

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034980**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.04.14

(51) Int. Cl. **C12P 7/64 (2006.01)**

(21) Номер заявки
201400151

(22) Дата подачи заявки
2012.07.20

(54) МИКРООРГАНИЗМЫ, ПРОДУЦИРУЮЩИЕ ЭЙКОЗАПЕНТАЕНОВУЮ КИСЛОТУ, КОМПОЗИЦИИ ЖИРНЫХ КИСЛОТ, СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 61/510,464

(32) 2011.07.21

(33) US

(43) 2014.10.30

(86) PCT/US2012/047728

(87) WO 2013/013208 2013.01.24

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ДСМ АйПи АСЕТС Б.В. (NL)

(72) Изобретатель:
Пфайфер Ш Джозеф У., Хансен Джон
Милтон, Гарсиа Хосе Р., Дун Сяо
Дэниель, Беренс Пол Уоррен, Эпт
Кирк Е. (US)

(74) Представитель:
Воробьева Е.В., Фелицына С.Б. (RU)

(56) US-B2-6607900

US-B2-7005280

YONGMANITCHAI et al. "Growth of and Omega-3 Fatty Acid Production by *Phaeodactylum tricornutum* under Different Culture Conditions"; *Appl. Environ. Microbiol.*; February 1991; Vol. 57, No. 2; Pages 419-425, especially pg. 421, col. 2, para 3, pg. 422, table 9.

YAZAWA et al. "Production of eicosapentaenoic acid from marine bacteria"; *Lipids*; March 1996; Vol. 31, Suppl.; pg. S297-300, especially abstract, pg. S299 fig 3.

BARCLAY et al. "Heterotrophic production of long chain omega-3 fatty acids utilizing algae and algae-like microorganisms"; *J. Appl. Phycology*; April 1994; Vol. 6, No. 2; Pages 123-129, especially pg. 125, col. 1, para 3, pg. 126, col. 2 para 2.

US-A1-20100285105

(57) Изобретение направлено на изолированные микроорганизмы, а также на их штаммы и мутанты, биомассы, микробные масла, композиции и культуры; способы получения микробных масел, биомасс и мутантов; и способы применения изолированных микроорганизмов, биомасс и микробных масел.

B1

034980

034980 B1

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение направлено на изолированные микроорганизмы, а также на их штаммы и мутанты, биомассы, микробные масла, композиции и культуры; способы получения микробных масел, биомасс и мутантов; и способы применения изолированных микроорганизмов, биомасс и микробных масел.

Уровень техники

Жирные кислоты классифицируют по длине и характеристикам насыщения углеродной цепи. Жирные кислоты называют короткоцепочечные, с цепью средней длины или длинноцепочечные жирные кислоты в зависимости от количества атомов углерода, присутствующих в цепи. Жирные кислоты называют насыщенными, если между атомами углерода не присутствуют двойные связи или ненасыщенными, если двойные связи присутствуют. Ненасыщенные длинноцепочечные жирные кислоты представляют собой мононенасыщенные жирные кислоты, когда присутствует только одна двойная связь, и полиненасыщенные жирные кислоты, когда присутствует больше чем одна двойная связь.

Полиненасыщенные жирные кислоты (PUFAs) классифицируются в зависимости от положения первой двойной связи, относительно метилового конца жирной кислоты: омега-3 (n-3) жирные кислоты содержат первую двойную связь при третьем углероде, тогда как омега-6 (n-6) жирные кислоты содержат первую двойную связь при шестом углероде. Например, докозагексаеновая кислота ("DHA") представляет собой омега-3 длинноцепочечную полиненасыщенную жирную кислоту (LC-PUFA) с длиной цепи, равной 22 углерода, и 6 двойными связями, часто обозначаемую как "22:6 n-3". Другие омега-3 LC-PUFAs включают эйкозапентаеновую кислоту ("EPA"), обозначаемую как "20:5 n-3", и омега-3 докозапентаеновую кислоту ("DPA n-3"), обозначаемую как "22:5 n-3". DHA и EPA называют "незаменимые" жирные кислоты. Омега-6 LC-PUFAs включают арахидоновую кислоту ("ARA"), обозначаемую как "20:4 n-6", и омега-6 докозапентаеновую кислоту ("DPA n-6"), обозначаемую как "22:5 n-6".

Омега-3 жирные кислоты представляют собой биологически важные молекулы, которые влияют на клеточную физиологию благодаря их присутствию в клеточных мембранах, способности регулировать выработку биологически активных соединений и экспрессию соответствующих генов и служить в качестве субстратов для биосинтеза. Roche H.M., Proc. Nutr. Soc. 58: 397-401 (1999). DHA, например, составляет примерно 15-20% липидов в коре головного мозга человека, 30-60% липидов в сетчатке, она сосредоточена в яйцах и сперме и представляет собой важный компонент грудного молока. Bergé J.P. и Barnathan G. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 96:49-125 (2005). DHA составляет вплоть до 97% омега-3 жирных кислот в мозге и вплоть до 93% омега-3 жирных кислот в сетчатке. Кроме того, DHA необходима как для развития плода, так и для развития младенцев, а также для поддержания когнитивных функций у взрослых. Id. Поскольку в организме человека омега-3 жирные кислоты не синтезируются *de novo*, данные жирные кислоты должны быть получены из пищевых источников.

Считается, что льняное масло и рыбий жир представляют собой хорошие пищевые источники омега-3 жирных кислот. Льняное масло не содержит EPA, DHA, DPA или ARA, а скорее содержит линоленовую кислоту (C18:3 n-3), строительный блок, позволяющий организму производить EPA. Однако существует доказательство того, что скорость метаболического превращения может быть медленной и изменчивой, в особенности у лиц с ослабленным здоровьем. Рыбьи жиры значительно различаются по типу и уровню жирных кислот в композиции в зависимости от конкретных видов и их рациона. Например, рыбы, происходящие из аквакультуры, как правило, имеют более низкий уровень омега-3 жирных кислот, чем рыбы из дикой природы. Кроме того, употребление рыбьего жира связано с риском, поскольку в нем могут присутствовать загрязнители окружающей среды, а также могут возникать проблемы, связанные с его стабильностью и наличием рыбного привкуса или запаха.

Траустохитриды представляют собой микроорганизмы порядка Thraustochytriales. Траустохитриды включают представителей рода Schizochytrium и Thraustochytrium, и они были признаны в качестве альтернативного источника омега-3 жирных кислот, включая DHA и EPA. См. патент США № 5130242. Масла, получаемые из данных морских гетеротрофных микроорганизмов, часто имеют более простые профили полиненасыщенных жирных кислот по сравнению с соответствующими маслами рыб или микроскопических водорослей. Lewis T.E., Mar. Biotechnol. 1: 580-587 (1999). Сообщалось о том, что штаммы траустохитридных видов продуцируют омега-3 жирные кислоты с высоким процентным содержанием от общего количества жирных кислот, производимых этими организмами. Патент США № 5130242; Huang J. et al., J. Am. Oil. Chem. Soc. 78: 605-610 (2001); Huang J. et al., Mar. Biotechnol. 5: 450-457 (2003). Однако изолированные траустохитриды различаются по составу и количеству произведенных LC-PUFAs, так что некоторые из ранее описанные штаммов могут иметь нежелательные уровни омега-6 жирных кислот и/или могут демонстрировать низкую продуктивность в культуре. Таким образом, сохраняется потребность в выделении микроорганизмов, демонстрирующих высокую производительность и желательные профили LC-PUFA.

Раскрытие изобретения

Заявители обнаружили, что количество EPA и DHA, продуцируемое траустохитридами, которые производят биомассу, содержащую по меньшей мере 3% EPA, можно модулировать, изменяя количество растворенного углекислого газа (CO₂) в водной фазе ферментационного бульона в процессе ферментации микроорганизма. В настоящем документе предлагается способ получения биомассы микроорганизма,

содержащего жирные кислоты с некоторой концентрацией EPA, включающий ферментирование микроорганизма в сосуде ферментера, в котором газ растворен в ферментационном бульоне, для получения биомассы, в которой микроорганизм включает траустохитрида, который производит биомассу, содержащую по меньшей мере 3% EPA по отношению к общей массе жирных кислот; и регулирование уровней растворенного CO₂ в растворенном газе. В одном из воплощений уровни растворенного CO₂ могут быть отрегулированы для достижения желаемого уровня EPA и/или ДНА в биомассе. В дополнительном воплощении количество растворенного CO₂ в водной фазе ферментационного бульона изменяется в пределах от примерно 38 до примерно 600 м.д. (частей на миллион или миллионных долей) по отношению к общему количеству растворенного газа и, в особенности, от примерно 38 до примерно 135 м.д. по отношению к общему количеству растворенного газа.

Дополнительно настоящий документ обеспечивает способ получения биомассы микроорганизмов, содержащей жирные кислоты с некоторой концентрацией EPA, включающий ферментирование микроорганизма в сосуде ферментера, включающего газ, для получения биомассы, в которой микроорганизм включает траустохитрид, который производит биомассу, содержащую по меньшей мере 3% EPA по отношению к общей массе жирных кислот; и добавление к газу CO₂. Добавление означает добавить или загрузить в сосуды CO₂ в количестве, дополнительно по отношению к количеству, производимому в ходе ферментации клеток, или к количеству в окружающих условиях. В одном из воплощений CO₂ добавляют в сосуд для достижения желаемого количества EPA и/или ДНА в биомассе.

Кроме того, настоящий документ обеспечивает способ получения биомассы микроорганизмов, содержащей жирные кислоты с некоторой концентрацией EPA, включающий: ферментирование микроорганизма в сосуде ферментера для получения биомассы, в которой микроорганизм включает траустохитрид, который производит биомассу, содержащую по меньшей мере 3% EPA по отношению к общей массе жирных кислот; и регулирование количества биомассы в сосуде. В воплощении изобретения биомассу регулируют для достижения желаемого уровня EPA или ДНА в биомассе.

Способ получения микроорганизма, содержащего жирные кислоты с некоторой концентрацией EPA, включающий ферментирование микроорганизма в сосуде ферментера для получения биомассы, в которой микроорганизм включает траустохитрида, который производит биомассу, содержащую по меньшей мере 3% EPA по отношению к общей массе жирных кислот; и регулирование давления на биомассу, например, без ограничений, контролирование противодействия в сосуде. В одном из воплощений давление регулируют для достижения желаемого уровня EPA или ДНА в биомассе.

В другом воплощении настоящий документ обеспечивает способ получения микроорганизма, содержащего жирные кислоты с некоторой концентрацией EPA, включающий ферментирование микроорганизма в сосуде ферментера для получения ферментационного бульона и биомассы, в котором микроорганизм включает траустохитрид, который производит биомассу, содержащую по меньшей мере 3% EPA по отношению к общей массе жирных кислот; и регулирование температуры в бульоне. В одном из воплощений температуру регулируют для достижения желаемого уровня EPA и/или ДНА в биомассе.

В различных воплощениях количество EPA и ДНА также можно модулировать, регулируя количество CO₂, растворенного в водной фазе или в ферментационном бульоне сосуда, путем увеличением или снижением количества CO₂ в сосуде. Количество растворенного CO₂ можно регулировать путем дополнительного регулирования количества ферментируемой биомассы. Например, проводя ферментирование клеток в колбах и в сосудах для ферментирования увеличенного размера. Также в соответствии с воплощениями настоящего документа можно изменять количество EPA и ДНА путем изменения температуры. Количество растворенного CO₂ можно дополнительно скорректировать, например, регулируя температуру в сосуде. Например, снижение температуры в сосуде приведет к более высоким концентрациям EPA и к снижению концентраций ДНА. Количество растворенного CO₂ может быть дополнительно скорректировано регулированием давления в сосуде. Например, увеличение давления, вероятно, приведет к увеличению концентрации растворенного CO₂, что приведет к увеличению количества EPA и снижению количества ДНА в биомассе. Каждая из описанных выше регулировок, например, дополнительный CO₂, увеличение или снижение биомассы, увеличение или снижение температуры или увеличение или снижение давления, может быть объединена с любой из других регулировок для достижения желаемого уровня EPA и ДНА в биомассе и уровня любого масла, экстрагируемого из биомассы. Растворение CO₂ можно также регулировать изменением pH.

В некоторых воплощениях общее количество EPA и ДНА остается относительно постоянным по сравнению с количеством, по массе, от общей массы жирных кислот и омега-3 жирных кислот.

В дополнительных воплощениях содержание EPA или ДНА в биомассе измеряют перед выполнением регулировки количества дополнительного CO₂, давления, температуры или биомассы.

Не желая связывать себя с какой-либо теорией, предположили, что увеличение и уменьшение в количествах EPA или ДНА непосредственно связано с количеством CO₂, растворенного в водной фазе ферментационного бульона и что описанные выше регулировки CO₂, давления и температуры, изменяют количество растворенного в биомассе CO₂.

В некоторых воплощениях изобретение обеспечивает способ получения биомассы микроорганизмов, содержащей увеличенную концентрацию EPA, способ, включающий рост микроорганизм в культу-

ральной среде, включающей менее чем 0,1 мг/л витамина B12 для получения биомассы. В некоторых воплощениях культуральная среда включает менее чем 0,01 мг/л витамина B12. В некоторых воплощениях культуральная среда включает менее чем 0,001 мг/л витамина B12. В дополнительных воплощениях культуральная среда включает менее чем 0,0001 мг/л витамина B12. В некоторых воплощениях культуральная среда не содержит витамина B12.

В некоторых воплощениях культуральная среда дополнительно включает менее чем 1 г дрожжевого экстракта на 50 г свободной от липидов биомассы. В некоторых воплощениях культуральная среда дополнительно включает менее чем 0,5 г дрожжевого экстракта на 50 г свободной от липидов биомассы. В дополнительных воплощениях культуральная среда дополнительно включает менее чем 0,1 г дрожжевого экстракта на 50 г свободной от липидов биомассы.

В некоторых воплощениях концентрация EPA увеличивается по меньшей мере на 400% по сравнению с концентрацией EPA в биомассе, полученной от микроорганизмов, выращенных в культуральной среде, включающей более чем 0,1 мг/л витамина B12. В некоторых воплощениях концентрация EPA увеличивается по меньшей мере на 300% по сравнению с концентрацией EPA в биомассе от микроорганизма, выращенного в культуральной среде, включающей более чем 0,01 мг/л витамина B12. В дополнительных воплощениях концентрация EPA увеличивается по меньшей мере на 200% по сравнению с концентрацией EPA в биомассе от микроорганизма, выращенного в культуральной среде, включающей более чем 0,001 мг/л витамина B12. В некоторых воплощениях концентрация EPA увеличивается по меньшей мере на 100% по сравнению с концентрацией EPA в биомассе от микроорганизма, выращенного в культуральной среде, включающей более чем 0,0001 мг/л витамина B12.

В некоторых воплощениях изобретение обеспечивает способ получения биомассы микроорганизмов, содержащей увеличенную концентрацию EPA, включающий рост микроорганизма в культуральной среде, включающей менее чем 0,1 мг/л кобальта для получения биомассы. В некоторых воплощениях культуральная среда включает менее чем 0,01 мг/л кобальта. В некоторых воплощениях культуральная среда включает менее чем 0,001 мг/л кобальта. В дополнительных воплощениях культуральная среда включает менее чем 0,0001 мг/л кобальта. В некоторых воплощениях культуральная среда не содержит кобальта.

В некоторых воплощениях микроорганизм является представителем траустохитрид. В некоторых воплощениях микроорганизм продуцирует по меньшей мере 3% EPA по отношению к общей массе жирных кислот.

В некоторых воплощениях уровень растворенного CO₂ в культуральной среде равен по меньшей мере 5%. В дополнительных воплощениях уровень растворенного CO₂ в культуральной среде равен по меньшей мере 10%. В некоторых воплощениях уровень растворенного CO₂ в культуральной среде равен по меньшей мере 15%.

Изобретение также обеспечивает изолированную биомассу и микробное масло, экстрагируемое из биомассы любым способом в соответствии с настоящим документом.

Краткое описание чертежей

Различные воплощения изобретения могут стать более понятным из последующего подробного описания, фигур и прилагаемого описания последовательностей, которые составляют часть этой заявки.

На фиг. 1 показана производительность РТА-9695 в градиенте тиамина;

на фиг. 2 - производительность РТА-9695 в градиенте витамина B12;

на фиг. 3 - производительность РТА-9695 в градиенте биотина;

на фиг. 4 - производительность РТА-9695 в градиенте Са-пантотената;

на фиг. 5 - производительность РТА-9695 в TFSM-стандартах;

на фиг. 6-19 - производительность РТА-9695 в градиенте витамина B12 при 10% CO₂;

на фиг. 20-49 - производительность РТА-10208 в градиенте витамина B12 при 10% CO₂.

Осуществление изобретения

Способы и композиции, обеспеченные настоящим документом, в особенности применимы к траустохитриду, который производит биомассу, содержащую по меньшей мере 3% EPA по отношению к продуцируемой им общей массе жирных кислот. Конкретный траустохитрид, который производит биомассу, содержащую по меньшей мере 3% EPA, который предлагается в настоящем документе, представляет собой изолированный микроорганизм вида, депонированного в АТСС под номером доступа РТА-10212. Изолированный микроорганизм, связанный с номером доступа АТСС РТА-10212, был депонирован согласно Будапештскому договору, 14 июля 2009, в Американской коллекции типовых культур, Патентный депозитарий, 10801 университет Boulevard, Манассас, VA 20110-2209.

Конкретный траустохитрид, который производит биомассу, содержащую по меньшей мере 3% EPA, выбирают из изолированного микроорганизма, депонированного в АТСС под номерами доступа РТА-10212, РТА-10213, РТА-10214, РТА-10215, РТА-10208, РТА-10209, РТА-10210 или РТА-10211.

Конкретное воплощение, обеспеченное настоящим документом, направлено на изолированный микроорганизм, включающий 18s rRNA, включающую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1 или полинуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 94% идентичности с SEQ ID NO: 1.

Конкретное воплощение, обеспеченное настоящим документом, направлено на изолированный микроорганизм, включающий полинуклеотидную последовательность 18s rRNA, которая имеет по меньшей мере 94% идентичности с полинуклеотидной последовательностью 18s rRNA микроорганизма, депонированного в АТСС под номером доступа РТА-10212.

Конкретный траустохитрид, который производит биомассу, содержащую по меньшей мере 3% ЕРА, обеспечиваемый настоящим документом, направлен на изолированный микроорганизм вида, депонированного в АТСС под номером доступа РТА-10208.

Конкретное воплощение, обеспеченное настоящим документом, направлено на изолированный микроорганизм вида, депонированного в АТСС под номером доступа РТА-10208, в котором общее содержание жирных кислот, продуцируемых микроорганизмом, включает более чем примерно 10 мас.% эйкозапентаеновой кислоты.

Конкретный траустохитрид настоящего изобретения, который производит биомассу, содержащую по меньшей мере 3% ЕРА, по настоящему изобретению представляет собой изолированный микроорганизм, имеющий характеристики вида, депонированного в АТСС под номером доступа РТА-10208, в котором общее содержание жирных кислот, продуцируемых микроорганизмом, включает более чем примерно 10 мас.% эйкозапентаеновой кислоты. Конкретный обеспечиваемый настоящим документом траустохитрид, который производит биомассу, содержащую по меньшей мере 3% ЕРА, выбирают из изолированного микроорганизма, выбираемого из мутантного штамма, депонированного в АТСС под номерами доступа РТА-10209, РТА-10210 или РТА-10211. Микроорганизмы, связанные с номерами доступа АТСС РТА-10209, РТА-10210 и РТА-10211, были депонированы согласно Будапештскому договору 25 сентября 2009 в Американской коллекции типовых культур, Патентный депозитарий, 10801 университет Boulevard, Манассас, VA 20110-2209.

Воплощения, обеспечиваемые настоящим документом, направлены на описанные выше микроорганизмы, их мутантные штаммы и микроорганизмы, определенные в заявке на патент США № 12/729013, включено в настоящий документ путем отсылки во всей своей полноте.

Воплощение, обеспечиваемое настоящим документом, направлено на изолированный микроорганизм, который производит фракцию триацилглицеридов, в которой содержание эйкозапентаеновой кислоты во фракции триацилглицеридов, равно по меньшей мере примерно 12 мас.%.

Воплощение, обеспечиваемое настоящим документом, направлено на изолированную биомассу, в которой по меньшей мере примерно 20 мас.% по отношению к сухой массе клеток биомассы составляют жирные кислоты, в которой более чем примерно 10% от массы жирных кислот составляет эйкозапентаеновая кислота и в которой жирные кислоты включают менее чем примерно 5 мас.% каждой из арахидоновой кислоты и докозапентаеновой кислоты n-6. В некоторых воплощениях по меньшей мере примерно 25 мас.% жирных кислот составляет докозагексаеновая кислота.

В некоторых воплощениях настоящее изобретение направлено на изолированную биомассу, включающую триглицерид, в котором по меньшей мере примерно 12% от массы триглицерида составляет эйкозапентаеновая кислота.

В некоторых воплощениях изобретение направлено на любую изолированную биомассу изобретения, в которой жирные кислоты дополнительно включают менее чем примерно 5 мас.% каждой из олеиновой кислоты, линолевой кислоты, линоленовой кислоты, эйкозеновой кислоты и эруковой кислоты.

Настоящее изобретение направлено на изолированный траустохитридный микроорганизм тех видов траустохитрид, которые депонированы в АТСС под номером доступа РТА-9695, или на полученный из него штамм, в котором общее содержание жирных кислот, продуцируемое указанным микроорганизмом или полученным из него штаммом, включают примерно 10% или менее по массе эйкозапентаеновой кислоты. Воплощение, обеспечиваемое настоящим документом, направлено на описанный выше микроорганизм или на полученный из него штамм и на другой родственный микроорганизм, описанный в публикации заявки на патент США No. US 2010/0239533, включенной в настоящий документ путем отсылки во всей своей полноте.

Кроме того, настоящий документ обеспечивает способ увеличения концентрации ЕРА в биомассе микроорганизма, содержащего жирные кислоты и некоторую концентрацию ЕРА, включающий ферментирование микроорганизма в сосуде ферментера, включающего газ, для получения биомассы, в которой микроорганизм включает траустохитрид, который производит биомассу, содержащую по меньшей мере 3% ЕРА по отношению к общей массе жирных кислот; и добавление к газу CO_2 в количестве, достаточном для увеличения концентрации ЕРА в биомассе. Увеличение в концентрации ЕРА можно сравнить, например, с концентрацией ЕРА, при ферментировании аналогичным образом в присутствии микроорганизма, но без дополнительного CO_2 , или при сравнении с аналогичным ферментированием в присутствии микроорганизма, но в условиях окружающей среды.

