	0,8	0,7	0,7	1,1	1,2	0,8	0,9	1,0
% de EPA										
Frasco 1	22,4	24,7	23,9	22,0	23,5	22,1	20,9	22,3	23,8	21,3
Frasco 2	23,0	24,9	25,7	22,8	24,4	23,0	20,1	22,6	31,3	30,9
Média	22,7	24,8	24,8	22,4	24,0	22,6	20,5	22,4	27,5	26,1
EPA (mg/g)										
Frasco 1	93,6	99,2	127,3	100,4	116,5	129,6	116,7	111,3	130,2	129,9

Frasco 2	98,9	105,2	121,5	111,2	118,0	128,1	122,6	115,5	173,1	170,7
Média	96,2	102,2	124,4	105,8	117,2	128,8	119,7	113,4	151,6	, 150,3,
Rendimento de EPA (g/l)										
Frasco 1	0,3	0,3	0,5	0,3	0,4	0,6	0,5	0,4	0,5	0,5
Frasco 2	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,6	0,6	0,4	0,8	0,7
Média	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,6	0,5	0,4	0,6	0,6
IF DW (g/l)										
Frasco 1	1,6	1,7	1,9	1,8	1,8	1,7	1,7	1,9	1,7	1,5
Frasco 2	1,6	1,8	1,5	1,7	1,7	1,9	1,9	1,6	2,0	1,7
Média	1,6	1,8	1,7	1,7	1,7	1,8	1,8	1,8	1,8	1,6
% de 16:0										
Frasco 1	24,0	23,8	21,4	23,1	21,7	21,3	21,9	22,0	21,0	21,6
Frasco 2	23,5	23,5	21,7	22,8	21,4	21,0	21,5	22,0	18,2	18,0
Média	23,7	23,6	21,5	23,0	21,6	21,1	21,7	22,0	19,6	19,8

% de DPA n-3										
Frasco 1	1,2	1,2	1,0	1,2	1,2	1,0	1,0	1,1	1,0	0,9
Frasco 2	1,2	1,2	1,1	1,2	1,2	1,0	1,0	1,1	1,3	1,4
Média	1,2	1,2	1,1	1,2	1,2	1,0	1,0	1,1	1,2	1,1
% de DPA n- 6										
Frasco 1	1,7	1,4	1,8	1,8	1,8	2,0	2,1	1,9	1,8	2,1
Frasco 2	1,7	1,5	1,5	1,8	1,7	2,0	2,3	1,9	1,2	1,3
Média	1,7	1,5	1,7	1,8	1,8	2,0	2,2	1,9	1,5	1,7
% Total de ômega-3										
Frasco 1	65,6	65,8	67,9	66,3	67,7	67,9	67,4	67,4	68,2	67,6
Frasco 2	66,0	66,0	67,3	66,8	68,1	68,3	67,4	67,5	70,4	70,5
Média	65,8	65,9	67,6	66,6	67,9	68,1	67,4	67,5	69,3	69,1
pH										
Frasco 1	6,85	6,89	6,89	6,88	6,88	6,88	6,87	6,88	6,88	6,87

Frasco 2	6,86	6,89	6,89	6,88	6,88	6,89	6,86	6,87	6,88	6,86
Média	6,86	6,89	6,89	6,88	6,88	6,89	6,87	6,88	6,88	6,87

Tabela 21 (CONTINUAÇÃO)

Série de frascos agitados (SF)	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**	**4**	4
ID do tratamento	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**	**F**	**G**	**H**	**I**	J
Conc. de vit. B12 (mg/l)	7680	3840	768	384	153,6	76,8	15,36	7,68	1,536	0
Conc. de 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)										
Frasco 1	2,538	2,512	4,242	4,528 ,	2,498	3,796	3,79	3,87	3,676	3,972
Frasco 2	2,646	3,162	2,86	4,368	2,744	3,774	3,81	4,002	4,202	4,35
Média	2,592	2,837	3,551	4,448	2,621	3,785	3,8	3,936	3,939	4,161
% de gordura (por % da área)										