В другом воплощении количество CO_2 , достаточное для увеличения концентрации ЕРА, превышает или равно 2% от общего количество газа в сосуде. В другом воплощении количество CO_2 в сосуде превышает или равно от примерно 5% вплоть до примерно 20% от общего количество газа в сосуде. В другом воплощении количество CO_2 в сосуде превышает или равно от примерно 5% вплоть до примерно 15% от общего количество газа в сосуде.

В дополнительном воплощении количество дополнительного CO₂ превышает или равно 2% от общего количества газа в сосуде для увеличения концентрации ЕРА в биомассе до более чем примерно 4 мас.% по отношению к общей массе жирных кислот, конкретнее, от примерно более чем 4% вплоть до примерно 45%, по массе по отношению к общей массе жирных кислот, конкретнее, от примерно более чем 4% вплоть до примерно 40% по отношению к общей массе жирных кислот.

В дополнительном воплощении количество дополнительного CO₂ было достаточно для увеличения уровней ЕРА от примерно 4% до диапазона от примерно 6 до 30 мас.% по отношению к общей массе жирных кислот. В другом воплощении количество обеспечиваемого CO₂ было достаточно для увеличения концентрации ЕРА от примерно 15% вплоть до примерно 40 мас.% по отношению к общей массе жирных кислот. В другом воплощении количество обеспечиваемого CO₂ было достаточно для увеличения концентрации ЕРА до более чем 20 мас.% по отношению к общей массе жирных кислот. В другом воплощении обеспечиваемого CO₂ было достаточно для увеличения концентрации ЕРА от примерно 20% вплоть до примерно 25%.

В другом воплощении предлагается способ увеличения концентрации ЕРА в биомассе микроорганизма, содержащего жирные кислоты и некоторую концентрацию ЕРА, включающий ферментирование микроорганизма в сосуде ферментера для получения биомассы; обеспечивая давление на биомассу, достаточное для увеличения концентрации ЕРА в биомассе. Увеличение в концентрации ЕРА можно сравнить, например, с концентрацией ЕРА при ферментировании аналогичным образом в присутствии микроорганизма, но без обеспечения давления или при сравнении с аналогичным ферментированием в присутствии микроорганизма, но в условиях окружающей среды. В дополнительном воплощении давление, осуществляемое на биомассу, примерно на 0,5 psi превышает атмосферное давление. В другом воплощении давление напора (или обратное давление) в сосуде превышает или равно примерно 0,4 фунт/кв. дюйм, конкретнее, от примерно 0,4 psi вплоть до примерно 30 фунт/кв. дюйм, еще конкретнее, от примерно 1 вплоть до примерно 30 фунт/кв. дюйм. В другом воплощении давление напора в сосуде равно от примерно 1 вплоть до примерно 20 фунт/кв. дюйм. В другом воплощении обеспечиваемое давление прилагают в течение времени, достаточном для регулирования количества ЕРА в биомассе, в особенности в течение вплоть до 120 ч.

В другом воплощении предлагается способ получения биомассы микроорганизмов, продуцирующих жирные кислоты и увеличенную концентрацию ЕРА, включающий ферментирование микроорганизма в сосуде ферментера для получения биомассы, в которой микроорганизм включает траустохитрид, который производит биомассу, содержащую по меньшей мере 3% ЕРА по отношению к общей массе жирных кислот при температуре, достаточной для увеличения концентрации ЕРА в биомассе. В некоторых воплощениях температура, достаточная для увеличения уровней ЕРА, равна менее чем примерно 30°C, конкретнее меньше или равна примерно 22°C и, конкретнее, температура меньше или равна примерно 21°C. Увеличение в концентрации ЕРА можно сравнить, например, с концентрацией ЕРА при ферментировании аналогичным образом в присутствии микроорганизма, но температура при этом не была отрегулирована, или при сравнении с аналогичным ферментированием в присутствии микроорганизма в условиях окружающей среды.

В дополнительном воплощении в способах, обеспечиваемых настоящим документом, изменяют количества ЕРА, образующееся в процессе ферментации, для получения биомассы и экстрагированного масла, в которых количество обеспечиваемого ЕРА равно более чем 4%, в особенности от примерно более чем 4% вплоть до примерно 45%, конкретнее от примерно более чем 4% вплоть до примерно 40 мас.% по отношению к общей массе жирных кислот. В другом воплощении количество ЕРА, продуцируемое способом, обеспечиваемым настоящим документом, равно от примерно 6% вплоть до примерно 30 мас.% по отношению к общей массе жирных кислот. В дополнительном воплощении количество ЕРА, продуцируемое способом, обеспечиваемым настоящим документом, равно от примерно 15% вплоть до примерно 40 мас.% по отношению к общей массе жирных кислот. В дополнительном воплощении количество ЕРА, продуцируемое способом, обеспечиваемым настоящим документом, превышает примерно 20%, конкретнее от примерно 20% вплоть до примерно 25 мас.% по отношению к общей массе жирных кислот.

В дополнительном воплощении желаемый уровень обеспечиваемого ЕРА превышает 4%, в особенности он равен от примерно более чем 4% вплоть до примерно 45%, конкретнее от примерно более чем 4% вплоть до примерно 40 мас.% по отношению к общей массе жирных кислот. В другом воплощении желаемый уровень ЕРА, продуцируемой способом, обеспечиваемым настоящим документом, равен от примерно 6% вплоть до примерно 30 мас.% по отношению к общей массе жирных кислот. В дополнительном воплощении желаемый уровень ЕРА, продуцируемой способом, обеспечиваемым настоящим документом, равен от примерно 15% вплоть до примерно 40 мас.% по отношению к общей массе жирных кислот. В дополнительном воплощении желаемый уровень ЕРА, продуцируемой способом, обеспечиваемым настоящим документом, превышает примерно 20%, конкретнее, равен от примерно 20% вплоть до примерно 25 мас.% по отношению к общей массе жирных кислот.

Способ увеличения концентрации ЕРА в биомассе микроорганизма, содержащего жирные кислоты и увеличенную концентрацию ЕРА, включающий ферментирование микроорганизма в сосуде ферменте-

ра для получения биомассы, в которой траустохитридный микроорганизм производит биомассу, содержащую по меньшей мере 3% ЕРА по отношению к общей массе жирных кислот; и увеличение биомассы в количестве достаточном для увеличения концентрации ЕРА в биомассе. В некоторых воплощениях количество биомассы, достаточное для увеличения концентрации ЕРА, имеет плотность, превышающую или равную 10 г/л. В некоторых воплощениях количество биомассы, достаточное для увеличения концентрации ЕРА, имеет плотность, равную от примерно 10 г/л вплоть до примерно 250 г/л. Увеличение в концентрации ЕРА можно сравнить, например, с концентрацией ЕРА при аналогичном ферментировании в присутствии микроорганизма, но без увеличения биомассы.

В некоторых воплощениях концентрация ЕРА в биомассе, выращенной в культуральной среде, включающей повышенный уровень CO_2 (например, в сосуде, включающем CO_2 в количестве, превышающем или равным 2%, превышающем или равным 5%, превышающем или равным 10%, превышающем или равным 15%, превышающем или равным 20%, от 5 до 20% или от 5 до 15% от общего количества газа в сосуде), по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 250%, по меньшей мере на 500%, по меньшей мере на 750%, по меньшей мере на 1000%, по меньшей мере на 1100%, по меньшей мере на 1200%, по меньшей мере на 1300%, по меньшей мере на 1400%, по меньшей мере на 1500%, по меньшей мере на 1600%, по меньшей мере на 1700%, по меньшей мере на 1800%, по меньшей мере на 1900% или по меньшей мере на 2000% превышает концентрацию ЕРА в биомассе, полученной от микроорганизма, выращенного в культуральной среде, включающей пониженный уровень CO_2 (например, в сосуде, включающем CO_2 в количестве, равном менее чем 2%, менее чем 5%, менее чем 10%, менее чем 15%, менее чем 20%, от 0 до 4% или 1 до 3% от общего количества газа в сосуде соответственно). Например, концентрация ЕРА в биомассе, выращенной в культуральной среде, включающей повышенный уровень CO_2 (например, в сосуде, включающем CO_2 в количестве, превышающем или равным 2%, превышающем или равным 5%, превышающем или равным 10%, превышающем или равным 15%, превышающем или равным 20, от 5 до 20% или от 5 до 15% от общего количества газа в сосуде), по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 250%, по меньшей мере на 500%, по меньшей мере на 750%, по меньшей мере на 1000%, по меньшей мере на 1100%, по меньшей мере на 1200%, по меньшей мере на 1300%, по меньшей мере на 1400%, по меньшей мере на 1500%, по меньшей мере на 1600%, по меньшей мере на 1700%, по меньшей мере на 1800%, по меньшей мере на 1900% или по меньшей мере на 2000% превышает концентрацию ЕРА в биомассе, полученной от микроорганизма, выращенного в сосуде при уровне CO_2 , равному уровню в окружающей среде.

Витамин В12 в культуральной среде.

Термин "витамин В12", как применен в настоящем документе, относится к классу химически родственных соединений как в природной, так и в синтетической формах, включая, без ограничений, витамин В12, кобаламин, цианокобаламин и гидроксокобаламин. В некоторых воплощениях изобретение обеспечивает способы увеличения концентрации ЕРА в биомассе микроорганизма, который продуцирует ЕРА путем выращивания микроорганизма в культуральной среде, содержащей низкие уровни витамина В12 или в культуральной среде, не содержащей витамина В12. В некоторых воплощениях изобретение обеспечивает способы получения биомассы микроорганизмов, содержащей увеличенную концентрацию ЕРА, включающие рост микроорганизма в культуральной среде, включающей менее чем 0,1 мг/л витамина В12, для получения биомассы. В некоторых воплощениях культуральная среда включает менее чем 0,05 мг/л, менее чем 0,01 мг/л, менее чем 0,005 мг/л, менее чем 0,001 мг/л, менее чем 0,0005 мг/л, менее чем 0,0001 мг/л или не включает витамин В12.

В некоторых воплощениях культуральная среда включает менее чем 1 г источников витамина В12 (таких как дрожжевой экстракт, твердые вещества кукурузного экстракта, соевая мука и другие сложные источники азота) на 50 г свободной от липидов биомассы. В некоторых воплощениях культуральная среда включает менее чем 0,8 г, менее чем 0,5 г, менее чем 0,3 г, менее чем 0,1 г, менее чем 0,05 г или менее чем 0,01 г таких источников витамина В12 на 50 г свободной от липидов биомассы. В некоторых воплощениях культуральная среда дополнительно включает менее чем 1 г дрожжевого экстракта на 50 г свободной от липидов биомассы, менее чем 0,8 г дрожжевого экстракта на 50 г свободной от липидов биомассы, менее чем 0,5 г дрожжевого экстракта на 50 г свободной от липидов биомассы, менее чем 0,3 г дрожжевого экстракта на 50 г свободной от липидов биомассы, менее чем 0,1 г дрожжевого экстракта на 50 г свободной от липидов биомассы, менее чем 0,05 г дрожжевого экстракта на 50 г свободной от липидов биомассы или менее чем 0,01 г дрожжевого экстракта на 50 г свободной от липидов биомассы. Так как применен в настоящем документе, термин "свободная от липидов биомасса" относится к целевой сухой массе обезжиренных клеток микроорганизма после культивирования.

В некоторых воплощениях концентрация ЕРА в биомассе, выращенной в культуральной среде, включающей сниженный уровень витамина В12 (например, в культуральной среде, включающей менее чем 0,1 мг/л, менее чем 0,05 мг/л, менее чем 0,01 мг/л, менее чем 0,005 мг/л, менее чем 0,001 мг/л, менее чем 0,0005 мг/л, менее чем 0,0001 мг/л или не включающей витамин В12), по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 150%, по меньшей мере на 200%, по меньшей мере на 250%, по меньшей мере на 300%,

лее чем 0,1 мг/л витамина В12. В некоторых воплощениях концентрация ЕРА увеличивается по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 200%, по меньшей мере на 300%, по меньшей мере на 400% или по меньшей мере на 500% в биомассе микроорганизма, выращенного в культуральной среде, содержащей менее чем 0,01 мг/л витамина В12, по сравнению с тем же микроорганизмом, выращенным в культуральной среде, содержащей более чем 0,01 мг/л витамина В12. В некоторых воплощениях концентрация ЕРА увеличивается по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 200%, по меньшей мере на 300%, по меньшей мере на 400% или по меньшей мере на 500% в биомассе микроорганизма, выращенного в культуральной среде, содержащей менее чем 0,001 мг/л витамина В12 по сравнению с тем же микроорганизмом, выращенным в культуральной среде, содержащей более чем 0,001 мг/л витамина В12. В дополнительных воплощениях концентрация ЕРА увеличивается по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 200%, по меньшей мере на 300%, по меньшей мере на 400% или по меньшей мере на 500% в биомассе микроорганизма, выращенного в культуральной среде, содержащей менее чем 0,0001 мг/л витамина В12 по сравнению с тем же микроорганизмом, выращенным в культуральной среде, содержащей более чем 0,0001 мг/л витамина В12. В некоторых воплощениях концентрация ЕРА увеличивается по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 200%, по меньшей мере на 300%, по меньшей мере на 400% или по меньшей мере на 500% в биомассе микроорганизма, выращенного в культуральной среде, не содержащей витамина В12, по сравнению с тем же микроорганизмом, выращенным в культуральной среде, содержащей некоторое количество витамина В12. Определение увеличения в концентрации ЕРА в биомассе может быть выполнено по оценке роста микроорганизма в культуральной среде, содержащей повышенные количества витамина В12, и роста того же микроорганизма в культуральной среде, содержащей пониженные количества витамина В12, и при сравнении концентрации ЕРА в биомассе, полученной от каждой культуры. В этом определении состав культуральной среды, содержащей пониженные или повышенные количества витамина В12, был одинаковым за исключением уровня витамина В12 в них.

В некоторых воплощениях концентрация ЕРА в биомассе микроорганизма, выращенного в культуральной среде, включающей по меньшей мере 0,1 мг/л, по меньшей мере 0,05 мг/л, по меньшей мере 0,01 мг/л, по меньшей мере 0,005 мг/л, по меньшей мере 0,001 мг/л, по меньшей мере 0,0005 мг/л или по меньшей мере 0,0001 мг/л витамина В12, равна по меньшей мере 1%, по меньшей мере 2%, по меньшей мере 3%, по меньшей мере 4% или по меньшей мере 5% ЕРА по массе от общего содержания жирных кислот. В некоторых воплощениях концентрация ЕРА в биомассе микроорганизма, выращенного в культуральной среде, включающей по меньшей мере 0,1 мг/л, по меньшей мере 0,05 мг/л, по меньшей мере 0,01 мг/л, по меньшей мере 0,005 мг/л, по меньшей мере 0,001 мг/л, по меньшей мере 0,0005 мг/л или по меньшей мере 0,0001 мг/л витамина В12, равна от 1 до 50%, от 1 до 40%, от 1 до 30%, от 1 до 20%, от 2 до 50%, от 2 до 40%, от 2 до 30% или от 2 до 20% ЕРА по массе от общего содержания жирных кислот.

Кобальт в культуральной среде.

В некоторых воплощениях изобретение обеспечивает способы получения биомассы микроорганизмов, содержащей увеличенную концентрацию ЕРА, включающий рост микроорганизм в культуральной среде, включающей менее чем 0,1 мг/л кобальта для получения биомассы. В некоторых воплощениях культуральная среда менее чем 0,05 мг/л, менее чем 0,01 мг/л, менее чем 0,005 мг/л, менее чем 0,001 мг/л, менее чем 0,0005 мг/л, менее чем 0,0001 мг/л или не включает кобальта.

В некоторых воплощениях культуральная среда дополнительно включает менее чем 1 г дрожжевого экстракта на 50 г свободной от липидов биомассы, менее чем 0,8 г дрожжевого экстракта на 50 г свободной от липидов биомассы, менее чем 0,5 г дрожжевого экстракта на 50 г свободной от липидов биомассы, менее чем 0,3 г дрожжевого экстракта на 50 г свободной от липидов биомассы, менее чем 0,1 г дрожжевого экстракта на 50 г свободной от липидов биомассы, менее чем 0,05 г дрожжевого экстракта на 50 г свободной от липидов биомассы или менее чем 0,01 г дрожжевого экстракта на 50 г свободной от липидов биомассы.

В некоторых воплощениях концентрация ЕРА в биомассе, выращенной в культуральной среде, включающей пониженный уровень кобальта (например, в культуральной среде, включающей менее чем 0,1 мг/л, менее чем 0,05 мг/л, менее чем 0,01 мг/л, менее чем 0,005 мг/л, менее чем 0,001 мг/л, менее чем 0,0005 мг/л, менее чем 0,0001 мг/л или не включающей кобальта) по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 150%, по меньшей мере на 200%, по меньшей мере на 250%, по меньшей мере на 300%, по меньшей мере на 350%, по меньшей мере на 400%, по меньшей мере на 450%, по меньшей мере на 500%, по меньшей мере на 550%, по меньшей мере на 600%, по меньшей мере на 650% или по меньшей мере на 700% превышает концентрацию ЕРА в биомассе, полученной от микроорганизма, выращенного в культуральной среде, включающей повышенные уровни кобальта (например, в культуральной среде, включающей по меньшей мере 0,1 мг/л, по меньшей мере 0,05 мг/л, по меньшей мере 0,01 мг/л, по меньшей мере 0,005 мг/л, по меньшей мере 0,001 мг/л, по меньшей мере 0,0005 мг/л, по меньшей мере 0,0001 мг/л или по меньшей мере 0,00005 мг/л кобальта соответственно). Например, концентрация ЕРА в биомассе, выращенной в культуральной среде, не содержащей кобальт по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 25%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 150%, по меньшей мере на 200%, по меньшей мере на 250%, по меньшей мере на 300%, по меньшей мере

культуральной среде, содержащей менее чем 0,0001 мг/л кобальта, по сравнению с тем же микроорганизмом, выращенным в культуральной среде, содержащей более чем 0,0001 мг/л кобальта. В некоторых воплощениях концентрация ЕРА увеличивается по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 200%, по меньшей мере на 300%, по меньшей мере на 400% или по меньшей мере на 500% в биомассе микроорганизма, выращенного в культуральной среде, не содержащей кобальта, по сравнению с тем же микроорганизмом, выращенным в культуральной среде, содержащей некоторое количество кобальта. Определение увеличения в концентрации ЕРА в биомассе может быть выполнено по оценке роста микроорганизма в культуральной среде, содержащей повышенные количества кобальта, и роста того же микроорганизма в культуральной среде, содержащей пониженные количества кобальта, и путем сравнения концентраций ЕРА в биомассе, полученных от каждой культуры. В этом определении состав культуральной среды, содержащей пониженные или повышенные количества кобальта, одинаковый, за исключением уровня кобальта в них.

В некоторых воплощениях концентрация ЕРА в биомассе микроорганизма, выращенного в культуральной среде, включающей по меньшей мере 0,1 мг/л, по меньшей мере 0,05 мг/л, по меньшей мере 0,01 мг/л, по меньшей мере 0,005 мг/л, по меньшей мере 0,001 мг/л, по меньшей мере 0,0005 мг/л или по меньшей мере 0,0001 мг/л кобальта, равна по меньшей мере 1%, по меньшей мере 2%, по меньшей мере 3%, по меньшей мере 4% или по меньшей мере 5% ЕРА по массе от общего содержания жирных кислот. В некоторых воплощениях концентрация ЕРА в биомассе микроорганизма, выращенного в культуральной среде, включающей по меньшей мере 0,1 мг/л, по меньшей мере 0,05 мг/л, по меньшей мере 0,01 мг/л, по меньшей мере 0,005 мг/л, по меньшей мере 0,001 мг/л, по меньшей мере 0,0005 мг/л или по меньшей мере 0,0001 мг/л кобальта равна от 1 до 50%, от 1 до 40%, от 1 до 30%, от 1 до 20%, от 2 до 50%, от 2 до 40%, от 2 до 30% или от 2 до 20% ЕРА по массе от общего содержания жирных кислот.

Культуральная среда, содержащая витамин В12, дрожжевой экстракт и/или кобальт в низких количествах, может дополнительно включать растворенный CO_2 на уровне, равном по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 15% или по меньшей мере 20%. Настоящее изобретение направлено на изолированную биомассу из способов, раскрытых в настоящем документе, а также на микробное масло, экстрагируемое из этой биомассы.

Настоящее изобретение направлено на изолированную культуру, включающую любые микроорганизмы изобретения или их смеси.

Настоящее изобретение направлено на продукт питания, косметическую или фармацевтическую композицию для животного, не представляющего собой человека, или для человека, которые включают любые микроорганизмы или биомассы изобретения или их смеси.

Настоящее изобретение направлено на микробное масло, включающее по меньшей мере примерно 20 мас.% эйкозапентаеновой кислоты и менее чем примерно 5 мас.% каждой из следующих кислот: арахидоновой кислоты, докозапентаеновой кислоты n-6, олеиновой кислоты, линолевой кислоты, линоленовой кислоты, эйкозеновой кислоты, эруковой кислоты и стеарионовой кислоты. В некоторых воплощениях микробное масло дополнительно включает по меньшей мере примерно 25 мас.% докозагексаеновой кислоты.

Настоящее изобретение направлено на микробное масло, включающее фракцию триацилглицеридов, равную по меньшей мере примерно 10 мас.%, в котором, по меньшей мере, во фракции триацилглицеридов примерно 12 мас.% от жирных кислот составляет эйкозапентаеновая кислота, в котором во фракции триацилглицеридов по меньшей мере примерно 25 мас.% от жирных кислот составляет докозагексаеновая кислота и в котором во фракции триацилглицеридов менее чем примерно 5 мас.% от жирных кислот составляет арахидоновая кислота.

Настоящее изобретение направлено на продукт питания, косметическую или фармацевтическую композицию для животного, не представляющего собой человека, или для человека, которые включают любое из микробных масел изобретения. В некоторых воплощениях продукт питания представляет собой детскую смесь. В некоторых воплощениях детская смесь предназначена для недоношенных детей. В некоторых воплощениях продукт питания представляет собой молоко, напиток, лечебный напиток, питательный напиток или их комбинацию. В некоторых воплощениях продукт питания представляет собой добавку к питанию животного, не представляющего собой человека, или человека. В некоторых воплощениях продукт питания представляет собой пищевую добавку. В некоторых воплощениях продукт питания представляет собой корма для животных. В некоторых воплощениях корма для животных представляют собой корм для рыб, выращиваемых в аквакультуре. В некоторых воплощениях корма для животных представляют собой корма для домашних животных, корма для животных, содержащихся в зоопарке, корма для рабочих животных, корма для домашнего скота или их комбинацию.