Frasco 1	42,5	41,9	57,5	66,7	43,6	58,1	58,2	60,0	57,1	59,2
Frasco 2	44,6	32,9	45,4	63,0	43,9	57,3	57,7	59,9	60,4	62,0
Média	43,5	37,4	51,5	64,9	43,8	57,7	57,9	59,9,	58,8	60,6
% de DHA										
Frasco 1	41,1	38,0	47,6	47,1	36,6	45,1	46,0	44,6	43,8	38,0
Frasco 2	40,2	40,8	40,0	46,7	39,0	45,5	45,1	45,9	46,7	40,2
Média	40,7	39,4	43,8	46,9	37,8	45,3	45,5	45,2	45,2	39,1
DHA (mg/g)										
Frasco 1	172,7	157,5	270,6	311,0	157,7	259,4	264,6	264,2	247,3	222,3
Frasco 2	177,2	132,8	179,6	290,9	169,2	257,3	257,1	271,7	278,5	246,0
Média	175,0	145,2	225,1	300,9	163,5	258,4	260,9	267,9	262,9	234,2
% de gordura (por mg/g)										
Frasco 1	42,0	41,4	56,9	66,0	43,1	57,5	57,5	59,3	56,5	58,5

Frasco 2	44,1	32,5	44,9	62,3	43,4	56,6	57,0	59,2	59,7	61,3
Média	43,0	37,0	50,9	64,1	43,2	57,0	57,3	59,3	58,1	59,9
Gordura (g/l)										
Frasco 1	1,1	1,0	2,4	3,0	1,1	2,2	2,2	2,3	2,1	2,3
Frasco 2	1,2	1,0	1,3	2,7	1,2	2,1	2,2	2,4	2,5	2,7
Média	1,1	1,0	1,8	2,9	1,1	2,2	2,2	2,3	2,3	2,5
Rendimento de DHA (g/l)										
Frasco 1	0,4	0,4	1,1	1,4	0,4	1,0	1,0	1,0	0,9	0,9
Frasco 2	0,5	0,4	0,5	1,3	0,5	1,0	1,0	1,1	1,2	1,1
Média	0,5	0,4	0,8	1,3	0,4	1,0	1,0	1,1	1,0	1,0
% de EPA										
Frasco 1	22,8	27,1	17,8	16,7	29,2	21,6	20,0	21,9	22,2	31,3
Frasco 2	24,5	24,4	26,7	19,5	26,3	21,0	20,9	20,5	19,2	28,5

Média	23,6	25,7	22,3	18,1	27,7	21,3	20,4	21,2	20,7	29,9
EPA (mg/g)										
Frasco 1	94,9	111,3	100,5	109,1	124,9	123,0	114,1	128,8	124,1	181,9
Frasco 2	106,9	78,5	118,8	120,4	113,0	118,1	117,9	120,4	113,7	173,2
Média	100,9	94,9	109,7	114,7	119,0	120,5	116,0	124,6	118,9	177,6
Rendimento de EPA (PSL)										
Frasco 1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,3	0,5	0,4	0,5	0,5	0,7
Frasco 2	0,3	0,3	0,3	0,5	0,3	0,4	0,5	0,5	0,5	0,8
Média	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)										
Frasco 1	1,5	1,5	1,8	1,5	1,4	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6
Frasco 2	1,5	2,1	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,7	1,7
Média	1,5	1,8	1,7	1,6	1,5	1,6	1,6	1,6	1,6	1,7

% de 16:0										
Frasco 1	24,1	23,1	22,7	24,5	22,4	21,6	22,3	21,7	22,3	17,8
Frasco 2	23,6	23,1	21,6	22,0	22,9	21,8	22,5	21,9	22,2	18,4
Média	23,9	23,1	22,1	23,3	22,7	21,7	22,4	21,8	22,2	18,1
% de DPA n-3										
Frasco 1	1,5	1,4	1,2	1,2	1,5	1,1	1,2	1,1	1,1	1,4
Frasco 2	1,5	1,3	1,5	1,1	1,4	1,1	1,1	1,1	1,2	1,3
Média	1,5	1,4	1,4	1,2	1,5	1,1	1,2	1,1,	1,1	1,3
% de DPA n-6										
Frasco 1	1,6	1,2	2,4	2,3	1,1	2,1	2,2	2,0	1,9	1,2
Frasco 2	1,5	1,6	1,4	2,2	1,3	2,1	2,1	2,2	2,2	1,4
Média	1,5	1,4	1,9	2,3	1,2	2,1	2,1	2,1	2,1	1,3
% Total de ômega-3										

Frasco 1	65,4	66,6	66,6	65,0	67,3	67,8	67,2	67,6	67,0	70,7
Frasco 2	66,2	66,5	68,2	67,3	66,8	67,6	67,0	67,5	67,1	70,0
Média	65,8	66,5	67,4	66,2	67,0	67,7	67,1	67,5	67,0	70,3
pH										
Frasco i	6,83	6,84	6,82	6,84	6,83	6,84	6,84	6,84	6,86	6,85
Frasco 2	6,82	6,84	6,81	6,84	6,83	6,84	6,84	6,84	6,84	6,85
Média	6,83	6,84	6,82	6,84	6,83	6,84	6,84	6,84	6,85	6,85

Exemplo 12

Gradientes de vitamina B12 para N° de Acesso na ATCC PTA-10208 a CO_2 10%

[226] Foram feitos experimentos para determinar a concentração de vitamina B12 que fornece crescimento de PTA-10208 e produtividade de EPA ótimos.

[227] **Temperatura:** 23°C

[228] **Velocidade da agitadora:** 200 rpm

[229] **Meio de base:** SDFM-O Definido (DSDFM-O)

[230] **Inóculo:** Descongelar um frasco de PTA-10208 em SDFM-O em condições ambientes. Transferir 2 ml de cultura em 48 ml de DSDFM-O a CO_2 10%. Transferir a cultura em DSDFM-O fresco (CO_2 10%) (veja a Tabela 22). Transferir a em DSDFM-O fresco (CO_2 10%). Usar a cultura para inocular experimento de gradiente de vitamina B12 Semana #1 (2 ml/frasco) (CO_2 10%).

[231] **Configuração experimental:**

[232] Todas as culturas foram desenvolvidas em frascos agitados de 50 ml e frascos em duplicata foram desenvolvidos para cada condição. PTA-10208 foi inoculado em gradientes de vitamina B12 de nove dias em DSDFM-O (sem tastona) a cada sete dias. Inóculos para cada concentração de vitamina B12 foram mantidos por toda a duração do experimento. Por continuação da transferência de PTA-10208 em concentrações reduzidas de vitamina B12, vitamina B12 em excesso foi eficazmente retirada por lavagem das células. Inóculos para cada concentração de vitamina B12 foram transferidos a cada sete dias. Inóculos com quatro dias de idade foram usados para iniciar cada gradiente de vitamina B12 de nove dias. Cada gradiente de nove dias é marcado

consecutivamente como Conjunto de Experimento A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, e abaixo na Tabela 23. Antes de cada inoculação de gradiente, a densidade óptica foi medida para cada concentração de vitamina B12 a fim de transferir aproximadamente a mesma quantidade de células. Após nove dias de crescimento, todas as culturas foram colhidas para medir o pH, peso seco e perfil de ácido graxo. O experimento foi terminado após ser constatado que os pesos secos em cada concentração de vitamina B12 se estabilizaram por pelo menos três gradientes de nove dias consecutivos.

Tabela 22. Meio de Fermentador Definido Reduzido Proporcionalmente para Orca (DSDFM-O).

Componente	Quant. por litro (g)	[Estoque] (g/l)	ml de estoque para usar por litro		g/l					mg/l				
					Na	K	Mg	Ca	Cl	Fe	Cu	Mn	Co	Zn
NaCl	0,625	Seco			0,25				0,38					
Na_2SO_4	7,52	Seco												
K_2SO_4	0,1	50	2 ml			0,04								
KCl	1	50	20 ml			0,52			0,48					
$MgSO_4.7H_2O$	5	227	22 ml				0,47							
$(NH_4)_2SO_4$	0,217	190	1,14 ml											
$CaCl_2.2H_2O$	0,29	Seco						0,08	0,14					
Monoidrato de MSG	2,16	Seco												
HEPES (100 mM) pH 7	23,8	Seco												
KH_2PO_4	0,136	56,5	2,4	Adicionar		0,04								