Настоящее изобретение направлено на способ получения микробного масла, включающего омега-3 жирные кислоты, способ, включающий рост любых изолированных микроорганизмов изобретения или их смесей в культуре для получения масла, включающего омега-3 жирные кислоты. В некоторых воплощениях способ дополнительно включает экстрагирование масла.

Настоящее изобретение направлено на способ получения микробного масла, включающий омега-3 жирные кислоты, способ, включающий экстрагирование масла, включающего омега-3 жирные кислоты,

из любой биомассы по изобретению. В некоторых воплощениях микробное масло экстрагируют, применяя экстракцию с помощью органических растворителей, например экстракцию гексаном. В некоторых воплощениях микробное масло экстрагируют, применяя экстракцию без растворителей.

Настоящее изобретение направлено на микробное масло, получаемое способом изобретения.

Изобретение направлено на способ получения биомассы изобретения, включающий рост любых изолированных микроорганизмов изобретения или их смеси в культуре для получения биомассы.

Настоящее изобретение направлено на биомассу, получаемую способом изобретения.

Настоящее изобретение направлено на способ получения мутантного штамма изобретения, включающий: мутагенез любого из микроорганизмов изобретения и выделение мутантного штамма.

Настоящее изобретение направлено на применение любых изолированных микроорганизмов, биомассы или микробных масел изобретения или их смесей в производстве лекарственного средства для лечения воспаления или связанного с ним состояния.

Настоящее изобретение направлено на применение любых изолированных микроорганизмов, биомассы или микробных масел изобретения или их смесей для лечения воспаления или связанного с ним состояния.

Настоящее изобретение направлено на любые изолированные микроорганизмы, биомассы или микробные масла изобретения или их смеси для применения при лечении воспаления или связанного с ним состояния.

Настоящее изобретение направлено на способ лечения воспаления или связанного с ним состояния у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту любых изолированных микроорганизмов, биомассы или микробных масел изобретения или их смесей и фармацевтически приемлемого носителя.

Настоящее изобретение направлено на способы получения микробных масел и биомассы из микроорганизмов изобретения и способы применения микроорганизмов, биомассы и микробных масел.

Микроорганизмы.

В некоторых воплощениях микробная клетка для применения с настоящим изобретением представляет собой микроорганизм отдела *Labyrinthulomycota*. В некоторых воплощениях микробная клетка отдела *Labyrinthulomycota* представляет собой траустохитрид, таких как *Schizochytrium* или *Thraustochytrium*. В соответствии с настоящим изобретением термин "траустохитрид" относится любому члену порядка *Thraustochytriales*, включающему семейство *Thraustochytriaceae* и термин "лабиринтулиды" относится любому члену порядка *Labyrinthulales*, включающему семейство *Labyrinthulaceae*.

Ранее считали, что члены семейства *Labyrinthulaceae* относятся к представителям порядка *Thraustochytriales*, но в последних ревизиях таксономической классификации таких организмов, теперь семейство *Labyrinthulaceae* считается представителем порядка *Labyrinthulales*. Считается, что как *Labyrinthulales*, так и *Thraustochytriales* относятся к представителям отдела *Labyrinthulomycota*. В настоящее время теоретики в области таксономии обычно помещают обе эти группы микроорганизмов вместе с водорослями или водорослеподобными простейшими линий *Stramenopile*. Современное таксономическое положение траустохитрид и лабиринтулид можно суммировать следующим образом.

Царство: *Stramenopila* (*Chromista*).

Отдел: *Labyrinthulomycota* (*Heterokonta*).

Класс: *Labyrinthulomycetes* (*Labyrinthulae*).

Порядок: *Labyrinthulales*.

Семейство: *Labyrinthulaceae*.

Порядок: *Thraustochytriales*.

Семейство: *Thraustochytriaceae*.

Для целей настоящего изобретения штаммы микробных клеток, описанные как траустохитриды, включают следующие организмы: порядок: *Thraustochytriales*; семейство: *Thraustochytriaceae*; род: *Thraustochytrium* (вид: *sp.*, *arudimentale*, *aureum*, *benthicola*, *globosum*, *kinnei*, *motivum*, *multirudimentale*, *pachydermum*, *proliferum*, *roseum* или *striatum*), *Ulkenia* (вид: *sp.*, *amoeboidea*, *kerquelenensis*, *minuta*, *profunda*, *radiata*, *sailens*, *sarkariana*, *schizochytrids*, *visurgensis*, *yorkensis* или *sp.* BP-5601), *Schizochytrium* (вид: *sp.*, *aggregation*, *limnaceum*, *mangrovei*, *minutum* или *octosporum*), *Japonochytrium* (вид: *sp.*, *marinum*), *Aplanochytrium* (вид: *sp.*, *haliotidis*, *kerquelenensis*, *profunda* или *stocchinoi*), *Althornia* (вид: *sp.*, *crouchii*) или *Elina* (вид: *sp.*, *marisalba* или *sinorifica*). Для целей настоящего изобретения виды, описанные в рамках *Ulkenia*, рассматривают как представители рода *Thraustochytrium*. *Aurantiacochytrium* и *Oblogospora* представляют собой два дополнительных рода, охватываемых в настоящем изобретении отделом *Labyrinthulomycota*. В некоторых воплощениях микробная клетка относится к роду *Thraustochytrium*, *Schizochytrium* и их смесям.

Изобретение направлено на изолированные микроорганизмы и получаемые из них штаммы. Штамм, который "получен" из изолированного микроорганизма изобретения, может представлять собой природное или искусственное производное, такое как, например, мутантный, вариантный или рекомбинантный штамм. Термин "изолированные", так как применен в настоящем документе, не обязательно отражает степень, до которой изолят был очищен, но указывает на выделение или отделение от нативной

формы или от нативного окружения. Изолят может включать без ограничений изолированный микроорганизм, изолированную биомассу, изолированную культуру, изолированное микробное масло и изолированную последовательность (такую как изолированную полинуклеотидную последовательность, раскрытую в настоящем документе). Термин "микроорганизм", так как применен в настоящем документе, включает без ограничений термины "микроскопические водоросли", "траустохитриды" и таксономические классификации, связанные с любым из депонированных микроорганизмов, описанных в настоящем документе. Термины "Thraustochytriales", "траустохитрид", "Schizochytrium" и "Thraustochytrium", как применены при отсылке к любому из микроорганизмов изобретения, включая депонированные микроорганизмы, описанные в настоящем документе, основываются на современной таксономической классификации, включая доступную филогенетическую информацию, и не предназначены для ограничения в том случае, если таксономические классификации будут пересмотрены после дата подачи настоящей заявки.

В некоторых воплощениях изобретение направлено на изолированный микроорганизм вида, депонированного в АТСС под номером доступа РТА-10212. Изолированный микроорганизм, связанный с кодом доступа АТСС № РТА-10212, также известен в настоящем документе как *Thraustochytrium* sp. АТСС РТА-10212. Изолированный микроорганизм, связанный с кодом доступа АТСС № РТА-10212, был депонирован согласно Будапештскому договору, 14 июля 2009, в Американской коллекции типовых культур, Патентный депозитарий, 10801 университет Boulevard, Манассас, VA 20110-2209. В некоторых воплощениях изобретение направлено на изолированный штамм, депонированный в АТСС под номером доступа РТА-10212. В некоторых воплощениях изобретение направлено на изолированный микроорганизм, депонированный в АТСС под номерами доступа РТА-10212, РТА-10213, РТА-10214, РТА-10215, РТА-10208, РТА-10209, РТА-10210 или РТА-10211.

В некоторых воплощениях изобретение направлено на изолированный микроорганизм, имеющий характеристики вида, депонированного в АТСС под номером доступа РТА-10212, или на полученный из него штамм. Характеристики вида, депонированного в АТСС под номером доступа РТА-10212, могут включать его рост и фенотипические свойства (примеры фенотипических свойств включают морфологические свойства и репродуктивные способности), его физические и химические свойства (такие как сухие массы и липидные профили), последовательности его генов и их комбинации, где характеристики отличают вид от ранее идентифицированных видов. В некоторых воплощениях изобретение направлено на изолированный микроорганизм, имеющий характеристики вида, депонированного в АТСС под номером доступа РТА-10212, характеристики, включающие 18s rRNA, содержащую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1 или полинуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности с SEQ ID NO: 1, морфологические и репродуктивные способности вида, депонированного в АТСС под номером доступа РТА-10212 и профили жирных кислот вида, депонированного в АТСС под номером доступа РТА-10212. В некоторых воплощениях изолированные микроорганизмы изобретения имеют фенотипические свойства в значительной степени идентичные свойствам микроорганизма, депонированного в АТСС под номером доступа РТА-10212. В некоторых воплощениях изолированные микроорганизмы изобретения имеют характеристики роста в значительной степени идентичные характеристикам роста микроорганизма, депонированного в АТСС под номером доступа РТА-10212. В некоторых воплощениях изобретение направлено на изолированный микроорганизм, включающий 18s rRNA, включающую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 1 или полинуклеотидную последовательность, имеющую по меньшей мере 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности с SEQ ID NO: 1. В некоторых воплощениях изобретение направлено на изолированный микроорганизм, включающий 18s rRNA полинуклеотидную последовательность, которая имеет по меньшей мере 94% идентичности с полинуклеотидной последовательностью 18s rRNA микроорганизма, депонированного в АТСС под номером доступа РТА-10212.

В некоторых воплощениях изобретение направлено на мутантный штамм микроорганизма, депонированного в АТСС под номером доступа РТА-10212. В дополнительных воплощениях мутантный штамм представляет собой штамм, депонированный в АТСС под номером доступа РТА-10213, РТА-10214 или РТА-10215. Микроорганизмы, связанные с номерами доступа АТСС РТА-10213, РТА-10214 и РТА-10215, были депонированы согласно Будапештскому договору 14 июля 2009 в Американской коллекции типовых культур, Патентный депозитарий, 10801 университет Boulevard, Манассас, VA 20110-2209.

В некоторых воплощениях изобретение направлено на изолированный микроорганизм вида, депонированного в АТСС под номером доступа РТА-10208. Изолированный микроорганизм, связанный с кодом доступа АТСС № РТА-10208, также известен в настоящем документе как *Schizochytrium* sp. АТСС РТА-10208. Микроорганизм, связанный с кодом доступа АТСС № РТА-10208, был депонирован согласно Будапештскому договору 14 июля 2009 в Американской коллекции типовых культур, Патентный депозитарий, 10801 университет Boulevard, Манассас, VA 20110-2209. В некоторых воплощениях изобретение направлено на изолированный штамм, депонированный в АТСС под номером доступа РТА-10208.

В некоторых воплощениях изобретение направлено на изолированный микроорганизм вида, депонированного в АТСС под номером доступа РТА-10208, в котором общее содержание жирных кислот, продуцируемых микроорганизмом, включает более чем примерно 10%, более чем примерно 11%, более чем примерно 12%, более чем примерно 13%, более чем примерно 14%, более чем примерно 15%, более

чем примерно 16%, более чем примерно 17%, более чем примерно 18%, более чем примерно 19% или более чем примерно 20 мас.% ЕРА. В некоторых воплощениях изобретение направлено на изолированный микроорганизм вида, депонированного в АТСС под номером доступа РТА-10208, в котором общее содержание жирных кислот, продуцируемых микроорганизмом, включает примерно 10% до примерно 55%, примерно 10% до примерно 50%, примерно 10% до примерно 45%, примерно 10% до примерно 40%, примерно 10% до примерно 35%, примерно 10% до примерно 30%, примерно 15% до примерно 55%, примерно 15% до примерно 50%, примерно 15% до примерно 45%, примерно 15% до примерно 40%, примерно 15% до примерно 35%, примерно 15% до примерно 30%, примерно 20% до примерно 55%, примерно 20% до примерно 50%, примерно 20% до примерно 45%, примерно 20% до примерно 40%, примерно 20% до примерно 35% или примерно 20% до примерно 30 мас.% ЕРА.

В некоторых воплощениях изобретение направлено на изолированный микроорганизм, имеющий характеристики вида, депонированного в АТСС под номером доступа РТА-10208, в котором общее содержание жирных кислот, продуцируемых микроорганизмом, включает более чем примерно 10 мас.% эйкозапентаеновой кислоты. Характеристики микроорганизма, депонированного в АТСС под номером доступа РТА-10208, включают его рост и фенотипические свойства (примеры фенотипических свойств включают морфологические свойства и репродуктивные способности), его физические и химические свойства (такие как сухие массы и липидные профили), последовательности его генов и их комбинации, где эти характеристики отличают вид от ранее идентифицированных видов. В некоторых воплощениях изобретение направлено на изолированный микроорганизм, имеющий характеристики вида, депонированного в АТСС под номером доступа РТА-10212, в котором характеристики включают 18s rRNA, включающую полинуклеотидную последовательность SEQ ID NO: 2, морфологические и репродуктивные способности вида, депонированного в АТСС под номером доступа РТА-10208 и профили жирных кислот вида, депонированного в АТСС под номером доступа РТА-10208. В некоторых воплощениях изолированные микроорганизмы изобретения имеет физические и химические свойства в значительной степени идентичные физическим и химическим свойствам микроорганизма, депонированного в АТСС под номером доступа РТА-10208.

В некоторых воплощениях изобретение направлено на мутантный штамм микроорганизма, депонированного в АТСС под номером доступа РТА-10208. В дополнительных воплощениях мутантный штамм представляет собой штамм, депонированный в АТСС под номерами доступа РТА-10209, РТА-10210 или РТА-10211.

Микроорганизмы, связанные с номерами доступа АТСС РТА-10209, РТА-10210 и РТА-10211, были депонированы согласно Будапештскому договору 25 сентября 2009 в Американской коллекции типовых культур, Патентный депозитарий, 10801 университет Boulevard, Манассас, VA 20110-2209.

В некоторых воплощениях изобретение направлено на изолированный микроорганизм изобретения, который производит фракцию триацилглицеридов, в котором содержание ЕРА во фракции триацилглицеридов равно по меньшей мере примерно 12%, по меньшей мере примерно 13%, по меньшей мере примерно 14%, по меньшей мере примерно 15%, по меньшей мере примерно 16%, по меньшей мере примерно 17%, по меньшей мере примерно 18%, по меньшей мере примерно 19% или по меньшей мере примерно 20 мас.%. В некоторых воплощениях изобретение направлено на изолированный микроорганизм, который производит фракцию триацилглицеридов, в которой содержание ЕРА во фракции триацилглицеридов равно примерно 12% до примерно 55%, примерно 12% до примерно 50%, примерно 12% до примерно 45%, примерно 12% до примерно 40%, примерно 12% до примерно 35%, примерно 12% до примерно 30%, примерно 15% до примерно 45%, примерно 15% до примерно 40%, примерно 15% до примерно 35%, примерно 15% до примерно 30% или примерно 20% до примерно 30 мас.%.

В некоторых воплощениях изобретение направлено на мутант, вариант или рекомбинант изолированного микроорганизма изобретения, который производит фракцию триацилглицеридов, в которой содержание ЕРА во фракции триацилглицеридов равно по меньшей мере примерно 10%, по меньшей мере примерно 11%, по меньшей мере примерно 12%, по меньшей мере примерно 13%, по меньшей мере примерно 14%, по меньшей мере примерно 15%, по меньшей мере примерно 16%, по меньшей мере примерно 17%, по меньшей мере примерно 18%, по меньшей мере примерно 19% или по меньшей мере примерно 20 мас.%. В некоторых воплощениях изобретение направлено на мутант, вариант или рекомбинант изолированного микроорганизма изобретения, которые производят фракцию триацилглицеридов, в которой содержание ЕРА во фракции триацилглицеридов равно примерно 12% до примерно 55%, примерно 12% до примерно 50%, примерно 12% до примерно 45%, примерно 12% до примерно 40%, примерно 12% до примерно 35%, примерно 12% до примерно 30%, примерно 15% до примерно 55%, примерно 15% до примерно 50%, примерно 15% до примерно 45%, примерно 15% до примерно 40%, примерно 15% до примерно 35%, примерно 15% до примерно 30%, примерно 20% до примерно 55%, примерно 20% до примерно 50%, примерно 20% до примерно 45%, примерно 20% до примерно 40%, примерно 20% до примерно 35% или примерно 20% до примерно 30 мас.%. Мутантные штаммы могут быть получены с помощью хорошо известных процедур. Как правило, процедуры включают облучение, обработку высокими температурами и обработку мутагеном. Вариантные штаммы могут представлять собой другие природные изоляты и/или субъизолаты вида, описанного в настоящем документе. Рекомбинант-

ные штаммы могут быть получены любыми способами, хорошо известными в молекулярной биологии для экспрессии экзогенных генов или изменения функции или экспрессии эндогенных генов. В некоторых воплощениях мутантный, вариантный или рекомбинантный штамм продуцирует повышенное количество омега-3 жирных кислот, в особенности EPA, по сравнению со штаммом дикого типа. В некоторых воплощениях мутантный, вариантный или рекомбинантный штамм продуцирует сниженное количество одной или нескольких жирных кислот, например пониженные количества DHA, ARA, DPA n-6 или их комбинаций. В некоторых воплощениях мутантный, вариантный или рекомбинантный штамм продуцирует повышенную сухую массу клеток на литр культуры по сравнению со штаммом дикого типа. Такие мутантные, вариантные или рекомбинантные штаммы представляют собой примеры штаммов, полученных от изолированного микроорганизма изобретения.

Настоящее изобретение также направлено на изолированный траустохитридный микроорганизм, имеющий характеристики вида траустохитрид, депонированного в АТСС под номером доступа РТА-9695, в котором общее содержание жирных кислот, продуцируемое указанным микроорганизмом или полученным из него штаммом, включает примерно 10% или менее по массе эйкозапентаеновой кислоты.

Настоящее изобретение также направлено на изолированный траустохитридный микроорганизм или на полученный из него штамм, включающий фракцию триглицеридов, в которой содержание докозагексаеновой кислоты во фракции триглицеридов равно по меньшей мере примерно 40 мас.%, в котором содержание докозапентаеновой кислоты n-6 во фракции триглицеридов равно по меньшей мере от примерно 0,5 мас.% до примерно 6 мас.% и, в котором общее содержание жирных кислот, продуцируемое указанным микроорганизмом или полученным из него штаммом, включает примерно 10% или менее по массе эйкозапентаеновой кислоты.

Настоящее изобретение также направлено на изолированный траустохитридный микроорганизм того же вида, что и траустохитрид, депонированный в АТСС под номером доступа РТА-9695, или на полученный из него штамм, в котором общее содержание жирных кислот, продуцируемое указанным микроорганизмом или полученным из него штаммом, включает примерно 10% или менее по массе эйкозапентаеновой кислоты.

В некоторых воплощениях штамм, полученный от изолированного траустохитридного микроорганизма изобретения, представляет собой мутантный штамм.

Настоящее изобретение также направлено на изолированный микроорганизм, депонированный в АТСС под номерами доступа РТА-9695, РТА-9696, РТА-9697 или РТА-9698.

Настоящее изобретение также направлено на траустохитридную биомассу, включающую любой из траустохитридных микроорганизмов изобретения или их смеси.

Настоящее изобретение также направлено на изолированную траустохитридную биомассу, в которой по меньшей мере примерно 50 мас.% от сухой массы клеток биомассы составляют жирные кислоты и, в котором по меньшей мере примерно 50 мас.% от жирных кислот составляют омега-3 жирные кислоты. В некоторых воплощениях по меньшей мере примерно 50% от массы жирных кислот составляет докозагексаеновая кислота. Настоящее изобретение также направлено на изолированную траустохитридную биомассу, в которой по меньшей мере примерно 25 мас.% от сухой массы клеток биомассы составляет докозагексаеновая кислота.

В некоторых воплощениях настоящее изобретение также направлено на изолированную траустохитридную биомассу, в которой примерно 10% или менее от массы жирных кислот составляет эйкозапентаеновая кислота и в которой массовое отношение докозагексаеновой кислоты к эйкозапентаеновой кислоте равно по меньшей мере примерно 5:1.

В некоторых воплощениях настоящее изобретение также направлено на изолированную траустохитридную биомассу, в которой примерно 1,5% или менее от массы жирных кислот составляет арахидоновая кислота и в которой массовое отношение докозагексаеновой кислоты к арахидоновой кислоте равно по меньшей мере примерно 20:1.

В некоторых воплощениях настоящее изобретение также направлено на изолированную траустохитридную биомассу, включающую докозагексаеновую кислоту и докозапентаеновую кислоту n-6 в массовом отношении, равном по меньшей мере примерно 10:1. В некоторых воплощениях изобретение направлено на траустохитридный вид, депонированный в АТСС под номером доступа РТА-9695. Изолированный траустохитрид также известен в настоящем документе как *Schizochytrium* sp. АТСС РТА-9695. Траустохитрид, связанный с кодом доступа АТСС № РТА-9695, был депонирован согласно Будапештскому договору 7 января 2009 в Американской коллекции типовых культур, Патентный депозитарий, 10801 университет Boulevard, Манассас, VA 20110-2209.

В некоторых воплощениях изобретение направлено на изолированный траустохитридный штамм, депонированный в АТСС под номером доступа РТА-9695. В некоторых воплощениях изобретение направлено на изолированный траустохитридный микроорганизм того же вида, что и траустохитрид, депонированный в АТСС под номером доступа РТА-9695.

В некоторых воплощениях изобретение направлено на изолированный траустохитрид, имеющий характеристики вида, депонированного в АТСС под номером доступа РТА-9695 или на полученный из него штамм. Характеристики траустохитридного вида, депонированного в АТСС под номером доступа

РТА-9695, включают его рост и фенотипические свойства (примеры фенотипических свойств включают морфологические и репродуктивные способности), его физические и химические свойства (такие как сухие массы и липидные профили) и последовательности его генов. В некоторых воплощениях изолированные траустохитриды изобретения имеют в значительной степени идентичные фенотипические свойства траустохитрида, депонированного в АТСС под номером доступа РТА-9695. В некоторых воплощениях изолированные траустохитриды изобретения имеют в значительной степени идентичные характеристики роста траустохитрида, депонированного в АТСС под номером доступа РТА-9695.