Componente	Quant. por litro (g)	[Estoque] (g/l)	ml de estoque para usar por litro		g/l					mg/l				
					Na	K	Mg	Ca	Cl	Fe	Cu	Mn	Co	Zn
				após autoclavagem										
Glicose	50	500	100 ml	Adicionar após autoclavagem										
Solução de citrato-Fe		Veja abaixo	10 ml	Adicionar após autoclavagem										
Metais-traço		Veja abaixo	1 ml	Adicionar após										

Componente	**Quant. por litro (g)**	**[Estoque] (g/l)**	**ml de estoque para usar por litro**		**g/l**					**mg/l**				
					Na	**K**	**Mg**	**Ca**	**Cl**	**Fe**	**Cu**	**Mn**	**Co**	**Zn**
				autoclavagem										
Vitaminas		Veja abaixo	1 ml	Adicionar após autoclavagem										
Solução de citrato-Fe														
Ácido cítrico	1175 mg	117,5												
$FeSO_4.7H_2O$	10,3 mg	1,03								2,07				
Solução de metal-traço														

Componente	Quant. por litro (g)	[Estoque] (g/l)	ml de estoque para usar por litro		g/l					mg/l				
					Na	K	Mg	Ca	Cl	Fe	Cu	Mn	Co	Zn
$MnCl_2.4H_2O$	3,1 mg	3,1										0,86		
$ZnSO_4.7H_2O$	9,3 mg	9,3												2,12
$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,04 mg	0,04												
$CuSO_4.5H_2O$	2,07 mg	2,07									0,53			
$NiSO_4.6H_2O$	2,07 mg	2,07												
pH até 2,5 com HCl														
Solução de vitamina														
Vitamina B12	0,768 mg	0,768												
Tiamina	11,7 mg	11,7												
Ca-Pantotenato	3,996 mg	3,996												

Componente	Quant. por litro (g)	[Estoque] (g/l)	ml de estoque para usar por litro		g/l					mg/l				
					Na	K	Mg	Ca	Cl	Fe	Cu	Mn	Co	Zn
Biotina	0,00434 mg	4,34 mg												
Totais de íons (ppm)						607,32			995,8536					

Tabela 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

[233] Sete gradientes de vitamina B12 consecutivos de 5x a 1/500x foram realizados. Ao final do último experimento, um novo experimento foi iniciado comparando o crescimento de PTA-10208 e a produção de EPA a 1/500x (0,0015 mg/l) e 0x (0 mg/l de vitamina B12). Quatro experimentos consecutivos de 1/500x vs. 0x de vitamina B12 foram realizados.

[234] **Resultados:**

[235] (Para 5x --> 1/500x de vitamina B12): Para sete experimentos de nove dias consecutivos, peso seco de PAT-10208, % de EPA, % de DHA, % de gordura e rendimento de EPA não se alteraram em concentrações de vitamina B12 que variam de 5x (3,84 mg/l) a 1/500x (0,0015 mg/l).

[236] (Para 1/500x e 0x de vitamina B12): Os resultados ao longo do período de quatro experimentos de nove dias consecutivos mostram que PTA-10208 que cresceu em DSDFM-O contendo 0 mg/l de vitamina B12 possui % bem maior de EPA do que quando cresceu com apenas 1/500x (0,0015

mg/l) de vitamina B12. Enquanto o % de EPA aumenta cerca de 18% com 1/500x (0,0015 mg/l) de vitamina B12 até cerca de 27% sem nenhuma vitamina B12, o % de DHA diminui cerca de 45% com 1/500x (0,0015 mg/l) de vitamina B12 até cerca de 36% sem nenhuma vitamina B12. O peso seco de PTA-10208 e o % de gordura aumentam ligeiramente quando a vitamina B12 é completamente removida de DSDFM-O. Em conseqüência do aumento no % de EPA e nos ligeiros aumentos no peso seco e no % de gordura, o rendimento de EPA de PTA-10208 aumenta cerca de 60% quando a vitamina B12 é removida de DSDFM-O.