В некоторых воплощениях изобретение направлено на мутанта, варианта или рекомбинанта изолированного траустохитрида изобретения, в котором общее содержание жирных кислот, продуцируемое мутантом, вариантом или рекомбинантом, включает примерно 10% или менее по массе эйкозапентаеновой кислоты. Мутантные штаммы могут быть получены с помощью хорошо известных процедур. Общепринятые процедуры включают облучение; обработку высокими температурами; и обработку мутагеном. Вариантные штаммы может представлять собой природные изоляты и/или суб-изоляты вида, описанного в настоящем документе. Рекомбинантные штаммы могут быть получены любыми хорошо в молекулярной биологии известными способами экспрессии экзогенных генов или изменением функций или экспрессии эндогенных генов. В некоторых воплощениях мутантный, вариантный или рекомбинантный штамм продуцирует повышенное количество омега-3 жирных кислот, включая ДНА и/или ЕРА, по сравнению со штаммом дикого типа. В некоторых воплощениях мутантный, вариантный или рекомбинантный штамм продуцирует пониженное количество одной или нескольких жирных кислот, например, пониженные количества ЕРА, АРА, DPA n-6 или их комбинации. В некоторых воплощениях мутантный, вариантный или рекомбинантный штамм продуцирует более высокую сухую массу клеток на литр культуры по сравнению со штаммом дикого типа. Такие мутантные, вариантные или рекомбинантные штаммы представляют собой примеры штаммов, полученных от изолированного траустохитрида изобретения.

В некоторых воплощениях изобретение направлено на мутантный штамм траустохитрида, депонированного в АТСС под номером доступа РТА-9695. В дополнительных воплощениях мутантный штамм представляет собой штамм, депонированный с номерами доступа АТСС РТА-9696, РТА-9697 или РТА-9698. Траустохитридные штаммы, связанные с номерами доступа АТСС РТА-9696, РТА-9697 и РТА-9698, были депонированы согласно Будапештскому договору 7 января 2009 в Американской коллекции типовых культур, Патентный депозитарий, 10801 университет Boulevard, Манассас, VA 20110-2209. Данные депонированные мутантные штаммы представляют собой производные траустохитрида, депонированного в АТСС под номером доступа РТА-9695.

В некоторых воплощениях изолированный траустохитрид изобретения, включая его мутанты, варианты или рекомбинанты, включает профиль жирных кислот в одной или нескольких фракциях, изолированных из траустохитрида. Одна или несколько фракций, изолированных из траустохитрида, включает общую фракцию жирных кислот, фракцию сложных эфиров стерола, фракцию триглицеридов, фракцию свободных жирных кислот, фракцию стеролов, фракцию диглицеридов, фракцию полярных соединений (включая фракцию фосфолипидов) и их комбинации.

Настоящее изобретение также направлено на культуру изолированного траустохитрида, включающую любой из траустохитридных микроорганизмов изобретения или их смеси. В некоторых воплощениях культура включает по меньшей мере примерно 5% растворенного кислорода.

Настоящее изобретение также направлено на продукт питания, косметическую или фармацевтическую композицию для животных или людей, включающую любой из траустохитридных микроорганизмов или любую из биомасс изобретения или их смеси.

Настоящее изобретение также направлено на микробное масло, включающее фракцию триглицеридов, равную по меньшей мере примерно 70 мас.%, в которой содержание докозагексаеновой кислоты во фракции триглицеридов равно по меньшей мере примерно 50 мас.% и в которой содержание докозапентаеновой кислоты n-6 по фракции триглицеридов равно от примерно 0,5 мас.% до примерно 6 мас.%. В некоторых воплощениях микробное масло дополнительно включает арахидоновую кислоту, содержание которой во фракции триглицеридов равно примерно 1,5% или менее по массе.

Настоящее изобретение также направлено на микробное масло, включающее фракцию триглицеридов, равную по меньшей мере примерно 70 мас.%, в которой содержание докозагексаеновой кислоты во фракции триглицеридов равно по меньшей мере примерно 40 мас.%, в которой содержание докозапентаеновой кислоты n-6 по фракции триглицеридов равно по меньшей мере от примерно 0,5 мас.% до примерно 6 мас.% и в которой отношение докозагексаеновой кислоты к докозапентаеновой кислоте n-6 превышает примерно 6:1.

Настоящее изобретение также направлено на микробное масло, включающее фракцию триглицеридов равную по меньшей мере примерно 70 мас.%, в которой содержание докозагексаеновой кислоты во фракции триглицеридов равно по меньшей мере примерно 60 мас.%.

В некоторых воплощениях по меньшей мере примерно 20% триглицеридов во фракции триглицеридов микробного масла содержат докозагексаеновую кислоту в двух положениях в триглицериде, которые выбирают из любых двух положений sn-1, sn-2 и sn-3. В некоторых воплощениях по меньшей мере примерно 5% триглицеридов во фракции триглицеридов микробного масла содержат докозагексаеновую

кислоту во всех трех положениях sn-1, sn-2 и sn-3 в триглицериде.

В некоторых воплощениях изолированный микроорганизм изобретения, включая его мутанты, варианты и рекомбинанты, включает профиль жирных кислот в одной или нескольких фракциях, изолированных из микроорганизма. Одна или несколько фракций, изолированных из микроорганизма, включают общую фракцию жирных кислот, фракцию сложных эфиров стерола, фракцию триацилглицеридов, фракцию свободных жирных кислот, фракцию стеролов, фракцию диацилглицеридов, фракцию полярных соединений (включая фракцию фосфолипидов) и их комбинации. Профиль жирных кислот для конкретной фракции может включать любые профили жирных кислот, связанные с конкретной фракцией, такой как раскрыта в настоящем документе.

Изобретение направлено на способ получения мутанта, включающий мутагенез любого из микроорганизмов изобретения и выделение мутантного штамма.

Культуры и изолированные биомассы.

Изобретение направлено на культуру, включающую один или несколько изолированных микроорганизмов изобретения. Различные параметры ферментации для посева, роста и извлечения микрофлоры, такой как микроскопические водоросли и траустохитриды, известны в этой области техники. См., например, патент США № 5130242, включенный в настоящий документ путем отсылки во всей своей полноте. Жидкая или твердая среда может содержать природную или искусственную морскую воду. Источники углерода для гетеротрофного роста включают без ограничений, глюкоза, фруктоза, ксилоза, сахароза, мальтоза, растворимый крахмал, меласса, фукоза, глюкозамин, декстран, жиры, масла, глицерин, ацетат натрия и маннитол. Источники азота включают без ограничений, пептон, дрожжевой экстракт, полипептон, солодовый экстракт, мясной экстракт, казаминовую кислоту, жидкий кукурузный экстракт, органические источники азота, глутамат натрия, мочевины, неорганические источники азота, ацетат аммония, сульфат аммония, хлорид аммония и нитрат аммония.

Типичная среда для роста микроорганизма, депонированного в АТСС под номером доступа РТА-10212, показана в табл. 1.

Таблица 1. Состав среды в сосуде для РТА-10212

<u>Ингредиент</u>	<u>концентрация</u>	<u>диапазоны</u>
Na ₂ SO ₄	г/л 31,0	0-50, 15-45 или 25-35
NaCl	г/л 0,625	0-25, 0,1-10 или 0,5-5
KCl	г/л 1,0	0-5, 0,25-3 или 0,5-2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	г/л 5,0	0-10, 2-8 или 3-6
(NH ₄) ₂ SO ₄	г/л 0,44	0-10, 0,25-5 или 0,05-3
MSG·1H ₂ O	г/л 6,0	0-10, 4-8 или 5-7
CaCl ₂	г/л 0,29	0,1-5, 0,15-3 или 0,2-1
T 154 (дрожжевой экстракт)	г/л 6,0	0-20, 0,1-10 или 1-7
KH ₂ PO ₄	г/л 0,8	0,1-10, 0,5-5 или 0,6-1,8
<u>После автоклавирования (металлы)</u>		
Лимонная кислота	мг/л 3,5	0,1-5000, 10-3000 или 3-2500
FeSO ₄ ·7H ₂ O	мг/л 10,30	0,1-100, 1-50 или 5-25
MnCl ₂ ·4H ₂ O	мг/л 3,10	0,1-100, 1-50 или 2-25
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	мг/л 3,10	0,01-100, 1-50 или 2-25
CoCl ₂ ·6H ₂ O	мг/л 0,04	0-1, 0,001-0,1 или 0,01-0,1
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	мг/л 0,04	0,001-1, 0,005-0,5 или 0,01-0,1
CuSO ₄ ·5H ₂ O	мг/л 2,07	0,1-100, 0,5-50 или 1-25
NiSO ₄ ·6H ₂ O	мг/л 2,07	0,1-100, 0,5-50 или 1-25
<u>После автоклавирования (витамины)</u>		
Тиамин	мг/л 9,75	0,1-100, 1-50 или 5-25
Витамин B12	мг/л 0,16	0,01-100, 0,05-5 или 0,1-1
Ca ^{1/2} -пантотенат	мг/л 2,06	0,1-100, 0,1-50 или 1-10
Биотин	мг/л 3,21	0,1-100, 0,1-50 или 1-10

После автоклавирования (углерод)

Глицерин	г/л	30,0	5-150, 10-100 или 20-50
----------	-----	------	-------------------------

Азотистое питание:ИнгредиентКонцентрация

MSG·1H ₂ O	г/л	17	0-150, 10-100 или 15-50
-----------------------	-----	----	-------------------------

Типичные условия культивирования следующие:

pH примерно 6,5 - примерно 9,5, примерно 6,5 - примерно 8,0 или примерно 6,8 - примерно 7,8;

температура: примерно 15 - примерно 30°C, примерно 18 - примерно 28°C или примерно 21 до примерно 23°C;

растворенный кислород: примерно 0,1 - примерно 100%-ное насыщение, примерно 5 - примерно 50%-ное насыщение или примерно 10 - примерно 30%-ное насыщение; и/или

глицерин, контролируемый на уровне: примерно 5 - примерно 50 г/л, примерно 10 - примерно 40 г/л или примерно 15 - примерно 35 г/л.

В некоторых воплощениях микроорганизм, депонированный в АТСС под номером доступа РТА-10212 или его мутант, вариант или рекомбинант, рос гетеротрофно на глицерине в качестве источника углерода, но не рос на глюкозе в качестве источника углерода.

Типичная среда для роста микроорганизма, депонированного в АТСС под номером доступа РТА-10208, показана в табл. 2.

Таблица 2. Состав среды в сосуде для РТА-10208

<u>Ингредиент</u>	<u>концентрация</u>	<u>диапазоны</u>
Na ₂ SO ₄	г/л 8,8	0-25, 2-20 или 3-10
NaCl	г/л 0,625	0-25, 0,1-10 или 0,5-5
KCl	г/л 1,0	0-5, 0,25-3 или 0,5-2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	г/л 5,0	0-10, 2-8 или 3-6
(NH ₄) ₂ SO ₄	г/л 0,42	0-10, 0,25-5 или 0,05-3
CaCl ₂	г/л 0,29	0,1-5, 0,15-3 или 0,2-1

034980

Т 154 (дрожжевой экстракт)	г/л	1,0	0-20, 0,1-10 или 0,5-5
KH ₂ PO ₄	г/л	1,765	0,1-10, 0,5-5 или 1-3

После автоклавирования (металлы)

Лимонная кислота	мг/л	46,82	0,1-5000, 10-3000 или 40-2500
FcSO ₄ ·7H ₂ O	мг/л	10,30	0,1-100, 1-50 или 5-25
MnCl ₂ ·4H ₂ O	мг/л	3,10	0,1-100, 1-50 или 2-25
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	мг/л	9,3	0,01-100, 1-50 или 2-25
CoCl ₂ ·6H ₂ O	мг/л	0,04	0-1, 0,001-0,1 или 0,01-0,1
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	мг/л	0,04	0,001-1, 0,005-0,5 или 0,01-0,1
CuSO ₄ ·5H ₂ O	мг/л	2,07	0,1-100, 0,5-50 или 1-25
NiSO ₄ ·6H ₂ O	мг/л	2,07	0,1-100, 0,5-50 или 1-25

После автоклавирования (витамины)

Тиамин	мг/л	9,75	0,1-100, 1-50 или 5-25
Ca ^{1/2} -пантотенат	мг/л	3,33	0,1-100, 0,1-50 или 1-10
Биотин	мг/л	3,58	0,1-100, 0,1-50 или 1-10

После автоклавирования (углерод)

Глюкоза	г/л	30,0	5-150, 10-100 или 20-50
---------	-----	------	-------------------------

Азотистое питание:

<u>Ингредиент</u>	<u>Концентрация</u>		
NH ₄ OH	мл/л	23,6	0-150, 10-100 или 15-50

Типичные условия культивирования следующее:

pH примерно 6,5 - примерно 8,5, примерно 6,5 - примерно 8,0 или примерно 7,0 - примерно 8,0;
температура: примерно 17 - примерно 30°C, примерно 20 - примерно 28°C или примерно 22 до примерно 24°C;

растворенный кислород: примерно 2 - примерно 100% насыщение, примерно 5 - примерно 50% насыщение или примерно 7 - примерно 20% насыщение; и/или

глюкоза, контролируемая на уровне: примерно 5 - примерно 50 г/л, примерно 10 - примерно 40 г/л или примерно 20 - примерно 35 г/л.

В некоторых воплощениях объем ферментации (объем культуры) равен по меньшей мере примерно 2 л, по меньшей мере примерно 10 л, по меньшей мере примерно 50 л, по меньшей мере примерно 100 л, по меньшей мере примерно 200 л, по меньшей мере примерно 500 л, по меньшей мере примерно 1000 л, по меньшей мере примерно 10000 л, по меньшей мере примерно 20000 л, по меньшей мере примерно 50000 л, по меньшей мере примерно 100000 л, по меньшей мере примерно 150000 л, по меньшей мере примерно 200000 л или по меньшей мере примерно 250000 л. В некоторых воплощениях объем ферментации равен примерно 2 л до примерно 300000 л, примерно 2 л, примерно 10 л, примерно 50 л, примерно 100 л, примерно 200 л, примерно 500 л, примерно 1000 л, примерно 10000 л, примерно 20000 л, примерно 50000 л, примерно 100000 л, примерно 150000 л, примерно 200000 л, примерно 250000 л или примерно 300000 л.

В некоторых воплощениях изобретение направлено на изолированную биомассу, включающую профиль жирных кислот изобретения. В некоторых воплощениях по меньшей мере примерно 20%, по меньшей мере примерно 25%, по меньшей мере примерно 30%, по меньшей мере примерно 35%, по меньшей мере примерно 40%, по меньшей мере примерно 45%, по меньшей мере примерно 50%, по меньшей мере примерно 55%, по меньшей мере примерно 60%, по меньшей мере примерно 65%, по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 75% или по меньшей мере примерно 80% от сухой массы клеток биомассы представляют собой жирные кислоты. В некоторых воплощениях более чем примерно 20%, более чем примерно 25%, более чем примерно 30%, более чем примерно 35%, более чем примерно 40%, более чем примерно 45%, более чем примерно 50%, более чем примерно 55% или

от DPA n-6. В некоторых воплощениях биомасса включает жирные кислоты с примерно 5% или менее, менее чем примерно 5%, примерно 4% или менее, примерно 3% или менее или примерно 2% или менее по массе олеиновой кислоты (18:1 n-9), линолевой кислоты (18:2 n-6), линоленовой кислоты (18:3 n-3), эйкозеновой кислоты (20:1 n-9), эруковой кислоты (22:1 n-9) или их комбинаций.

Характеристики изолированной биомассы изобретения связаны скорее с эндогенными или природными свойствами изолированной биомассы, а не с введенными извне материалами. В некоторых воплощениях изолированная биомасса не содержит поливинилпирролидон или ее не изолируют из культуры, содержащей поливинилпирролидон.

Настоящее изобретение направлено на способ получения биомассы. В некоторых воплощениях способ получения биомассы изобретения включает рост любых изолированных микроорганизмов изобретения или их смеси в культуре для получения биомассы. Настоящее изобретение направлено на биомассу, продуцируемую способом.

В некоторых воплощениях биомасса включает жирные кислоты, в которых жирные кислоты дополнительно включают омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты, в которых омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты включают DHA и EPA в количестве, равном примерно ≥ 90 мас.% от общего количества омега-3 полиненасыщенных жирных кислот и количеств EPA по массе равно от примерно 6% вплоть до примерно 65% от общего количества EPA и DHA. В особенности обеспечивают биомассу, в которой количество EPA по массе равно от примерно 6% вплоть до примерно 28% от общего количества EPA и DHA. Дополнительно настоящим документом обеспечивают биомассу, в которой количество EPA по массе равно от примерно 36% вплоть до примерно 65 от общего количества EPA и DHA. Конкретнее, обеспечивают биомассу, в которой количество EPA по массе равно от примерно 28% до примерно 36% от общего количества EPA и DHA.

Некоторые воплощения, обеспечиваемые настоящим документом, включают биомассу, включающую жирные кислоты, в которой жирные кислоты дополнительно включают DHA и EPA, и количество EPA по массе равно от примерно 15 вплоть до примерно 60% от общей массы EPA и DHA.

Некоторые воплощения изобретения дополнительно направлены на культуру, включающую траустохитрид или мутантный штамм, депонированный в АТСС под номером доступа РТА-9695. В этой области техники известны различные параметры ферментации для посева, роста и извлечения микрофлоры, например они описаны в патенте США № 5130242. Любая среда, общепринятая для роста траустохитриды, может быть применена. Жидкие или твердые среды может содержать природную или искусственную морскую воду. Источники углерода включают без ограничений, глюкозу, фруктозу, ксилозу, сахарозу, мальтозу, растворимый крахмал, мелассу, фукозу, глюкозамин, декстран, жиры, масла, глицерин, ацетат натрия и маннитол. Источники азота включают без ограничений, пептон, дрожжевой экстракт, полипептон, солодовый экстракт, мясной экстракт, казаминовую кислоту, жидкий кукурузный экстракт, органические источники азота, глутамат натрия, мочевины, неорганические источники азота, аммония ацетат, аммония сульфат, аммония хлорид, аммония нитрат, натрия сульфат. Типичная среда показана в табл. 3.

Таблица 3. Состав среды в сосуде для РТА-9695

<u>Ингредиент</u>	<u>концентрация</u>	<u>диапазоны</u>
NaCl	г/л 12,5	0-25, 5-20 или 10-15
KCl	г/л 1,0	0-5, 0,25-3 или 0,5-2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	г/л 5,0	0-10, 2-8 или 3-6
(NH ₄) ₂ SO ₄	г/л 0,6	0-10, 0,25-5 или 0,5-3
CaCl ₂	г/л 0,29	0,1-5, 0,15-3 или 0,2-1
T 154 (дрожжевой экстракт)	г/л 6,0	0-20, 1-15 или 5-10
KH ₂ PO ₄	г/л 1,2	0,1-10, 0,5-5 или 1-3
<u>После автоклавирования (металлы)</u>		
Лимонная кислота	мг/л 3,5	0,1-100, 1-50 или 2-25
FeSO ₄ ·7H ₂ O	мг/л 10,30	0,1-100, 1-50 или 5-25
MnCl ₂ ·4H ₂ O	мг/л 3,10	0,1-100, 1-50 или 2-25
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	мг/л 3,10	0,1-100, 1-50 или 2-25
CoCl ₂ ·6H ₂ O	мг/л 0,04	0,001-1, 0,005-0,5
или 0,01-0,1		
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	мг/л 0,04	0,001-1, 0,005-0,5
или 0,01-0,1		
CuSO ₄ ·5H ₂ O	мг/л 2,07	0,1-100, 0,5-50 или 1-25
NiSO ₄ ·6H ₂ O	мг/л 2,07	0,1-100, 0,5-50 или 1-25
<u>После автоклавирования (витамины)</u>		
Тиамин**	мг/л 9,75	0,1-100, 1-50 или 5-25
Витамина B12**	мг/л 0,16	0,1-100, 0,1-10 или 0,1-1
Ca ^{1/2} -пантотенат**	мг/л 3,33	0,1-100, 0,1-50 или 1-10
** Стерилизовали фильтрованием		
<u>После автоклавирования (углерод)</u>		
Глюкоза	г/л 30,0	5-150, 10-100 или 20-50

Азотистое питание:

<u>Ингредиент</u>	<u>Концентрация</u>	<u>диапазоны</u>
NH ₄ OH	мл/л 21,6	0-150, 10-100 или 15-50

Типичные условия культивирования следующее:

pH примерно 6,5 - примерно 8,5, примерно 6,5 - примерно 8,0 или примерно 7,0 - примерно 7,5;

температура: примерно 17 - примерно 30°C, примерно 20 - примерно 25°C или примерно 22 до примерно 23°C;

растворенный кислород: примерно 5 - примерно 100%-ное насыщение, примерно 10 - примерно 80%-ное насыщение или примерно 20 - примерно 50%-ное насыщение;

глюкоза, контролируемая на уровне: примерно 5 - примерно 50 г/л, примерно 10 - примерно 40 г/л или примерно 20 - примерно 35 г/л.

В некоторых воплощениях культуральная среда включает по меньшей мере примерно 5%, по меньшей мере примерно 10%, по меньшей мере примерно 20%, по меньшей мере примерно 30%, по меньшей мере примерно 40%, по меньшей мере примерно 50%, по меньшей мере примерно 60%, по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 80% или по меньшей мере примерно 90% растворенного кислорода, в процентах от уровня полного насыщения. В некоторых воплощениях культуральная среда включает от примерно 5% до примерно 20%, от примерно 5% до примерно 50%, от примерно 5% до примерно 100%, от примерно 10% до примерно 20%, от примерно 10% до примерно 50%, от примерно 10% до примерно 100%, от примерно 20% до примерно 50% или от примерно 20% до примерно 100% растворенного кислорода, в процентах от уровня полного насыщения.

Изобретение дополнительно направлено на изолированную биомассу траустохитрид изобретения. Изолированная траустохитридная биомасса изобретения представляет собой собранную клеточную био-

массу, полученную любым общепринятым способом, для выделения траустохитридной биомассы, такой как описана в патенте США № 5130242 и в публикации заявки на патент США No. 2002/0001833.