[0237] Os resultados também são mostrados nas Figuras 20 - 49 e nas Tabelas abaixo.

Experimento Conjunto	AMOSTRA	O.D. do inóculo a 600 nm	mg/l de Vit B12	pH	Tara (g)	Peso Out (g)	Peso seco do pélete (g)	Biomassa g/l
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

Experimento Conjunto	AMOSTRA	O.D. do inóculo a 600 nm	mg/l de Vit B12	pH	Tara (g)	Peso Out (g)	Peso seco do pélete (g)	Biomassa g/l
	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
	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	10.6883	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	10.7886	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)	5.2460	0.038	6.82	10.4521	10.6539	0.2018	4.04
	1/20x (2)	5.2460	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
	1/500x (2)	4.6011	0.0015	6.83	10.3382	10.5746	0.2364	4.73

Experimento Conjunto	AMOSTRA	O.D. do inóculo a 600 nm	mg/l de Vit B12	pH	Tara (g)	Peso Out (g)	Peso seco do pélete (g)	Biomassa g/l
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	6.85	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	10.3864	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
	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

Experimento Conjunto	AMOSTRA	O.D. do inóculo a 600 nm	mg/l de Vit B12	pH	Tara (g)	Peso Out (g)	Peso seco do pélete (g)	Biomassa g/l
	1/500x (1)	5.1000	0.0015	6.79	10.3322	10.5868	0.2546	5.09
	1/500x (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
	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

Experimento Conjunto	AMOSTRA	% de 16:0	% de ARA	% de EPA	(n-6) DPA	(n-3) DPA	% de DHA	% gordura
A	5x (1)	27.53	1.67	16.01	2.22	2.33	41.72	67.22
	5x (2)	27.85	1.71	16.02	2.16	2.41	41.17	66.07
	1x (1)	27.73	1.72	16.00	2.15	2.44	41.08	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)	27.80	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

Experimento Conjunto	AMOSTRA	% de 16:0	% de ARA	% de EPA	(n-6) DPA	(n-3) DPA	% de DHA	% gordura
	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	2.38	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)	28.38	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
	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	15.08	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	16.62	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

Experimento Conjunto	AMOSTRA	% de 16:0	% de ARA	% de EPA	(n-6) DPA	(n-3) DPA	% de DHA	% gordura
	1/10x (1)	27.45	1.97	17.03	2.50	2.81	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	16.85	2.58	2.41	42.11	66.10
	1/20x (2)	27.30	2.00	17.94	2.42	2.45	41.50	66.30
	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
	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	65.13
	1/500x (2)	25.95	1.88	17.58	2.57	2.10	43.40	65.46
F	5x (1)	25.71	1.96	17.60	2.46	2.34	43.55	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	2.06	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	66.21
	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	1.96	43.85	65.37
	1/2x (1)	25.47	1.93	17.14	2.52	1.97	43.69	64.28

Experimento Conjunto	AMOSTRA	% de 16:0	% de ARA	% de EPA	(n-6) DPA	(n-3) DPA	% de DHA	% gordura
	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	18.08	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
	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	42.83	64.80
H	1/500x (1)	25.19	2.03	19.36	2.14	2.02	41.96	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	26.98	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

Experimento Conjunto	AMOSTRA	Rend. de EPA (g/l)	mg/g EPA	Rend. de DHA	(g/L) mg/g DHA	(g/L) LFDW	g B12/ g LFDW	g/l de gordura
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	104.68	1.35	290.83	1.59	0.00000094	3.23

Experimento Conjunto	AMOSTRA	Rend. de EPA (g/l)	mg/g EPA	Rend. de DHA	(g/L) mg/g DHA	(g/L) LFDW	g B12/ g LFDW	g/l de gordura
	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
	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	101.38	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)	0.46	98.98	1.20	272.75	1.71	0.000045	2.64
	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	292.62	1.67	0.0025	3.22
	5x (2)	0.49	106.70	1.29	287.91	1.63	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	116.85	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
	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	285.73	1.59	0.0000048	3.08
	1/100x	0.51	109.75	1.31	287.74	1.59	0.0000048	3.07