В некоторых воплощениях сухая масса клеток биомассы, изолированной из каждого литра культуры, равна по меньшей мере примерно 50 г, по меньшей мере примерно 60 г, по меньшей мере примерно 70 г, по меньшей мере примерно 80 г, по меньшей мере примерно 100 г, по меньшей мере примерно 120 г, по меньшей мере примерно 140 г, по меньшей мере примерно 160 г, по меньшей мере примерно 180 г или по меньшей мере примерно 200 г после роста в течение примерно 7 дней при от примерно 17°C до примерно 30°C в культуральной среде с рН, равным от примерно 6,5 до примерно 8,5, включающей источники углерода, азота и питательных веществ и от примерно 950 м.д. до примерно 8500 м.д. ионов хлора. В некоторых воплощениях сухая масса клеток биомассы, изолированной из каждого литра культуры, равна по меньшей мере примерно 50 г, по меньшей мере примерно 60 г, по меньшей мере примерно 70 г, по меньшей мере примерно 80 г, по меньшей мере примерно 100 г, по меньшей мере примерно 120 г, по меньшей мере примерно 140 г, по меньшей мере примерно 160 г, по меньшей мере примерно 180 г или по меньшей мере примерно 200 г после роста в течение примерно 7 дней при от примерно 17°C, при примерно 18°C, при примерно 19°C, при примерно 20°C, при примерно 21°C, при примерно 22°C, при примерно 23°C, при примерно 24°C, при примерно 25°C, при примерно 26°C, при примерно 27°C, при примерно 28°C, при примерно 29°C или при примерно 30°C в культуральной среде с рН, равным примерно рН 6,5, примерно рН 7, примерно рН 7,5, примерно рН 8,0 или примерно рН 8,5, включающей источники углерода, азота и питательных веществ и от примерно 950 м.д. до примерно 8500 м.д. ионов хлора. В некоторых воплощениях сухая масса клеток биомассы, изолированной из каждого литра культуры, равна от примерно 50 г до примерно 200 г после роста в течение примерно 7 дней при от примерно 17°C до примерно 30°C в культуральной среде с рН, равным примерно рН 6,5 до примерно рН 8,5, включающей источники углерода, азота и питательных веществ и от примерно 950 м.д. до примерно 8500 м.д. ионов хлора. В некоторых воплощениях сухая масса клеток биомассы, изолированной из каждого литра культуры, равна от примерно 50 г до примерно 200 г после роста в течение примерно 7 дней при от примерно 17°C, при примерно 18°C, при примерно 19°C, при примерно 20°C, при примерно 21°C, при примерно 22°C, при примерно 23°C, при примерно 24°C, при примерно 25°C, при примерно 26°C, при примерно 27°C, при примерно 28°C, при примерно 29°C или при примерно 30°C в культуральной среде с рН, равным примерно рН 6,5, примерно рН 7, примерно рН 7,5, примерно рН 8,0 или примерно рН 8,5, включающей источники углерода, азота и питательных веществ и примерно 950 м.д. до примерно 8500 м.д. ионов хлора.

В некоторых воплощениях продуктивность омега-3 жирной кислоты культуры изолированного траустохитрида равна по меньшей мере примерно 2 г/л/день по меньшей мере примерно 4 г/л/день или по меньшей мере примерно 8 г/л/день после роста в течение примерно 7-ми дней при от примерно 17°C до примерно 30°C в культуральной среде с рН, равным от примерно рН 6,5 до примерно рН 8,5, включающей источники углерода, азота и питательных веществ и от примерно 950 м.д. до примерно 8500 м.д. ионов хлора. В некоторых воплощениях продуктивность омега-3 жирной кислоты культуры изолированного траустохитрида равна от примерно 1 г/л/день до примерно 20 г/л/день, от примерно 2 г/л/день до примерно 15 г/л/день, от примерно 2 г/л/день до примерно 10 г/л/день, от примерно 3 г/л/день до примерно 10 г/л/день или от примерно 4 г/л/день до примерно 9 г/л/день, после роста в течение примерно 7-ми дней при от примерно 17°C до примерно 30°C в культуральной среде с рН, равным от примерно рН 6,5 до примерно рН 8,5 включающей источники углерода, азота и питательных веществ и от примерно 950 м.д. до примерно 8500 м.д. ионов хлора.

В некоторых воплощениях объем ферментации (объем культуры) равен по меньшей мере примерно 2 л, по меньшей мере примерно 10 л, по меньшей мере примерно 50 л, по меньшей мере примерно 100 л, по меньшей мере примерно 200 л, по меньшей мере примерно 500 л, по меньшей мере примерно 1000 л, по меньшей мере примерно 10000 л, по меньшей мере примерно 20000 л, по меньшей мере примерно 50000 л, по меньшей мере примерно 100000 л, по меньшей мере примерно 150000 л, по меньшей мере примерно 200000 л или по меньшей мере примерно 250000 л. В некоторых воплощениях объем ферментации равен примерно 2 л до примерно 300000 л, примерно 2 л, примерно 10 л, примерно 50 л, примерно 100 л, примерно 200 л, примерно 500 л, примерно 1000 л, примерно 10000 л, примерно 20000 л, примерно 50000 л, примерно 100000 л, примерно 150000 л, примерно 200000 л, примерно 250000 л или примерно 300000 л.

В некоторых воплощениях изобретение направлено на изолированную траустохитридную биомассу, включающую определенный профиль жирных кислот по изобретению. В некоторых воплощениях по меньшей мере примерно 50%, по меньшей мере примерно 60%, по меньшей мере примерно 70% или по меньшей мере примерно 80% от массы сухих клеток биомассы представляют собой жирные кислоты. В некоторых воплощениях более чем примерно 50%, более чем примерно 55% или более чем примерно 60% от массы сухих клеток биомассы представляют собой жирные кислоты. В некоторых воплощениях от примерно 50% до примерно 60%, от примерно 50% до примерно 70%, от примерно 50% до примерно 80%, от примерно 55% до примерно 70%, от примерно 55% до примерно 80%, от примерно 60% до примерно 70% или от примерно 60% до примерно 80 мас.% от массы сухих клеток биомассы представляют

собой жирные кислоты. В некоторых воплощениях биомасса включает омега-3 жирные кислоты по меньшей мере примерно 50%, по меньшей мере примерно 60%, по меньшей мере примерно 70% или по меньшей мере примерно 80 мас.% от массы жирных кислот. В некоторых воплощениях биомасса включает омега-3 жирные кислоты от примерно 50% до примерно 60%, от примерно 50% до примерно 70%, от примерно 50% до примерно 80 мас.% от массы жирных кислот. В некоторых воплощениях биомасса включает ДНА по меньшей мере примерно 50%, по меньшей мере примерно 55%, по меньшей мере примерно 60%, по меньшей мере примерно 65%, по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 75% или по меньшей мере примерно 80 мас.% от массы жирных кислот. В некоторых воплощениях биомасса включает ДНА от примерно 50% до примерно 60%, примерно 50% до примерно 70% или примерно 50% до примерно 80 мас.% от массы жирных кислот. В некоторых воплощениях по меньшей мере примерно 25%, по меньшей мере примерно 30%, по меньшей мере примерно 40%, по меньшей мере примерно 50% или по меньшей мере примерно 60 мас.% от массы сухих клеток биомассы составляет докозагексаеновая кислота. В некоторых воплощениях от примерно 25% до примерно 65%, от примерно 25% до примерно 50%, от примерно 30% до примерно 40% или от примерно 25% до примерно 35 мас.% от массы сухих клеток биомассы составляет докозагексаеновая кислота. В некоторых воплощениях биомасса включает ЕРА примерно 10% или менее, примерно 9% или менее, примерно 8% или менее, примерно 7% или менее, примерно 6% или менее, примерно 5% или менее, примерно 4% или менее, примерно 3% или менее, примерно 2% или менее или примерно 1% или менее по массе от массы жирных кислот. В некоторых воплощениях биомасса включает ЕРА от примерно 1% до примерно 10%, от примерно 1% до примерно 5%, от примерно 2% до примерно 5%, от примерно 3% до примерно 5% или от примерно 3% до примерно 10 мас.% от массы жирных кислот. В некоторых воплощениях биомасса в значительной степени свободна от ЕРА. В некоторых воплощениях биомасса включает массовое отношение ДНА к ЕРА, равное по меньшей мере примерно 5:1, по меньшей мере примерно 7:1, по меньшей мере примерно 10:1, по меньшей мере примерно 11:1, по меньшей мере примерно 14:1, по меньшей мере примерно 15:1, по меньшей мере примерно 17:1, по меньшей мере примерно 20:1, по меньшей мере примерно 25:1, по меньшей мере примерно 50:1 или по меньшей мере примерно 100:1, при этом биомасса включает ЕРА примерно 10% или менее по массе от массы жирных кислот. В некоторых воплощениях биомасса включает АРА от примерно 0,1 до 0,2%, от примерно 0,1% до примерно 0,3%, от примерно 0,1% до примерно 0,4%, от примерно 0,1% до примерно 0,5% или примерно 0,1% до примерно 1,5 мас.% от массы жирных кислот. В некоторых воплощениях биомасса включает АРА примерно 1,5% или менее, примерно 1% или менее, примерно 0,5% или менее, примерно 0,4% или менее, примерно 0,3% или менее, примерно 0,2% или менее или примерно 0,1% или менее по массе от массы жирных кислот. В некоторых воплощениях биомасса существенно свободна от АРА. В некоторых воплощениях биомасса включает массовое отношение ДНА к АРА, равное по меньшей мере примерно 20:1 по меньшей мере примерно 40:1 по меньшей мере примерно 60:1 по меньшей мере примерно 80:1 по меньшей мере примерно 100:1 по меньшей мере примерно 150:1 по меньшей мере примерно 200:1 по меньшей мере примерно 250:1 или по меньшей мере примерно 300:1. В некоторых воплощениях биомасса включает DPA n-6 от примерно 0,5% до примерно 1%, от примерно 0,5% до примерно 2%, от примерно 0,5% до примерно 5%, от примерно 0,5% до примерно 6%, от примерно 1% до примерно 5%, от примерно 1% до примерно 6%, от примерно 2% до примерно 5% или от примерно 2% до примерно 6 мас.% от массы жирных кислот. В некоторых воплощениях биомасса включает DPA n-6 примерно 6% или менее, примерно 5% или менее, примерно 2% или менее, примерно 1% или менее или примерно 0,5% или менее по массе от массы жирных кислот. В некоторых воплощениях биомасса существенно свободна от DPA n-6. В некоторых воплощениях биомасса включает массовое отношение ДНА к DPA n-6, равное более чем примерно 6:1, по меньшей мере примерно 8:1, по меньшей мере примерно 10:1, по меньшей мере примерно 15:1, по меньшей мере примерно 20:1, по меньшей мере примерно 25:1, по меньшей мере примерно 50:1 или по меньшей мере примерно 100:1. В некоторых воплощениях биомасса включает жирные кислоты примерно 5% или менее, примерно 4% или менее, примерно 3% или менее или примерно 2% или менее по массе каждой из линолевой кислоты (18:2 n-6), линоленовой кислоты (18:3 n-3), эйкозеновой кислоты (20:1 n-9) и эруковой кислоты (22:1 n-9).

В другом воплощении настоящий документ обеспечивает биомассу, включающую жирные кислоты, в которой жирные кислоты дополнительно включают омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты, в которой омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты включают ДНА и ЕРА в количестве, равном примерно более чем или равно до примерно 58-68%, в особенности примерно 60 мас.%, от общего количества омега-3 полиненасыщенных жирных кислот и количество ЕРА по массе равно от примерно 5% вплоть до примерно 60% от общего количества общей массы ЕРА и ДНА.

Характеристики изолированной биомассы изобретения в большей степени связаны с эндогенными или природными свойствами изолированной биомассы, чем с добавленным извне материалом.

Микробные масла.

Настоящий документ обеспечивает масла, в особенности микробные масла, полученные описанными выше способами.

В некоторых воплощениях микробное масло включает жирные кислоты, в которых жирные кисло-

ты дополнительно включают омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты, в которых омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты включают ДНА и ЕРА в количестве, равном примерно ≥ 90 мас.% от общего количества омега-3 полиненасыщенных жирных кислот, и количество ЕРА по массе равно от примерно 6% вплоть до примерно 65% от общего количества ЕРА и ДНА. В особенности, обеспечивают микробное масло, в котором количество ЕРА по массе равно от примерно 6% вплоть до примерно 28% от общего количества ЕРА и ДНА. Дополнительно настоящий документ обеспечивает микробное масло, в котором количество ЕРА по массе равно от примерно 36% вплоть до примерно 65% от общего количества ЕРА и ДНА. Конкретнее, обеспечивают микробное масло, в котором количество ЕРА по массе равно от примерно 28% до примерно 36% от общего количества ЕРА и ДНА.

В дополнительном воплощении настоящий документ обеспечивает микробное масло, включающее жирные кислоты, в которых жирные кислоты дополнительно включают ДНА и ЕРА, и количество ЕРА по массе равно от примерно 15% вплоть до примерно 60% от общей массы ЕРА и ДНА.

В другом воплощении настоящий документ обеспечивает микробное масло, включающее жирные кислоты, в которых жирные кислоты дополнительно включают омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты, в которых омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты включают ДНА и ЕРА в количестве, равном примерно более чем или равно до примерно 58-68%, в особенности примерно 60 мас.% от общего количества омега-3 полиненасыщенных жирных кислот, и количество ЕРА по массе равно от примерно 5% вплоть до примерно 60% от общего количества общей массы ЕРА и ДНА.

Изобретение направлено на микробное масло, включающее определенный профиль жирных кислот по изобретению. Микробное масло изобретения представляет собой "неочищенное масло" или "рафинировать масло", включающее фракцию триацилглицеридов, равную по меньшей мере примерно 35 мас.%. "Неочищенное масло" представляет собой масло, которое экстрагируют из биомассы микроорганизма без дополнительной обработки. "Рафинировать масло" представляет собой масло, которое получают обработкой неочищенного масла в стандартных способах рафинирования, обесцвечивания и/или дезодорирования. См., например, патент США № 5130242, включенный в настоящий документ путем отсылки во всей своей полноте. Микробное масло также включает "итоговое масло", как описано в настоящем документе, которое представляет собой рафинированное масло, которое разводят растительным маслом. В некоторых воплощениях итоговое масло представляет собой рафинировать масло, которое разводят подсолнечным маслом с высоким содержанием олеиновой кислоты. Термин "микробное", так как применен в настоящем документе, включает без ограничений термины "из микроскопических водорослей", "траустохитридное" и из таксономических групп, связанных с любым из депонированных микроорганизмов, описанным в настоящем документе. Термины "Thraustochytriales", "траустохитрид", "Schizochytrium" и "Thraustochytrium", как применены при отсылке к любому из микробных масел из депонированных микроорганизмов, описанных в документе, основаны на современной таксономической классификации, включая доступную филогенетическую информацию, и не предназначены для ограничения в том случае, если таксономические классификации будут пересмотрены после дата подачи настоящей заявки.

В некоторых воплощениях жирная кислота, как описана в настоящем документе, может представлять собой сложный эфир жирной кислоты. В некоторых воплощениях сложный эфир жирной кислоты включает сложный эфир омега-3 жирной кислоты, омега-6 жирной кислоты и их комбинации. В некоторых воплощениях сложный эфир жирной кислоты представляет собой сложный эфир ДНА, сложный эфир ЕРА или их комбинацию. В некоторых воплощениях масло или его фракцию, как описаны в настоящем документе, этерифицируют для получения масла или его фракции, включающей сложные эфиры жирных кислот. Термин "сложный эфир" относится к замещению водорода в карбоксильной группе молекулы жирной кислоты другим заместителем. Типичные сложные эфиры известны специалистам в данной области техники, их обсуждение приведено в работе Higuchi T. и V. Stella в 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 и в руководстве Protective Groups in Organic Chemistry, McOmie ed., Plenum Press, New York, 1973. Примеры сложных эфиров включают метиловый, этиловый, пропиловый, бутиловый, пентиловый, трет-бутиловый, бензиловый, нитробензиловый, метоксибензиловый, бензгидриловый и трихлор этиловый эфир. В некоторых воплощениях сложный эфир представляет собой карбоновую кислоту со сложноэфирной защитной группой, сложные эфиры с арилкильной группой (например, бензильной, фенетильной), сложные эфиры с низшей алкенильной группой (например, аллильной, 2-бутенильной), сложные эфиры с низшей-алкоксильной-низшей-алкильной группой (например, метоксиметиловой, 2-метоксиэтиловой, 2-этоксипентиловой), сложные эфиры с низшей-алканоилоксильной-низшей-алкильной группой (например, ацетоксиметиловой, пивалоилоксиметиловой, 1-пивалоилоксиэтиловой), сложные эфиры с низшей-алкоксикарбонил-низшей-алкильной группой (например, метоксикарбонилметиловой, изопропоксикарбонилметиловой), сложные эфиры с карбоксильной-низшей алкильной группой (например, карбоксиметиловой), сложные эфиры с низшей-алкоксикарбонилоксильной-низшей-алкильной группой (например, 1-(этоксикарбонилокси)этиловой, 1-(циклогексикарбонилокси)этил), сложные эфиры с карбамоилоксильной-низшей алкил (например, карбамоилоксиметиловой) и т.п. В некоторых воплощениях добавленный заместитель представляет собой линейную или циклическую углеводородную группу, например,

C₁-C₆-алкиловый, C₁-C₆-циклоалкиловый, C₁-C₆-алкениловый или C₁-C₆-арилловый сложный эфир. В некоторых воплощениях сложный эфир представляет собой алкиловый сложный эфир, например метиловый сложный эфир, этиловый сложный эфир или пропиловый сложный эфир. В некоторых воплощениях сложный эфир заместитель добавляют к молекуле свободной жирной кислоты, если жирная кислота находится в очищенном или в получищенном состоянии. В ином случае, сложный эфир жирной кислоты образуется при превращении триглицерида в сложный эфир.

Настоящее изобретение направлено на способы получения микробных масел. В некоторых воплощениях способ включает рост любых изолированных микроорганизмов изобретения или их смесей в культуре для получения микробного масла, включающего омега-3 жирные кислоты. В некоторых воплощениях способ дополнительно включает экстракцию микробного масла. В некоторых воплощениях способ включает экстракцию микробного масла, включающего омега-3 жирные кислоты из любой биомассы изобретения или их смеси. В некоторых воплощениях способ включает гетеротрофный рост изолированного микроорганизма, в котором культура включает источник углерода, как описан в настоящем документе. Микробное масло может быть экстрагировано из свежесобранной биомассы или может быть экстрагировано из предварительно собранной биомассы, которую хранили в условиях, предотвращающих порчу. Известные способы могут быть применены для культивирования микроорганизма изобретения, выделения биомассы из культуры, экстракции микробного масла из биомассы и анализа профиля жирных кислот масел, экстрагируемых из биомассы. См., например, патент США № 5130242, включенный в настоящий документ путем отсылки во всей своей полноте. Изобретение направлено на микробное масло, продуцируемое любым из способов изобретения.

В некоторых воплощениях микробное масло экстрагируют способом энзиматической экстракции. В некоторых воплощениях микробное масло экстрагируют способом механической экстракции. В некоторых воплощениях способ механической экстракции включает одну или несколько из следующих стадий: (1) обработка пастеризованного ферментационного бульона путем гомогенизации для облегчения лизиса клеток и высвобождения масла из клеток; (2) добавление изопропилового спирта к ферментационному бульону с последующей гомогенизацией для разрушения масляной и водной эмульсии; (3) центрифугирование смеси для извлечения масляной фазы; и (4) высушивание при пониженном давлении с добавлением антиоксидантов. В некоторых воплощениях неочищенное масло очищают. В некоторых воплощениях очистка неочищенного масла включает одну или несколько из следующих стадий: (1) перекачка неочищенного масла в рафинировочный котёл и нагревание масла с последующим добавлением кислого раствора при перемешивании; (2) добавление раствора каустической соды к маслу после обработки кислотой; (3) повторное нагревание неочищенного масла и затем центрифугирование для отделения тяжелой фазы от рафинированного масла; (4) удаление оставшихся полярных соединений, следовых металлов и продуктов окисления из рафинированного масла с помощью, например, кислоты, TriSyl®, глины и/или фильтрации; (5) фильтрация на холоде обесцвеченного масла для дополнительного удаления из масла компонентов с высокой температурой плавления для достижения желаемого уровня прозрачности; (6) нагревание масла, после которого масло охлаждают и выдерживают в течение периода времени, достаточного для инициации кристаллизации триглицеридов и восков с высокой температурой плавления; (7) добавление ускорителя фильтрования к охлажденному маслу и затем удаление закристаллизовавшихся твердых веществ с помощью фильтрации; (8), применение дезодорирующего средства после фильтрации на холоде, осуществляемое при высокой температуре температура и при пониженном давлении, для удаления, например, пероксидов и любых оставшихся низкомолекулярных соединений, которые могут вызывать неприятный запах и посторонние привкусы; (9) перенесение масла в резервуар подачи дезодоранта, деаэрации и дезодорация, например, в насадочный колонный дезодоратор; и (10) охлаждение, например в атмосфере азота в конце цикла дезодорации и добавление подходящих антиоксидантов к дезодорированному маслу для обеспечения устойчивости к окислению.

В некоторых воплощениях микробное масло включает фракцию сложных эфиров стерола, равную примерно 0%, по меньшей мере примерно 0,1%, по меньшей мере примерно 0,2%, по меньшей мере примерно 0,5%, по меньшей мере примерно 1%, по меньшей мере примерно 1,5%, по меньшей мере примерно 2% или по меньшей мере примерно 5 мас.%. В некоторых воплощениях микробное масло включает фракцию сложных эфиров стерола, равную от примерно 0% до примерно 1,5%, от примерно 0% до примерно 2%, от примерно 0% до примерно 5%, от примерно 1% до примерно 1,5%, от примерно 0,2% до примерно 1,5%, от примерно 0,2% до примерно 2% или от примерно 0,2% до примерно 5 мас.%. В некоторых воплощениях микробное масло включает фракцию сложных эфиров стерола, равную примерно 5% или менее, примерно 4% или менее, примерно 3% или менее, примерно 2% или менее, примерно 1% или менее, примерно 0,5% или менее, примерно 0,3% или менее, примерно 0,2% или менее, примерно 0,5% или менее, примерно 0,4% или менее, примерно 0,3% или менее или примерно 0,2% или менее по массе.

В некоторых воплощениях микробное масло включает фракцию триацилглицеридов, равную по меньшей мере примерно 35%, по меньшей мере примерно 40%, по меньшей мере примерно 45%, по меньшей мере примерно 50%, по меньшей мере примерно 55%, по меньшей мере примерно 60%, по меньшей мере примерно 65%, по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 75%, по

фракций, которую выбирают из фракции триацилглицеридов, фракции диацилглицеридов, фракции стеролов, фракции сложных эфиров стерола, фракции свободных жирных кислот, фракции фосфолипидов и их комбинаций, включает АРА примерно 5% или менее, менее чем примерно 5%, примерно 4% или менее, примерно 3% или менее, примерно 2% или менее, примерно 1,5% или менее, примерно 1% или менее, примерно 0,5% или менее, примерно 0,4% или менее, примерно 0,3% или менее, примерно 0,2% или менее или примерно 0,1% или менее по массе. В некоторых воплощениях микробное масло и/или одна или несколько из его фракций, которую выбирают из фракции триацилглицеридов, фракции диацилглицеридов, фракции стеролов, фракции сложных эфиров стерола, фракции свободных жирных кислот, фракции фосфолипидов и их комбинаций, существенно свободна от АРА. В некоторых воплощениях микробное масло и/или одна или несколько из его фракций, которую выбирают из фракции триацилглицеридов, фракции диацилглицеридов, фракции стеролов, фракции сложных эфиров стерола, фракции свободных жирных кислот, фракции фосфолипидов и их комбинаций, включает DPA n-6 от примерно 0,4% до примерно 2%, от примерно 0,4% до примерно 3%, от примерно 0,4% до примерно 4%, от примерно 0,4% до примерно 5%, от примерно 0,4% до менее чем примерно 5%, от примерно 0,5% до примерно 1%, от примерно 0,5% до примерно 2%, от примерно 0,5% до примерно 3%, от примерно 0,5% до примерно 4%, от примерно 0,5% до примерно 5%, от примерно 0,5% до менее чем примерно 5%, от примерно 1% до примерно 2%, от примерно 1% до примерно 3%, от примерно 1% до примерно 4%, от примерно 1% до примерно 5% или от примерно 1% до менее чем примерно 5 мас.%. В некоторых воплощениях микробное масло и/или одна или несколько из его фракций, которую выбирают из фракции триацилглицеридов, фракции диацилглицеридов, фракции стеролов, фракции сложных эфиров стерола, фракции свободных жирных кислот, фракции фосфолипидов и их комбинаций, включает DPA n-6 примерно 5%, менее чем примерно 5%, примерно 4% или менее, примерно 3% или менее, примерно 2% или менее, примерно 1% или менее, примерно 0,75% или менее, примерно 0,6% или менее или примерно 0,5% или менее по массе. В некоторых воплощениях микробное масло и/или одна или несколько из его фракций, которую выбирают из фракции триацилглицеридов, фракции диацилглицеридов, фракции стеролов, фракции сложных эфиров стерола, фракции свободных жирных кислот, фракции фосфолипидов и их комбинаций, существенно свободна от DPA n-6. В некоторых воплощениях микробное масло и/или одна или несколько из его фракций, которую выбирают из фракции триацилглицеридов, фракции диацилглицеридов, фракции стеролов, фракции сложных эфиров стерола, фракции свободных жирных кислот, фракции фосфолипидов и их комбинаций, включает жирные кислоты с примерно 5% или менее, менее чем примерно 5%, примерно 4% или менее, примерно 3% или менее или примерно 2% или менее по массе олеиновой кислоты (18:1 n-9), линолевой кислоты (18:2 n-6), линоленовой кислоты (18:3 n-3), эйкозеновой кислоты (20:1 n-9), эруковой кислоты (22:1 n-9), стеариновой кислоты (18:4 n-3) или их комбинаций.

Молекула триглицерида содержит 3 центральных атома углерода ($C(sn-1)H_2R_1-(sn-2)H_2R_2-C(sn-3)H_2R_3$), что позволяет формировать различные позиционные изомеры. В некоторых воплощениях микробное масло включает фракцию триацилглицеридов, в которой по меньшей мере примерно 2%, по меньшей мере примерно 3%, по меньшей мере примерно 5%, по меньшей мере примерно 10%, по меньшей мере примерно 15%, по меньшей мере примерно 20%, по меньшей мере примерно 30%, по меньшей мере примерно 35% или по меньшей мере примерно 40% триглицеридов во фракции триацилглицеридов содержат ДНА в двух положениях в триглицериде (двузамещенная ДНА), которые выбирают из любых двух следующих положений: sn-1, sn-2 и sn-3, на основании процента от относительной площади пиков в HPLC-хроматографии. В некоторых воплощениях микробное масло включает фракцию триацилглицеридов, в которой от примерно 2% до примерно 55%, от примерно 2% до примерно 50%, от примерно 2% до примерно 45%, от примерно 2% до примерно 40%, от примерно 2% до примерно 35%, от примерно 2% до примерно 30%, от примерно 2% до примерно 25%, от примерно 5% до примерно 55%, от примерно 5% до примерно 50%, от примерно 5% до примерно 45%, от примерно 5% до примерно 40%, от примерно 5% до примерно 35%, от примерно 5% до примерно 30%, от примерно 5% до примерно 25%, от примерно 10% до примерно 55%, от примерно 10% до примерно 50%, от примерно 10% до примерно 45%, от примерно 10% до примерно 40%, от примерно 10% до примерно 35%, от примерно 10% до примерно 30%, от примерно 10% до примерно 25%, от примерно 10% до примерно 20%, от примерно 20% до примерно 40%, от примерно 20% до примерно 35% или примерно 20% до примерно 25% триглицеридов во фракции триацилглицеридов содержат EPA в двух положениях в триглицериде, которые выбирают из любых двух следующих положений: sn-1, sn-2 или sn-3, на основании процента от относительной площади пиков в HPLC-хроматографии. В некоторых воплощениях микробное масло включает фракцию триацилглицеридов, в которой по меньшей мере примерно 0,5%, по меньшей мере примерно 1%, по меньшей мере примерно 1,5% или по меньшей мере примерно 2% триглицеридов во фракции триацилглицеридов содержат ДНА во всех положениях из sn-1, sn-2 и sn-3 (тризамещенная ДНА), на основании процента от относительной площади пиков в HPLC-хроматографии. В некоторых воплощениях микробное масло включает фракцию триацилглицеридов, в которой от примерно 0,5% до примерно 5%, от примерно 0,5% до примерно 3%, от примерно 0,5% до примерно 2,5%, от примерно 0,5% до примерно 2%, от примерно 1% до примерно 5%, от примерно 1% до примерно 3% или от примерно 1% до примерно 2%

триглицеридов во фракции триацилглицеридов содержат ДНА во всех положениях из sn-1, sn-2 и sn-3, на основании процента от относительной площади пиков в HPLC-хроматографии. В некоторых воплощениях микробное масло включает фракцию триацилглицеридов, в которой по меньшей мере примерно 10%, по меньшей мере примерно 15%, по меньшей мере примерно 20%, по меньшей мере примерно 25%, по меньшей мере примерно 30%, по меньшей мере примерно 35%, по меньшей мере примерно 40%, по меньшей мере примерно 45%, по меньшей мере примерно 50%, по меньшей мере примерно 55% или по меньшей мере примерно 60% триглицеридов во фракции триацилглицеридов содержат ДНА в одном положении в триглицериде, которое выбирают из одного из следующих положений sn-1, sn-2 или sn-3, на основании процента от относительной площади пиков в HPLC-хроматографии. В некоторых воплощениях микробное масло включает фракцию триацилглицеридов, в которой от примерно 10% до примерно 80%, от примерно 10% до примерно 70%, от примерно 10% до примерно 60%, от примерно 15% до примерно 80%, от примерно 15% до примерно 75%, от примерно 15% до примерно 70%, от примерно 15% до примерно 65%, от примерно 15% до примерно 60%, от примерно 35% до примерно 80%, от примерно 35% до примерно 75%, от примерно 35% до примерно 65%, от примерно 35% до примерно 60%, от примерно 40% до примерно 80%, от примерно 40% до примерно 75%, от примерно 40% до примерно 70%, от примерно 40% до примерно 65%, от примерно 40% до примерно 60% или примерно 40% до примерно 55% триглицеридов во фракции триацилглицеридов содержат ДНА в одном положении в триглицериде, которое выбирают из одного из следующих положений sn-1, sn-2 и sn-3, на основании процента от относительной площади пиков в HPLC-хроматографии.

Настоящее изобретение дополнительно направлено на способы получения микробных масел. В некоторых воплощениях способ включает рост траустохитрида изобретения в культуре для получения биомассы и экстрагирование масла, включающего омега-3 жирные кислоты из биомассы. Масло может быть экстрагировано из свежесобранной биомассы или может быть экстрагировано из заранее собранной биомассы, которую хранят в условиях, предотвращающих порчу. Для культивирования траустохитрида изобретения, выделения биомассы из культуры, экстракции микробного масла из биомассы и анализа профиля жирных кислот масел, экстрагируемого из биомассы, могут быть применены известные способы. См., например, патент США № 5130242.

Изобретение дополнительно направлено на микробное масло, включающее определенный профиль жирных кислот по изобретению. Микробное масло изобретения может представлять собой любое масло, полученное от микроорганизма, включая, например: неочищенное масло, экстрагируемое из биомассы микроорганизма без дополнительной обработки; рафинированное масло, которое получают обработкой неочищенного микробного масла, применяя дополнительные стадии обработки, такие как рафинирование, обесцвечивание и/или дезодорирование; разбавленное микробное масло, полученное с помощью разбавления неочищенного или рафинированного микробного масла; или обогащенное масло, которое получают, например, обработкой неочищенного или рафинированного микробного масла с помощью дополнительных способов очистки для увеличения концентрации жирной кислоты (такой как ДНА) в масле.

В некоторых воплощениях микробное масло включает фракцию сложных эфиров стерола, равную примерно 0%, по меньшей мере примерно 0,1%, по меньшей мере примерно 0,2%, по меньшей мере примерно 0,5%, по меньшей мере примерно 1%, по меньшей мере примерно 1,5%, по меньшей мере примерно 2% или по меньшей мере примерно 5 мас.%. В некоторых воплощениях микробное масло включает фракцию сложных эфиров стерола, равную от примерно 0% до примерно 1,5%, от примерно 0% до примерно 2%, от примерно 0% до примерно 5%, от примерно 1% до примерно 1,5%, от примерно 0,2% до примерно 1,5%, от примерно 0,2% до примерно 2% или примерно 0,2% до примерно 5 мас.%. В некоторых воплощениях микробное масло включает фракцию сложных эфиров стерола, равную, менее чем примерно 5%, менее чем примерно 4%, менее чем примерно 3% или менее чем примерно 2 мас.%. В некоторых воплощениях микробное масло включает фракцию триглицеридов, равную по меньшей мере примерно 65%, по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 75%, по меньшей мере примерно 80%, по меньшей мере примерно 85% или по меньшей мере примерно 90 мас.%. В некоторых воплощениях микробное масло включает фракцию триглицеридов, равную от примерно 65% до примерно 95%, от примерно 75% до примерно 95% или от примерно 80% до примерно 95 мас.% или примерно 97 мас.% или примерно 98 мас.%. В некоторых воплощениях микробное масло включает фракцию свободной жирной кислоты, равную по меньшей мере примерно 0,5%, по меньшей мере примерно 1%, по меньшей мере примерно 1,5%, по меньшей мере примерно 2%, по меньшей мере примерно 2,5% или по меньшей мере примерно 5 мас.%. В некоторых воплощениях микробное масло включает фракцию свободной жирной кислоты, равную от примерно 0,5% до примерно 5%, от примерно 0,5% до примерно 2,5%, от примерно 0,5% до примерно 2%, от примерно 0,5% до примерно 1,5%, от примерно 0,5% до примерно 1%, от примерно 1% до примерно 2,5%, от примерно 1% до примерно 5%, от примерно 1,5% до примерно 2,5%, от примерно 2% до примерно 2,5% или от примерно 2% до примерно 5 мас.%. В некоторых воплощениях микробное масло включает фракцию свободной жирной кислоты, равную менее чем примерно 5%, менее чем примерно 4%, менее чем примерно 3%, менее чем примерно 2% или менее чем примерно 1 мас.%. В некоторых воплощениях микробное масло включает фракцию стеролов, рав-

ную по меньшей мере примерно 0,5%, по меньшей мере примерно 1%, по меньшей мере примерно 1,5%, по меньшей мере примерно 2% или по меньшей мере примерно 5 мас.%. В некоторых воплощениях микробное масло включает фракцию стеролов, равную от примерно 0,5% до примерно 1,5%, от примерно 1% до примерно 1,5%, от примерно 0,5% до примерно 2%, от примерно 0,5% до примерно 5%, от примерно 1% до примерно 2% или от примерно 1% до примерно 5 мас.%. В некоторых воплощениях микробное масло включает фракцию стеролов, равную менее чем примерно 5%, менее чем примерно 4%, менее чем примерно 3%, менее чем примерно 2% или менее чем примерно 1 мас.%. В некоторых воплощениях микробное масло включает фракцию диглицеридов, равную по меньшей мере примерно 1,5%, по меньшей мере примерно 2%, по меньшей мере примерно 2,5%, по меньшей мере примерно 3%, по меньшей мере примерно 3,5% или по меньшей мере примерно 5 мас.%. В некоторых воплощениях микробное масло включает фракцию диглицеридов, равную от примерно 1,5% до примерно 3%, от примерно 2% до примерно 3%, от примерно 1,5% до примерно 3,5%, от примерно 1,5% до примерно 5%, от примерно 2,5% до примерно 3%, от примерно 2,5% до примерно 3,5% или от примерно 2,5% до примерно 5 мас.%. В некоторых воплощениях микробное масло включает неомыляемые вещества в количестве, равном менее чем примерно 2%, менее чем примерно 1,5%, менее чем примерно 1% или менее чем примерно 0,5 мас.% от массы масла. Классы липидов, присутствующие в микробном масле, такие как фракция триглицеридов, могут быть отделены с помощью флэш-хроматографии и проанализированы с помощью тонкослойной хроматографии (TLC) или отделены и проанализированы с помощью других способов, известных в этой области техники.

В некоторых воплощениях микробное масло и/или одна или несколько из его фракций, которую выбирают из фракции триглицеридов, фракции свободных жирных кислот, фракции стеролов, фракции диглицеридов и их комбинаций, включает по меньшей мере примерно 40%, по меньшей мере примерно 45%, по меньшей мере примерно 50%, по меньшей мере примерно 55%, по меньшей мере примерно 60%, по меньшей мере примерно 65%, по меньшей мере примерно 70%, по меньшей мере примерно 75% или по меньшей мере примерно 80 мас.% ДНА. В некоторых воплощениях микробное масло и/или одна или несколько из его фракций, которую выбирают из фракции триглицеридов, фракции свободных жирных кислот, фракции стеролов, фракции диглицеридов и их комбинаций, включает от примерно 40% до примерно 45%, от примерно 40% до примерно 50%, от примерно 40% до примерно 60%, от примерно 50% до примерно 60%, от примерно 55% до примерно 60%, от примерно 40% до примерно 65%, от примерно 50% до примерно 65%, от примерно 55% до примерно 65%, от примерно 40% до примерно 70%, от примерно 40% до примерно 80%, от примерно 50% до примерно 80%, от примерно 55% до примерно 80%, от примерно 60% до примерно 80% или от примерно 70% до примерно 80 мас.% ДНА. В некоторых воплощениях микробное масло включает фракцию сложных эфиров стеролов, включающую примерно 45% или менее, примерно 40% или менее, примерно 35% или менее, примерно 30% или менее, примерно 25% или менее, примерно 20% или менее, примерно 15% или менее или примерно 13% или менее по массе ДНА. В некоторых воплощениях микробное масло и/или одна или несколько из его фракций, которые выбирают из фракции триглицеридов, фракции свободных жирных кислот, фракции стеролов, фракции диглицеридов и их комбинаций, включает ЕРА примерно 10% или менее, примерно 9% или менее, примерно 8% или менее, примерно 7% или менее, примерно 6% или менее, примерно 5% или менее, примерно 4% или менее, примерно 3% или менее, примерно 2% или менее или примерно 1% или менее по массе. В некоторых воплощениях микробное масло и/или одна или несколько из его фракций, которую выбирают из фракции триглицеридов, фракции свободных жирных кислот, фракции стеролов, фракции диглицеридов и их комбинации, включает ЕРА от примерно 2% до примерно 3%, примерно 2% до примерно 3,5%, примерно 2,5% до примерно 3,5%, примерно 2% до примерно 6%, примерно 2,5% до примерно 6%, примерно 3,0% до примерно 6%, примерно 3,5% до примерно 6%, примерно 5% до примерно 6% или примерно 2% до примерно 10 мас.%. В некоторых воплощениях микробное масло и/или одна или несколько из его фракций, которую выбирают из фракции сложных эфиров стерола, фракцию триглицеридов, фракцию свободных жирных кислот, фракцию стеролов, фракцию диглицеридов, фракцию полярных соединений (включая фракцию фосфолипидов) и их комбинации, в значительной степени свободна от ЕРА. В некоторых воплощениях микробное масло и/или одна или несколько из его фракций, которую выбирают из фракции сложных эфиров стерола, фракции триглицеридов, фракции свободных жирных кислот, фракции стеролов, фракции диглицеридов, фракции полярных соединений (включая фракцию фосфолипидов) и их комбинаций, включает массовое отношение ДНА к ЕРА, равное по меньшей мере примерно 5:1, по меньшей мере примерно 7:1, по меньшей мере примерно 9:1, по меньшей мере примерно 10:1, по меньшей мере примерно 15:1, по меньшей мере примерно 20:1, по меньшей мере примерно 25:1, по меньшей мере примерно 30:1 или по меньшей мере примерно 50:1, в которой микробное масло и/или одну или несколько из его фракций включает 10% или менее по массе ЕРА. В некоторых воплощениях микробное масло и/или одна или несколько из его фракций, которую выбирают из фракции сложных эфиров стерола, фракции триглицеридов, фракции свободных жирных кислот, фракции стеролов, фракции диглицеридов, фракции полярных соединений (включая фракцию фосфолипидов) и их комбинаций, включает массовое отношение ДНА к ЕРА, равное по меньшей мере примерно 5:1, но менее чем примерно 20:1. В некоторых воплощениях массовое отношение ДНА к ЕРА равно от примерно

5:1 до примерно 18:1, от примерно 7:1 до примерно 16:1 или от примерно 10:1 до примерно 15:1. В некоторых воплощениях микробное масло и/или одна или несколько из его фракций, которую выбирают из фракции сложных эфиров стерола, фракции триглицеридов, фракции свободных жирных кислот, фракции стеролов, фракции диглицеридов, фракции полярных соединений (включая фракцию фосфолипидов) и их комбинаций, включает от примерно 0,1% до примерно 0,25%, от примерно 0,2% до примерно 0,25%, от примерно 0,1% до примерно 0,5% или примерно 0,1% до примерно 1,5 мас.% АРА. В некоторых воплощениях микробное масло и/или одна или несколько из его фракций, которую выбирают из фракцию сложных эфиров стерола, фракцию триглицеридов, фракцию свободных жирных кислот, фракцию стеролов, фракцию диглицеридов, фракцию полярных соединений (включая фракцию фосфолипидов) и их комбинации, включает АРА примерно 1,5% или менее, примерно 1% или менее, примерно 0,5% или менее, примерно 0,2% или менее или примерно 0,1% или менее по массе. В некоторых воплощениях микробное масло и/или одна или несколько из его фракций, которую выбирают из фракцию сложных эфиров стерола, фракцию триглицеридов, фракцию свободных жирных кислот, фракцию стеролов, фракцию диглицеридов, фракцию полярных соединений (включая фракцию фосфолипидов) и их комбинации, включает массовое отношение ДНА к АРА, равное по меньшей мере примерно 20:1, по меньшей мере примерно 30:1, по меньшей мере примерно 35:1, по меньшей мере примерно 40:1, по меньшей мере примерно 60:1, по меньшей мере примерно 80:1, по меньшей мере примерно 100:1, по меньшей мере примерно 150:1, по меньшей мере примерно 200:1, по меньшей мере примерно 250:1 или по меньшей мере примерно 300:1. В некоторых воплощениях микробное масло и/или одна или несколько из его фракций, которую выбирают из фракции сложных эфиров стерола, фракции триглицеридов, фракции свободных жирных кислот, фракции стеролов, фракции диглицеридов, фракции полярных соединений (включая фракцию фосфолипидов) и их комбинаций, включает DPA n-6 от примерно 0,5% до примерно 1%, от примерно 0,5% до примерно 2%, от примерно 0,5% до примерно 2,5%, от примерно 0,5% до примерно 3%, от примерно 0,5% до примерно 3,5%, от примерно 0,5% до примерно 5%, от примерно 0,5% до примерно 6%, от примерно 1% до примерно 2%, от примерно 2% до примерно 3%, от примерно 2% до примерно 3,5%, от примерно 1% до примерно 2,5%, от примерно 1% до примерно 3%, от примерно 1% до примерно 3,5%, от примерно 1% до примерно 5% или от примерно 1% до примерно 6 мас.%. В некоторых воплощениях микробное масло и/или одна или несколько из его фракций, которую выбирают из фракцию сложных эфиров стерола, фракцию триглицеридов, фракцию свободных жирных кислот, фракцию стеролов, фракцию диглицеридов, фракцию полярных соединений (включая фракцию фосфолипидов) и их комбинации, включает примерно 6% или менее, примерно 5% или менее, примерно 3% или менее, примерно 2,5% или менее, примерно 2% или менее, примерно 1% или менее или примерно 0,5% или менее по массе DPA n-6. В некоторых воплощениях микробное масло и/или одна или несколько из его фракций, которую выбирают из фракции сложных эфиров стерола, фракции триглицеридов, фракции свободных жирных кислот, фракции стеролов, фракции диглицеридов, фракции полярных соединений (включая фракцию фосфолипидов) и их комбинаций, существенно свободна от DPA n-6. В некоторых воплощениях микробное масло и/или одна или несколько из его фракций, которую выбирают из фракции сложных эфиров стерола, фракции триглицеридов, фракции свободных жирных кислот, фракции стеролов, фракции диглицеридов, фракции полярных соединений (включая фракцию фосфолипидов) и их комбинаций, включает массовое отношение ДНА к DPA n-6, равное более чем примерно 6:1, равное по меньшей мере примерно 8:1, по меньшей мере примерно 10:1, по меньшей мере примерно 15:1, по меньшей мере примерно 20:1, по меньшей мере примерно 25:1, по меньшей мере примерно 50:1 или по меньшей мере примерно 100:1. В некоторых воплощениях микробное масло и/или одна или несколько из его фракций, которую выбирают из фракции сложных эфиров стерола, фракции триглицеридов, фракции свободных жирных кислот, фракции стеролов, фракции диглицеридов, фракции полярных соединений (включая фракцию фосфолипидов) и их комбинаций, включает примерно 5% или менее, примерно 4% или менее, примерно 3% или менее, примерно 2% или менее, примерно 1,5% или менее, примерно 1% или менее или примерно 0,5% или менее по массе каждой из линолевой кислоты (18:2 n-6), линоленовой кислоты (18:3 n-3), эйкозеновой кислоты (20:1 n-9) и эруковой кислоты (22:1 n-9). В некоторых воплощениях микробное масло и/или одна или несколько из его фракций, которую выбирают из фракции сложных эфиров стерола, фракции триглицеридов, фракции свободных жирных кислот, фракции стеролов, фракции диглицеридов, фракции полярных соединений (включая фракцию фосфолипидов) и их комбинации, включает примерно 5% или менее, примерно 4% или менее, примерно 3% или менее, примерно 2% или менее, примерно 1,5% или менее или примерно 1% или менее по массе гептадекановой кислоты (17:0). В некоторых воплощениях микробное масло и/или одна или несколько из его фракций включает от примерно 0,01% до примерно 5 мас.%, от примерно 0,05% до примерно 3 мас.% или от примерно 0,1% до примерно 1 мас.% гептадекановой кислоты.