Experimento Conjunto	AMOSTRA	Rend. de EPA (g/l)	mg/g EPA	Rend. de DHA	(g/L) mg/g DHA	(g/L) LFDW	g B12/ g LFDW	g/l de gordura
	(2) 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	3.08
	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	1.66	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	104.86	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	116.20	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	294.68	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	1.83	0.00002328	3.06
	1/20x (2)	0.57	121.84	1.33	289.39	1.80	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
	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

Experimento Conjunto	AMOSTRA	Rend. de EPA (g/l)	mg/g EPA	Rend. de DHA	(g/L) mg/g DHA	(g/L) LFDW	g B12/ g LFDW	g/l de gordura
	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	108.22	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	3.87
K	1/500x (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	3.56

[238] **Conclusão:** O crescimento de PTA-10208 e a produtividade de EPA não se alteram em concentrações de vitamina B12 que variam entre 5x (3,84 mg/l) e 1/500x (0,0015 mg/l) em DSDFM-O a CO_2 10%. No entanto, quando a vitamina B12 é completamente removida de DSDFM-O, o % de EPA aumenta por cerca de 50%, enquanto o peso seco e o % de gordura também aumentam ligeiramente, resultando em um aumento de 60% na produtividade de EPA.

[239] Todos os vários aspectos, modalidades e opções aqui descritos podem ser combinados em qualquer e todas as variações.

[240] Todas as publicações, patentes e pedidos de patente mencionados nesse relatório descritivo são aqui incorporados por referência no mesmo grau como se cada publicação, patente ou pedido de patente individual fosse específica e individualmente indicado para ser incorporado por referência.

REIVINDICAÇÕES

1. Biomassa de um micro-organismo que possui ácidos graxos e uma concentração de EPA, caracterizada pelo fato de que a referida biomassa é produzida por um método que compreende:

(A) a fermentação do microrganismo em um vaso fermentador para produzir biomassa; e

(B) fornecer uma pressão sobre a biomassa maior ou igual a 3,44 KPa (0,5 psi) acima da pressão atmosférica durante um período de tempo suficiente para aumentar a concentração de EPA na biomassa.

2. Biomassa de um micro-organismo que possui ácidos graxos e uma concentração de EPA, caracterizada pelo fato de que a referida biomassa é produzida por um método que compreende:

(a) a fermentação do micro-organismo em um vaso fermentador para produzir um caldo de fermentação tendo uma fase aquosa e biomassa, em que a fase aquosa possui um gás dissolvido, em que o micro-organismo compreende um Traustoquitrídeo que produz uma biomassa que possui pelo menos 3% de EPA do peso total dos ácidos graxos; e

(b) atingir um nível desejado de EPA na biomassa por (i) ajuste do CO_2 dissolvido a >2% do gás dissolvido, e (ii) opcionalmente ajustar a pressão na biomassa e (iii) opcionalmente ajustar a temperatura do caldo de fermentação.

3. Biomassa de um micro-organismo que possui ácidos graxos e uma concentração de EPA, caracterizada pelo fato de que a referida biomassa é produzida por um método que compreende:

(a) a fermentação do micro-organismo em um vaso fermentador para produzir biomassa, em que o micro-organismo compreende um Traustoquitrídeo que produz uma biomassa que possui pelo menos 3% de EPA do peso total dos ácidos graxos; e

(b) atingir um nível desejado de EPA na biomassa por (i) ajuste da quantidade de biomassa no vaso, e (ii) opcionalmente ajustar a pressão na biomassa.

4. Biomassa de um micro-organismo que possui ácidos graxos e uma concentração de EPA, caracterizada pelo fato de que a referida biomassa é produzida por um método que compreende:

(a) a fermentação do micro-organismo em um vaso fermentador, para produzir um caldo de fermentação e uma biomassa, em que o micro-organismo compreende um Traustoquitrídeo que produz uma biomassa que possui pelo menos 3% de EPA do peso total dos ácidos graxos; e

(b) atingir um nível desejado de EPA na biomassa por (i) ajuste da temperatura no caldo de fermentação, e (ii) opcionalmente ajustar a pressão na biomassa.

5. Biomassa, de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que a temperatura é ajustada para menos que cerca de 30°C.