Молекула триглицерида содержит 3 центральных атомов углерода ($C_{sn-1}H_2R1-C_{sn-2}H_2R2-C_{sn-3}H_2R3$), что позволяет формировать различные позиционные изомеры. В некоторых воплощениях микробное

масло включает фракцию триглицеридов, в которой по меньшей мере примерно 20%, по меньшей мере примерно 30%, по меньшей мере примерно 35% или по меньшей мере примерно 40% триглицеридов во фракции триглицеридов содержат ДНА в двух положениях в триглицериде (двузамещенная ДНА), которые выбирают из любых двух следующих положений: sn-1, sn-2 и sn-3, на основании процента от относительной площади пиков в HPLC-хроматографии. В некоторых воплощениях микробное масло включает фракцию триглицеридов, в которой от примерно 20% до примерно 40%, от примерно 20% до примерно 35%, от примерно 30% до примерно 40% или от примерно 30% до примерно 35% триглицеридов во фракции триглицеридов содержат ДНА в двух положениях в триглицериде, которые выбирают из любых двух следующих положений: sn-1, sn-2 или sn-3, на основании процента от относительной площади пиков в HPLC-хроматографии. В некоторых воплощениях микробное масло включает фракцию триглицеридов, в которой по меньшей мере примерно 5%, по меньшей мере примерно 10%, по меньшей мере примерно 15% или по меньшей мере примерно 20% триглицеридов во фракции триглицеридов содержат ДНА во всех положениях из sn-1, sn-2 и sn-3 (тризамещенная ДНА), на основании процента от относительной площади пиков в HPLC-хроматографии. В некоторых воплощениях микробное масло включает фракцию триглицеридов, в которой от примерно 5% до примерно 20%, от примерно 5% до примерно 15%, от примерно 10% до примерно 20% или от примерно 10% до примерно 15% триглицеридов во фракции триглицеридов содержат ДНА во всех положениях из sn-1, sn-2 и sn-3, на основании процента от относительной площади пиков в HPLC-хроматографии. Напротив, виды TAG, о которых сообщают в патенте США № 6582941, не содержат ДНА во всех трех положениях. В некоторых воплощениях микробное масло включает фракцию триглицеридов, в которой по меньшей мере примерно 50%, по меньшей мере примерно 55%, по меньшей мере примерно 60%, по меньшей мере примерно 65%, по меньшей мере примерно 70% или по меньшей мере примерно 75% триглицеридов во фракции триглицеридов содержат ДНА в одном положении в триглицериде, которое выбирают из одного из следующих положений: sn-1, sn-2 или sn-3, на основании процента от относительной площади пиков в HPLC-хроматографии. В некоторых воплощениях микробное масло включает фракцию триглицеридов, в которой от примерно 50% до примерно 75%, от примерно 50% до примерно 70%, от примерно 50% до примерно 65%, от примерно 60% до примерно 75%, от примерно 60% до примерно 70% или от примерно 60% до примерно 65% триглицеридов во фракции триглицеридов содержат ДНА в одном положении в триглицериде, которое выбирают из одного из следующих положений: sn-1, sn-2 и sn-3, на основании процента от относительной площади пиков в HPLC-хроматографии.

Композиции.

Изобретение направлено на композиции, включающие микроорганизм изобретения, изолированную биомассу изобретения, микробное масло изобретения или их комбинации.

Микроорганизм, биомасса или микробное масло изобретения могут быть дополнительно химически или физически модифицированы или подвергнуты обработке в зависимости от требований, предъявляемых к композиции, с помощью любых из известных технологий.

Микроорганизмы клетки или биомассы могут быть высушены перед применением в композиции способами, включающими, без ограничений, сублимационную сушку, сушку на воздухе, распылительную сушку, туннельную сушку, сушку при пониженном давлении (лиофилизацию) и схожие процессы. Альтернативно, собранная и промытая биомасса может быть применена в композиции непосредственно, без сушки. См., например, патенты США № 5130242 и 6812009, каждый из которых включен в настоящий документ путем отсылки во всей своей полноте.

Микробные масла изобретения могут быть применены в качестве исходного материала для более эффективного получения продукта, обогащенного жирной кислотой, такой как ЕРА. Например, микробные масла изобретения могут быть очищены с помощью различных технологий, известных в этой области техники, таких как дистилляция или добавление мочевины, для получения продукта более высокого качества с более высокими концентрациями ЕРА или другой жирной кислоты. Микробные масла изобретения также могут быть применены в химических реакциях для получения соединений, представляющих собой производные жирных кислот в маслах, таких как сложные эфиры и соли ЕРА или другой жирной кислоты.

Композиция изобретения может включать один или несколько наполнителей. Так как применен в настоящем документе, термин "наполнитель" относится к компоненту или смеси компонентов, который применяют в композициях настоящего изобретения для придания желаемых характеристик композициям, включая продукты питания, а также фармацевтические, косметические и промышленные композиции. Наполнитель настоящего изобретения может быть описан как "фармацевтически приемлемый" наполнитель, если его добавляют к фармацевтической композиции, это означает, что наполнитель представляет собой соединение, материал, композицию, соль и/или лекарственную форму, которые, в рамках медицинской клинической оценки, подходят для контакта с тканями людей и животных, не представляющих собой человека, без неприемлемой токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблемных осложнений на протяжении желаемой продолжительности контакта и соизмеримы с разумным соотношением польза/риск. В некоторых воплощениях термин "фармацевтически приемлемый" означает одобренный контрольным органом федерального правительства или правительства штата

или приведенный в Фармакопеи США или в другой общепризнанной международной фармакопеи для применения у животных и, более предпочтительно, у людей. Могут быть применены различные наполнители. В некоторых воплощениях наполнитель может представлять собой, без ограничений, щелочное средство, стабилизатор, антиоксидант, средство, повышающее адгезию, разделительное средство, средство для покрытия, компонент внешней фазы, компонент для обеспечения контролируемого высвобождения, растворитель, поверхностно-активное вещество, увлажнитель, буферное вещество, наполнитель, смягчающее средство или их комбинации. Наполнители в дополнение к тем, которые обсуждают в настоящем документе, могут включать, но не ограничиваются, наполнители, приведенные в руководстве Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st ed. (2005). В настоящем документе включение наполнителя в конкретную классификацию (например, "растворитель") предназначено, скорее, для иллюстрации, а не для ограничения роли наполнителя. Конкретный наполнитель может попадать под множество классификаций.

Композиции изобретения включают, но не ограничиваются, продукты питания, фармацевтические композиции, косметические и промышленные композиции.

В некоторых воплощениях композиция представляет собой продукт питания. Продукт питания представляет собой любой продукт для питания животного, не представляющего собой человека, или для потребления человеком и включает как твердые, так и жидкие композиции. Продукт питания может представлять собой добавку к продуктам питания животного или человека. Продукты питания включают, но не ограничиваются, общепринятые продукты питания; жидкие продукты, включая разные типы молока, напитки, лечебные напитки и питательные напитки; функциональные продукты питания; добавки; нутрицевтики; детские смеси, включая детские смеси для недоношенных детей; продукты питания для беременных или кормящих женщин; продукты питания для взрослых; гериатрические продукты питания; и продукты питания для животных.

В некоторых воплощениях микроорганизма биомасса или микробное масло изобретения могут быть применены непосредственно как следующее или включены в качестве добавки в одно или несколько из следующего: масло, кулинарный жир, пастообразный продукт, другой жирный ингредиент, напиток, соус, молочный или соевый продукт питания (такое как молоко, йогурт, сыр и мороженое), хлебобулочные изделия, питательный продукт, например в виде пищевой добавки (в форме капсулы или таблетки), витаминная добавка, диетическая добавка, напиток в порошке и готовые или полуготовые порошкообразные продукты питания. В некоторых воплощениях пищевая добавка представлена в форме капсулы для питания вегетарианцев, которая не изготовлена из каких-либо компонентов из животного источника и которая их не содержит.

Неполный список пищевых композиций, которые могут включать микробное масло изобретения, включает без ограничений продукты на соевой основе (различные виды молока, мороженого, йогуртов, напитков, кремов, пастообразных продуктов, сухих заменителей молока или сливок); супы и суповые смеси; различные виды теста, жидкого теста и хлебобулочных изделий, включая, например, мелкие хлебобулочные изделия, хлопья для завтрака, торты, чизкейки, пироги, кексы, печенье, полоски, различные виды хлеба, булочки, печенье, кексы, пирожные, лепешки, сухарики, крекеры, сладости, закуски, пирожки, батончики мюсли /батончики-закуски и мучные изделия для приготовления в тостере; конфеты; твердые кондитерские изделия; шоколад и другие кондитерские изделия; жевательные резинки; жидкие пищевые продукты, например разные виды молока, энергетические напитки, детские смеси, газированные напитки, чай, жидкие продукты питания, фруктовые соки, напитки на основе соков, напитки на основе овощей; мультивитаминные сиропы, заменители пищевых продуктов, медицинские продукты питания и сиропы; смеси порошкообразных напитков; пасту; переработанную рыбную продукцию; переработанную мясную продукцию; переработанную продукцию из мяса птицы; подливки и соусы; приправы (кетчуп, майонез и т.д.); пастообразные продукты на основе овощных масел; молочные продукты; йогурт; масла; замороженные молочные продукты; различные виды мороженого; замороженные десерты; замороженные йогурты; полутвердые пищевые продукты, такие как детское питание; пудинги и желатиновые десерты; обработанный и необработанный сыр; смеси для приготовления блинов; пищевые батончики, включая энергетические батончики; смеси для приготовления вафель; заправки для салатов; смеси заменяющие яйца; ореховые пасты и пасты на основе орехов; соленые закуски, такие как картофельные чипсы и другие виды чипсов или хрустящий картофель, кукурузные чипсы, кукурузные тортильи, экструдированные закуски, попкорн, крендели, жареный хрустящий картофель и орехи; и специальные закуски, такие как соусы для обмакивания, закуски из сухофруктов, мясные закуски, свиные шкварки, пищевые батончики для лечебного питания и рисовые/кукурузные лепешки.

В некоторых воплощениях микробное масло изобретения может быть применено в качестве добавки к детской смеси. В детскую смесь можно дополнить одним микробным маслом изобретения или в комбинации с рафинированным физическим способом маслом, полученным от микроорганизма, продуцирующего арахионовую кислоту (ARA). ARA-продуцирующий микроорганизм, например, представляет собой *Mortierella alpina* или *Mortierella sect. schmuckeri*. Альтернативно, детские смеси могут быть дополнены микробным маслом изобретения в комбинации с маслом, обогащенным ARA, включая ARASCO® ("Martek Biosciences", Columbia, MD).

В некоторых воплощениях композиция представляет собой корма для животных. Термин "животное" включает организм, не представляющий собой человека, относящийся к царству Животных, и включает, без ограничений, водных животных и наземных животных. Термин "корма для животных" или "пища для животных" относится к любому продукту питания, предназначенному для потребления животным, не представляющим собой человека, например для рыб, рыб, разводимых в коммерческих целях; декоративных рыб; молоди рыб; двустворчатых моллюсков; раковинных моллюсков; иных моллюсков; ракообразных; креветок; личинок креветок; артемий; коловраток; солоноводных креветок; животных-фильтраторов; амфибий; рептилий; млекопитающих; домашних животных; сельскохозяйственных животных; животных, содержащихся в зоопарке; спортивных животных; животных-производителей; скаковых животных; цирковых животных; животных, представляющих собой семейную ценность; редких или вымирающих видов животных; животных-компаньонов; животных-домашних питомцев, таких как собаки, кошки, морские свинки, кролики, крысы, мыши или лошади; приматов, таких как обезьяны (например, капуцины, макаки-резус, африканская зеленая мартышка, мартышки-гусар, яванские макаки и церкопитеки), человекообразных обезьян, орангутанги, табуины, гиббоны и шимпанзе; собачьи, такие как собаки и волки; кошачьи, такие как кошки, львы и тигры; непарнокопытные, такие как лошади, ослы и зебры; животных, используемых для производства пищевых продуктов, такие как коровы, крупный рогатый скот, свиньи и овцы; копытные, такие как олени и жирафы; или грызуны, такие как мыши, крысы, хомяки и морские свинки; и тому подобные. Корма для животных включают без ограничений корма для аквакультуры, корма для домашних животных, включая корма для домашних питомцев, корма для животных из зоопарка, корма для рабочих животных, корма для скота и их комбинации.

В некоторых воплощениях композиция представляет собой корм или кормовую добавку для любого животного, чье мясо или получаемые от него продукты человек потребляет в пищу, для таких, как любое животное, от которого получают мясо, яйца или молоко для потребления человеком. При кормлении таких животных, питательные вещества, такие как LC-PUFAs, могут включаться в мышечную массу, молоко, яйца или другие продукты таких животных для увеличения содержания в них данных питательных веществ.

В некоторых воплощениях композиция представляет собой материал, высушенный распылительной сушкой, который можно измельчить для получения частиц такого размера, который подходит для потребления зоопланктоном, артемиями, коловратками и животными-фильтраторами. В некоторых воплощениях зоопланктон, артемия или коловратки, которых кормили композицией, в свою очередь служили кормом для молоди рыб, рыб, моллюсков, двустворчатых моллюсков или ракообразных.

В некоторых воплощениях композиция представляет собой фармацевтическую композицию. Подходящие фармацевтические композиции включают, без ограничений, противовоспалительную композицию, лекарственное средство для лечения коронарного заболевания сердца, лекарственное средство для лечения атеросклероза, химиотерапевтическое средство, активный наполнитель, лекарственное средство от остеопороза, антидепрессант, противосудорожное средство, лекарственное средство против *Helicobacter pylori*, лекарственное средство для лечения нейродегенеративного заболевания, лекарственное средство для лечения дегенеративного заболевания печени, антибиотик, композицию, снижающую уровень холестерина и композицию, снижающую уровень триглицеридов. В некоторых воплощениях композиция представляет собой лечебное питание. Лечебное питание включает продукт питания, который присутствует в предназначенных для потребления композициях, или его вводят извне под наблюдением врача, и который предназначен для конкретного диетического вмешательства в состояние, для которого особые требования к питанию, основанные на признанных научных принципах, установлены медицинской экспертизой.

В некоторых воплощениях микробное масло может быть введено в состав лекарственной формы. Лекарственные формы могут включать, без ограничений, таблетки, капсулы, облатки, пеллеты, пилюли, порошки и гранулы и лекарственные формы для парентерального введения, которые включают, без ограничений, растворы, суспензии, эмульсии и сухие порошки, включающие эффективное количество микробного масла. Также в этой области техники известно, что такие композиции также могут содержать фармацевтически приемлемые растворители, наполнители, дезинтегрирующие средства, связующие вещества, смазывающие вещества, поверхностно-активные вещества, гидрофобные носители, водорастворимые носители, эмульгаторы, буферы, смачивающие средства, увлажняющие средства, солибулизаторы, консерванты и т.п. Формы для введения могут включать, но не ограничиваются, таблетки, драже, капсулы, таблетки в форме капсул и пилюли, которые содержат микробное масло и один или несколько подходящих фармацевтически приемлемых носителей.

Для перорального введения микробное масло может быть скомбинировано с фармацевтически приемлемыми носителями, хорошо известными в этой области техники. Такие носители позволяют применять микробные масла изобретения в составе таблеток, пилюль, драже, капсул, жидкостей, гелей, сиропов, кашич, суспензий и т.п., для перорального потребления нуждающимся в лечении субъектом. В некоторых воплощениях лекарственная форма представляет собой таблетку, пилюлю или таблетку в форме пилюли. Фармацевтические препараты для перорального применения могут быть получены добавлением твердого наполнителя, необязательно, перетиранием полученной смеси и обработкой смеси гранул, если

желательно, после добавления подходящих вспомогательных средств, для получения таблеток или ядер драже. Подходящие наполнители включают, без ограничений, такие наполнители как сахара, включая, без ограничений, лактозу, сахарозу, маннитол и сорбитол; препараты на основе целлюлозы, такие как, без ограничений, кукурузный крахмал, пшеничный крахмал, рисовый крахмал, картофельный крахмал, желатин, трагакантовую камедь, метилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, натрия карбоксиметилцеллюлозу и поливинилпирролидон (PVP). Если желательно, то могут быть добавлены дезинтегрирующие средства, такие как, без ограничений, поперечно-сшитый поливинилпирролидон, агар или альгиновая кислота или ее соль, такая как натрия альгинат. Фармацевтические препараты, которые могут быть применены перорально, включают, без ограничений, твердые капсулы из двух частей, изготовленные из желатина, а также мягкие, запечатываемые капсулы, изготовленные из желатина и пластификатора, такого как глицерин или сорбитол. В некоторых воплощениях лекарственная форма представляет собой лекарственную форму для вегетарианцев, в этом случае лекарственная форма не образуют из каких-либо компонентов из животного источника, и она их не содержит. В некоторых воплощениях лекарственная форма для вегетарианцев представляет собой капсулу для вегетарианцев.

В некоторых воплощениях композиция представляет собой косметическое средство. Косметические средства включают, без ограничений, эмульсии, кремы, лосьоны, маски, мыла, шампуни, очищающие средства, кремы для лица, кондиционеры, макияж, средства для ванной и жидкости для диспергирования. Косметические средства могут представлять собой лекарственные или не лекарственные средства.

В некоторых воплощениях композиция представляет собой промышленную композицию. В некоторых воплощениях композиция представляет собой исходный материал для одного или нескольких промышленных изделий. Промышленное изделие включает без ограничений полимер; светочувствительный материал для фотографии; детергент; промышленное масло; или промышленный детергент. Например, патент США № 7259006 описывает содержание ДНА-содержащего жира и масла для производства бегеновой кислоты и получения светочувствительных материалов для фотографии, с применением бегеновой кислоты.

Способы применения композиций.

В некоторых воплощениях композиции могут быть применены для лечения состояний у людей или животных, не представляющих собой человека. В некоторых воплощениях композиции могут быть применены для питания людей или животных, не представляющих собой человека.

Термины "лечить" и "лечение" относятся как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или предупредительным мерам, в которых предмет изобретения применяют для предупреждения или замедления (облегчения) нежелательного физиологического состояния, заболевания или нарушения или для получения благоприятных или желаемых клинических результатов. Для целей настоящего изобретения благоприятные или желаемые клинические результаты включают, без ограничений, облегчение или устранение симптомов или признаков, связанных с состоянием, заболеванием или нарушением; уменьшением степени проявления состояния, заболевания или нарушения; стабилизация состояния, заболевания или нарушения, (т.е. когда состояние, заболевание или нарушение не ухудшается); задержку в наступлении или прогрессировании состояния, заболевания или нарушения; улучшение состояния, заболевания или нарушения; ремиссию (как частичную, так и полную, и как обнаруживаемую, так и скрытую) состояния, заболевания или нарушения; или восстановление или улучшение состояния, заболевания или нарушения. Лечение включает достижение клинически значимого ответа без значительно выраженных побочных эффектов. Лечение также включает продление срока жизни по сравнению с ожидаемым сроком жизни при отсутствии лечения.

В некоторых воплощениях композицию применяют для лечения состояния, заболевания или нарушения, такого как угревая сыпь, острые воспаления, возрастная макулопатия, аллергия, болезнь Альцгеймера, артрит, астма, атеросклероз, аутоиммунные заболевания, нарушение в липидах крови, кисты молочной железы, кахексии, рак, сердечный рестеноз, сердечно-сосудистые заболевания, хронические воспаления, ишемическая болезнь сердца, кистозный фиброз, дегенеративное нарушение печени, сахарный диабет, экзема, желудочно-кишечные расстройства, заболевания сердца, высокий уровень триглицеридов, гипертония, гиперактивность, иммунологические заболевания, для ингибирования роста опухоли, воспалительные состояния, кишечные расстройства, дисфункция почек, лейкемия, большое депрессивное расстройство, рассеянный склероз, нейродегенеративные нарушения, остеоартрит, остеопороз, пероксисомальное нарушение, преэклампсия, преждевременные роды, псориаз, легочные нарушения, ревматоидный артрит, риск сердечного заболевания или тромбоза.

В некоторых воплощениях композицию применяют для увеличения продолжительность беременности в третьем триместре.

В некоторых воплощениях композицию применяют для контроля кровяного давления.

В некоторых воплощениях композицию применяют для улучшения или поддержания когнитивной функции.

В некоторых воплощениях композицию применяют для улучшения или поддержания памяти.

Композиция или лекарственная форма могут быть введена в организм субъекта любым подходящим для композиции или лекарственной формы путем. Вещество рассматривают как "введенное", если веще-

ство вводят в организм субъекта с помощью самого субъекта, или если другая персона, механизм или устройство вводит вещество в организм субъекта. "Введение", следовательно, включает, например, самостоятельное введение, введение другими людьми и не прямое введение. Термин "непрерывное" или "последовательное", так как применен в настоящем документе при отсылке к "введению", означает, что частота введения равна по меньшей мере один раз в день. Однако следует заметить, что частота введения может быть более чем один раз в день, и введение при этом будет оставаться "непрерывным" или "последовательным", например, два или даже три раза в день, до тех пор, пока указанный в настоящем документе уровень дозировки не будет превышен. Средства и способы введения известны в этой области техники и специалист в этой области техники может обратиться к различным руководствам по фармакологии. Например, информацию можно получить в руководствах "Modern Pharmaceuticals", Banker & Rhodes, Informa Healthcare, USA, 4th ed. (2002); и "Goodman & Gilman's The Pharmaceutical Basis of Therapeutics", McGraw-Hill Companies, Inc., New York, 10th ed. (2001).