6. Biomassa de um micro-organismo que possui ácidos graxos e uma concentração de EPA, caracterizada pelo fato de que a referida biomassa é produzida por um método que compreende:

(a) a fermentação do micro-organismo em um vaso fermentador, compreendendo gás, para produzir uma biomassa, em que o micro-organismo compreende um Traustoquitrídeo que

produz uma biomassa que possui pelo menos 3% de EPA do peso total dos ácidos graxos; e

(b) atingir um nível desejado de EPA na biomassa por (i) ajuste dos níveis de CO_2 no gás e (ii) opcionalmente ajustar a pressão na biomassa.

7. Biomassa de um micro-organismo que possui ácidos graxos e uma concentração de EPA, caracterizada pelo fato de que a referida biomassa é produzida por um método que compreende:

(a) a fermentação do micro-organismo em um vaso fermentador, compreendendo gás, para produzir uma biomassa, em que o micro-organismo compreende um Traustoquitrídeo que produz uma biomassa que possui pelo menos 3% de EPA do peso total dos ácidos graxos; e

(b) suplementar o gás com CO_2 suficiente para aumentar a concentração de EPA na biomassa.

8. Biomassa de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que a quantidade de CO_2 é superior ou igual a 2% (mol) do gás na câmara e a concentração de EPA na biomassa é aumentada para mais de cerca de 4%, em peso , do peso total dos ácidos graxos.

9. Biomassa de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que a concentração de EPA é aumentada em mais do que cerca de 4% até cerca de 45%, em peso, do peso total dos ácidos graxos.

10. Biomassa de um microrganismo com ácidos graxos e uma concentração de EPA, caracterizada pelo fato de que a referida biomassa é produzida por um método compreendendo o crescimento do microrganismo em um meio de cultura que compreende menos do que 0,1 mg/L de vitamina B12 para

produzir uma biomassa.

11. Óleo extraído de uma biomassa como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que a biomassa é produzida a partir de um micro-organismo isolado depositado sob o número de acesso ATCC PTA-10208, em que o óleo compreende ácidos graxos em que os ácidos graxos compreendem adicionalmente ácidos graxos poli-insaturados ômega-3, em que os ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 compreendem DHA e EPA em uma quantidade de cerca de ≥ 90%, em peso, da quantidade total de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 e da quantidade de EPA, em peso, que é de cerca de 6% até cerca de 65% da quantidade total de EPA e DHA.

12. Óleo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o referido óleo é um óleo bruto extraído a partir da biomassa, sem processamento adicional.

13. Óleo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o referido óleo é um óleo refinado.

14. Produto para alimentação, caracterizado pelo fato de que compreende uma biomassa como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 10 ou um óleo como definido em qualquer uma das reivindicações 11 a 13.

15. Produto para alimentação de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que o referido produto alimentar é um suplemento alimentar humano ou animal.

16. Produto para alimentação de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que a referida

alimentação é uma ração para animais.

17. Produto para alimentação da reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que a referida alimentação é uma alimentação de aquicultura.

RESUMO

"BIOMASSA DE UM MICROORGANISMO, ÓLEO E PRODUTO PARA ALIMENTAÇÃO".

A presente invenção é dirigida a biomassas de microorganismos que possui ácidos graxos e uma concentração de EPA, óleos microbianos extraídos de uma biomassa produzida a partir de um microorganismo isolado depositado sob o número de acesso ATCC PTA-10208, em que o óleo compreende ácidos graxos em que os ácidos graxos compreendem adicionalmente ácidos graxos polinsaturados ômega-3, em que os ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 compreendem DHA e EPA em uma quantidade de cerca de ≥ 90%, em peso, da quantidade total de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e da quantidade de EPA, em peso, que é de cerca de 6% até cerca de 65% da quantidade total de EPA e DHA e produtos para alimentação que compreendem biomassa.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



F6916448E771F446

Campo 2



522BA07835778BC0

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 201501040 - Listagem de seq.txt
- Data de Geração do Código: 20-08-2015
- Hora de Geração do Código: 17:04:32
- Código de Controle:
    - Campo 1: F6916448E771F446
    - Campo 2: 522BA07835778BC0