Под терминами "субъект", "индивидуум" или "пациент" понимают любого субъекта, как представляющего собой человека, так и нет, для которого желательной осуществить диагностику, прогнозирование, лечение или введение композиции или лекарственной формы. Субъекты, представляющие собой млекопитающих, включают, без ограничений, людей; домашних животных; сельскохозяйственных животных; животных, содержащихся в зоопарке; спортивных животных; животных-домашних питомцев, таких как собаки, кошки, морские свинки, кролики, крысы, мыши или лошади; приматов, таких как обезьяны (например, капуцины, макаки-резус, африканские зеленые мартышки, мартышки-гусары, яванские макаки и церкопитеки), человекообразные обезьяны, орангутанги, бабуины, гиббоны и шимпанзе; собаки, такие как собаки и волки; кошачьи, такие как кошки, львы и тигры; непарнокопытные, такие как лошади, ослы и зебры; животных, используемых для производства пищевых продуктов, такие как коровы, крупный рогатый скот, свиньи и овцы; копытные, такие как олени и жирафы; или грызуны, такие как мыши, крысы, хомяки и морские свинки; и тому подобные. Термин "субъект" также охватывает животных, применяемых в качестве моделей, например, животных, на которых моделируют заболевания. В некоторых воплощениях термин "субъект" включает ценных животных, имеющих как экономическую ценность, так и какую-либо другую ценность, например важный с экономической точки зрения племенной скот, беговых животных, цирковых животных, животных, представляющих собой семейную ценность, редких животных или животных вымирающих видов; животных-компаньонов. В некоторых воплощениях субъект представляет собой человека. В некоторых воплощениях субъект представляет собой субъекта, не относящегося к человеку.

Композиция может быть введена в виде "питательного количества", "терапевтически эффективного количества", "профилактически эффективного количества", "терапевтической дозы" или "профилактической дозы". Термин "питательное количество" относится к количеству, эффективному, в необходимых дозах и в течение необходимого времени, для достижения желаемых результатов в отношении получения питательных веществ. Результат в отношении получения питательных веществ, например, может представлять собой увеличение уровней желательного жирнокислотного компонента у субъекта. Термин "терапевтически эффективное количество" или "терапевтическая доза" относится к количеству, эффективному в необходимых дозах и в течение необходимого времени для достижения желаемого терапевтического результата. Терапевтический результат, например, может представлять собой ослабление симптомов, продление срока жизни, улучшение подвижности и т.п. Терапевтический результат не обязательно должен представлять собой "выздоровление". "Профилактически эффективное количество" или "профилактическая доза" относятся к количеству, эффективному в необходимых дозах и в течение необходимого времени для достижения желаемого терапевтического результата. Как правило, поскольку профилактическую дозу вводят субъекту перед заболеванием или на ранней стадии заболевания, профилактически эффективное количество будет меньше, чем терапевтически эффективное количество, необходимое для лечения поздней стадии заболевания.

Субъекту может быть введена композиция, лекарственная форма или фармацевтическая композиция в различных дозировках, основываясь на количестве EPA или другого жирнокислотного компонента микроорганизма, биомассы или микробного масла, которое следует ввести субъекту. Термины "суточная доза", "уровень суточной дозы" и "количество суточной дозы" в настоящем документе относятся к общему количеству EPA или другого жирнокислотного компонента, вводимого за одни сутки (за 24-часовой период). Таким образом, например, введение EPA субъекту в суточной дозе, равной 2 мг означает, что субъект получает суммарно 2 мг EPA на ежедневной основе, независимо от того вводят ли EPA в виде единичной лекарственной формы, включающей 2 мг EPA, или альтернативно, в виде четырех лекарственных форм, включающих по 0,5 мг EPA каждая (в общей сложности 2 мг EPA). В некоторых воплощениях суточное количество EPA вводят в виде единичной лекарственной формы или в виде двух лекарственных форм. Лекарственные формы настоящего изобретения можно принимать за единственный прием или за несколько приемов. Например, если принимают четыре таблетки в день, каждая из которых содержит 0,5 мг EPA, то все четыре таблетки можно принимать один раз в сутки, или 2 таблетки можно принимать два раза в сутки, или по 1 таблетке можно принимать каждые 6 ч. В некоторых воплощениях суточная доза равна от примерно 100 мг до примерно 15 г EPA. В некоторых воплощениях суточная доза

равна от 0,5 мг до примерно 250 мг, от примерно 100 мг до примерно 250 мг, от примерно 100 мг до примерно 500 мг, от примерно 100 мг до примерно 1 г, от примерно 1 г до примерно 2,5 г, от примерно 1 г до примерно 5 г, от примерно 1 г до примерно 10 г, от примерно 1 г до примерно 15 г, от примерно 5 г до примерно 10 г, от примерно 5 г до примерно 15 г, от примерно 10 г до примерно 15 г, от примерно 100 мг до примерно 10 г, от примерно 100 мг до примерно 5 г или от примерно 100 мг до примерно 2,5 г EPA, ДНА или их комбинации. В некоторых воплощениях композиция представляет собой лекарственную форму, которая включает от примерно 0,5 мг до примерно 250 мг, от 100 мг до примерно 250 мг, от примерно 0,5 мг до примерно 500 мг, от примерно 100 мг до примерно 500 мг, от примерно 0,5 мг до примерно 1 г или от примерно 100 мг до примерно 1 г EPA, ДНА или их комбинации на лекарственную форму.

Введение композиций или лекарственных форм настоящего изобретения может быть достигнуто с помощью различные курсы введения. Например, в некоторых воплощениях введение осуществляют ежедневно в течение нескольких последовательных дней, или альтернативно, выполняют каждый второй день (через день). Введение можно осуществлять в течение одного или нескольких дней.

Введение композиций и лекарственных форм может быть скомбинировано с другими режимами, применяемыми для лечения состояния. Например, способ настоящего изобретения может быть скомбинирован с диетическими режимами (например, диеты с низким содержанием углеводов, диеты с высоким содержанием белков, диеты с высоким содержанием волокон и т.п.), режимы с физической нагрузкой, режимы для потери веса, режимы для прекращения курения или их комбинации. Способ настоящего изобретения также может быть применен в комбинации с другими фармацевтическими продуктами при лечении состояния. Композиции или лекарственные формы настоящего изобретения могут быть введены до или после других режимов или фармацевтических продуктов.

Наборы, включающие композиции.

Изобретение направлено на наборы или упаковки, содержащие одну или несколько единиц композиции изобретения. Наборы или упаковки могут включать единицу продукта питания, фармацевтической композиции, косметической или промышленной композиции, включающей микроорганизм, биомассу или микробное масло изобретения или их комбинации. Наборы или упаковки также могут включать добавку, включающую микроорганизм, биомассу или микробное масло изобретения или их комбинации, для получения продукта питания, косметической, фармацевтической композиции или промышленной композиции.

В некоторых воплощениях набор или упаковка содержит одну или несколько единиц фармацевтической композиции для введения в соответствии со способами настоящего изобретения. Набор или упаковка может содержать одну стандартную дозу или более чем одну стандартную дозу (т.е. множество стандартных доз). Если данное множество стандартных доз находится в наборе или в упаковке, множество стандартных доз может быть необязательно организовано для последовательного введения.

Наборы настоящего изобретения могут необязательно содержать инструкции, связанные с единицей или лекарственными формами наборов. Такие инструкции могут быть представлены в форме, установленной государственным органом, регулирующим производство, применение или продажу фармацевтических продуктов, такое уведомление отражает то, что орган одобрил производство, применение или продажу с целью введения людям для лечения состояния или нарушения. Инструкции могут быть в любой форме, которая передает информацию о применении единицы или лекарственных форм в наборе в соответствии со способами изобретения. Например, инструкции могут быть представлены в форме печатных материалов или в форме предварительной записи на устройстве для хранения данных.

В курсе обследования пациента медицинский работник может установить, что применение одного из способов настоящего изобретения подходит пациенту, или врач может установить, что состояние пациента может быть улучшено применением одного из способов настоящего изобретения. Перед назначением любого курса лечения врач может обсудить с пациентом, например, различные риски и пользу, связанные с курсом лечения. Пациента могут обеспечить полной информацией обо всех известных и предполагаемых рисках, связанных с курсом лечения. Такое консультирование может быть обеспечено в устной форме, а также в письменной форме. В некоторых воплощениях врач может обеспечить пациента справочной литературой касательно курса лечения, такой как информация о продукте, образовательные материалы и т.п.

Настоящее изобретение направлено на способы просвещения потребителей о способах лечения, способах, включающих распространение лекарственных форм вместе с информацией для потребителя в местах продажи. В некоторых воплощениях распространение должно иметь место в местах продажи, в которых присутствует фармацевт или медицинский работник.

Термин "информация для потребителя" может включать без ограничений текст на английском языке, текст на языке, не представляющим собой английский язык, зрительный образ, диаграмму, запись для воспроизведения по телефону, веб-сайт и возможность контакта с живыми представителями службы поддержки клиентов. В некоторых воплощениях информация для потребителя должна обеспечивать указания по применению лекарственных форм в соответствии со способами настоящего изобретения, надлежащий возраст пользователя, показания, противопоказания, соответствующих дозировки, предупреждения, номер телефона или адрес веб-сайта. В некоторых воплощениях способ дополнительно включает

обеспечение профессиональной информацией соответствующих лиц, которые в состоянии ответить на вопросы потребителя в отношении применения раскрытых курсов лечения в соответствии со способами настоящего изобретения. Термин "профессиональная информация" включает, без ограничений, информацию, относящуюся к курсу лечения, который применяют в соответствии со способами настоящего изобретения, которая предназначена для того, чтобы медицинский работник был в состоянии ответить на вопросы потребителя. Термин "медицинский работник" включает, например, врача, фельдшера, сиделку, медицинскую сестру, фармацевта и представителя службы поддержки клиентов.

По завершению полного описания изобретения дополнительное понимание может быть получено путем отсылки к примерам, представленным в настоящем документе. Данные примеры приведены только с целью иллюстрации и не предназначены для ограничения.

Пример 1.

В данном примере, *Schizochytrium* sp. культивировали в 250-миллилитровых встряхиваемых колбах Эрленмейера, содержащих 50 мл культуральной среды. Инокулят получали в той же среде, состоявшей из 0,625 г NaCl, 1,0 г KCl, 5 г $\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,29 г $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,0 г моноглутамата натрия моногидрата, 1,0 г дрожжевого экстракта и 23,8 г HEPES-буфера, растворенного приблизительно в 900 мл дистиллированной воды. pH среды доводили до 7 с помощью NaOH. Конечный объем среды доводили до 896 мл и среду стерилизовали автоклавированием. После автоклавирования к среде стерильно добавляли следующие компоненты: 0,89 мл 56,5 г/л KH_2PO_4 , 100 мл 500 г/л глюкозы, 2 мл стокового раствора микроэлементов и 1 мл стокового раствора витаминов. Стоковый раствор микроэлементов содержал следующее: 90 г лимонной кислоты, 5,15 г $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,55 г $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,965 г $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,02 г $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,02 г $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,035 г $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1,035 г $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Эти элементы были растворены в одном литре дистиллированной воды, pH смеси был доведен до 2,5 с помощью HCl. Стоковый раствор витаминов содержал следующее: 0,16 г витамина B12, 9,75 г тиамин и 3,33 г пантотената кальция, растворенных в одном литре дистиллированной воды. Во встряхиваемые колбы вносили по 1 мл инокулята. Колбы (три) помещали в инкубатор с CO_2 , установленный на поддержание атмосферы с 5, 10 или 15% CO_2 в воздухе. Другую серию колб (из трех экземпляров) помещали в инкубатор с уровнем CO_2 , равным его уровню в окружающей среде. Все серии колб помещали в качалку, выставленную на 200 об/мин, и все инкубаторы были установлены на 22,5°C. Через семь дней роста во встряхиваемых колбах собирали биомассу с помощью центрифугирования, которую затем подвергали сублимационной сушке и применяя стандартные процедуры метилэтерификации определяли профиль жирных кислот в биомассе. Повышенные уровни CO_2 вызывали значительные изменения % жира и профиля жирных кислот в биомассе. Особо выраженным оказалось изменение, полученное в величинах %EPA и %DHA при сравнении условий с повышенным CO_2 и CO_2 как в окружающей среде. Кроме того, изменения в данных жирных кислотах стало еще более выраженным при увеличении уровня CO_2 . Результаты представлены в табл. 4.

Таблица 4

Образец	Биомасса (г/л)	% 16:0	% EPA	% DHA	% Жира
Окружающие условия (1)	3,43	33,55	4,24	54,15	54,55
Окружающие условия (2)	3,35	33,29	4,30	54,42	52,67
Окружающие условия (3)	3,27	33,29	4,29	54,38	50,62
15% CO_2 (1)	2,96	28,41	26,12	29,52	53,31
15% CO_2 (2)	2,94	28,13	26,20	29,98	55,46
15% CO_2 (3)	2,80	28,12	26,61	29,46	53,20
Окружающие условия (1)	3,89	32,54	3,95	52,31	60,21
Окружающие условия (2)	3,85	34,74	4,00	53,06	58,33
Окружающие условия (3)	3,91	34,76	4,04	52,95	58,18
15% CO_2 (1)	4,91	33,35	12,94	41,13	69,98
15% CO_2 (2)	5,03	33,28	12,99	41,15	69,58
15% CO_2 (3)	4,95	33,46	12,84	41,02	69,08
Окружающие условия (1)	3,51	29,95	3,00	45,06	58,48
Окружающие условия (2)	3,69	30,57	2,97	44,92	54,87
Окружающие условия (3)	3,43	29,98	3,13	45,20	53,29
15% CO_2 (1)	4,18	32,03	5,59	40,55	42,89
15% CO_2 (2)	4,16	31,87	5,85	40,36	43,47
15% CO_2 (3)	4,14	31,58	6,13	40,43	44,13

Пример 2.

В данном примере *Schizochytrium* sp. культивировали в 250-миллилитровых встряхиваемых колбах Эрленмейера, содержащих 50 мл культуральной среды. Инокулят получали в той же среде, состоявшей из 0,625 г NaCl, 1,0 г KCl, 5 г SO₄·7H₂O, 0,1 г (NH₄)₂SO₄, 0,29 г CaCl₂·2H₂O, 1,0 г мононатрия глутамата моногидрата, 1,0 г дрожжевого экстракта и 23,8 г HEPES-буфера, растворенных приблизительно в 900 мл дистиллированной воды. pH среды доводили до 7 с помощью NaOH. Конечный объем среды доводили до 896 мл и среду стерилизовали автоклавированием. После автоклавирования к среде в стерильных условиях добавляли следующие компоненты: 0,89 мл 56,5 г/л KН₂РO₄, 100 мл 500 г/л глюкозы, 2 мл стокового раствора микроэлементов и 1 мл стокового раствора витаминов. Стоковый раствор микроэлементов содержал следующее: 90 г лимонной кислоты, 5,15 г FeSO₄·7H₂O, 1,55 г MnCl₂·4H₂O, 0,965 г ZnSO₄·7H₂O, 0,02 г CoCl₂·6H₂O, 0,02 г Na₂MoO₄·2H₂O, 1,035 г CuSO₄·5H₂O, 1,035 г NiSO₄·6H₂O. Эти элементы были растворены в одном литре дистиллированной воды, и pH смеси был доведен до 2,5 добавлением HCl. Стоковый раствор витаминов содержал следующее: 0,16 г витамина B12, 9,75 г тиамин и 3,33 г пантотената кальция, растворенных в одном литре дистиллированной воды. Во встряхиваемые колбы вносили по 1 мл инокулята. Колбы (две) помещали в CO₂-инкубатор, установленный на поддержание атмосферы с 5, 10 или 15% CO₂ в воздухе. Другую серию колб (из двух экземпляров) помещали в инкубатор с уровнем CO₂, равным его уровню в окружающей среде. Все серии колб качали при 200 об/мин, и все инкубаторы были установлены на 22,5°C. После семи дней роста во встряхиваемых колбах с помощью центрифугирования собирали биомассу, затем ее, подвергали сублимационной сушке и определяли профиль жирных кислот в биомассе, применяя стандартные процедуры метилэтерификации. Повышенные уровни CO₂ вызывали значительные изменения в % жира и профиле жирных кислот в биомассе. Особо заметным было изменение, полученное в величинах %EPA и %DHA между условиями с повышенным CO₂ и CO₂ как в окружающей среде. Кроме того, изменения в данных жирных кислотах стало более выраженным при увеличении уровня CO₂. Результаты представлены в приведенной ниже табл. 5.

Таблица 5

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

Пример 3.

В данном примере *Thraustochytrium* sp. культивировали в 250-миллилитровых встряхиваемых колбах Эрленмейера, содержащих 50 мл культуральной среды. Инокулят получали в той же среде, состоявшей из 42 г Na₂SO₄, 0,625 г NaCl, 1,0 г KCl, 5 г SO₄·7H₂O, 0,1 г (NH₄)₂SO₄, 0,29 г CaCl₂·2H₂O, 1,0 г мононатрия глутамата моногидрата, 1,0 г дрожжевого экстракта и 23,8 г HEPES-буфера, растворенных приблизительно в 900 мл дистиллированной воды. pH среды доводили до 7 с помощью NaOH. Конечный объем среды доводили до 961 мл и среду стерилизовали автоклавированием. После автоклавирования к среде стерильно добавляли следующие компоненты: 0,89 мл 56,5 г/л KН₂РO₄, 35 мл 500 г/л глицерина, 2 мл стокового раствора микроэлементов и 1 мл стокового раствора витаминов. Стоковый раствор микроэлементов содержал следующее: 9 г лимонной кислоты, 5,15 г FeSO₄·7H₂O, 1,55 г MnCl₂·4H₂O, 0,965 г ZnSO₄·7H₂O, 0,02 г CoCl₂·6H₂O, 0,02 г Na₂MoO₄·2H₂O, 1,035 г CuSO₄·5H₂O, 1,035 г NiSO₄·6H₂O. Эти элементы были растворены в одном литре дистиллированной воды и pH смеси был доведен до 2,5 добавлением HCl. Стоковый раствор витаминов содержал следующее: 0,16 г витамина B12, 9,75 г тиамин и 3,33 г пантотената кальция, растворенных в одном литре дистиллированной воды. Во встряхиваемые колбы вносили по 1 мл инокулята. Колбы (три) помещали в CO₂ инкубатор, установленный на поддержание атмосферы с 15% CO₂ в воздухе. Другую серию колб (из трех экземпляров) помещали в инкубатор с уровнем CO₂, равным его уровню в окружающей среде. Обе серии колб встряхивали при 200 об/мин и оба инкубатора были установлены на 22,5°C. После семи дней роста во встряхиваемых колбах с помощью центрифугирования собирали биомассу, которую затем подвергали сублимационной сушке и определяли профиль жирных кислот в биомассе, применяя стандартные процедуры метилэтерификации. Рост в атмосфере с 15% CO₂ в воздухе приводил к существенным изменениям в культуре *Thraustochytrium*. При высоком CO₂ биомасса и % жира были ниже, чем при CO₂ как в окружающей атмосфере. %16:0 и %DHA были ниже и %EPA был значительно выше, чем при CO₂ как в окружающей атмосфере. Результаты представлены в приведенной ниже табл. 6.

Таблица 6

Атмосфера	Биомасса (г/л)	% 16:0	% EPA	% DHA	% жира
Окружающие условия (1)	3,39	31,74	11,61	44,65	53,32
Окружающие условия (2)	3,42	30,88	11,95	44,99	53,30
Окружающие условия (3)	3,39	32,13	11,46	44,19	53,93
15% CO ₂ (1)	2,23	22,12	36,94	19,04	38,73
15% CO ₂ (2)	2,05	21,40	37,14	18,57	39,34
15% CO ₂ (3)	2,11	21,68	36,83	18,52	40,86

Пример 4.

В данном примере [NBx0614et10], *Schizochytrium* sp. (ATCC PTA-10208) культивировали в четырех 100-литровых ферментаторах модели "BioFlo 6000" компании "New Brunswick Scientific" в конечном (составе) объеме, равном 80 л, в способе с подпиткой углеродом (глюкоза) и азотом (гидроксид аммония) в условиях различного избыточного давления для оценки чувствительности культуры к увеличению растворенного углекислого газа. Для каждой ферментации использовали по 8 л культуры в качестве инокулята. Для размножения инокулята применяли 80-литровый ферментатор модели "BioFlo 6000" компании "New Brunswick Scientific". Среда для роста инокулята состояла из серии сред по 65 л, разделенных на шесть отдельных групп. Группа 1 содержала из 585 г MSG·H₂O, 65 г KCl, 325 г SO₄·7H₂O, 24,05 г (NH₄)₂SO₄, 40,625 г NaCl, 390 г T154 (дрожжевого экстракта) и 13 мл Dow 1520US (противовспенивающего средства). Среду группы 1 подвергали периодической стерилизации при 121 градусе в ферментаторе для инокулята в объеме, равном приблизительно 60 л. Группа 2 содержала 18,85 г CaCl₂·2H₂O. Группа 3 содержала 33,8 г KH₂PO₄. Каждую их сред групп 2 и 3 автоклавировали в виде отдельных растворов в течение приблизительно 45-60 мин и асептически добавляли к среде группы 1 после стерилизации. Группа 4 содержала 201,5 мг MnCl₂·4H₂O, 201,5 мг ZnSO₄·7H₂O, 2,6 мг CoCl₂·6H₂O, 2,6 мг Na₂MoO₄·2H₂O, 134,6 мг CuSO₄·5H₂O, 134,6 мг NiSO₄·6H₂O, 669,4 мг FeSO₄·7H₂O и 1,522 г лимонной кислоты. Среду группы 4 автоклавировали тем же способом как группы 2 и 3. Группа 5 содержала 633,75 мг тиамин-НCl, 10,4 мг витамина B12 и 216,5 мг полукальциевой соли пантотеновой кислоты, которые растворяли в RO-воде и затем стерилизовали фильтрованием. Группа 6 содержала 3250 г глюкозы, растворенной в RO-воде в объеме, равном 3000 мл. После охлаждения ферментатора для инокулята до 22,5°C, среды групп 2, 3, 4, 5 и 6 вносили в ферментатор. Перед инокуляцией pH в ферментаторе доводили до 7 с помощью гидроксида натрия и серной кислоты, и уровень растворенного кислорода доводили до 100%. В ферментатор для инокулята вносили 1300 мл ферментационной культуры меньшего объема (ферментационную культуру меньшего объема получали и культивировали таким же способом как культуру инокулята в 65-литровых ферментаторах) и культивировали при 22,5°C, pH 7, перемешивании при 180 об/мин и 32,5 л/мин воздуха в течение 37 ч, в этот момент 8 л бульона инокулята переносили в каждый из 100-литровых ферментаторов. Каждый из 100-литровых ферментаторов содержал 80 л среды для ферментации. Среду для ферментации получали таким же способом как среду ферментатора для инокулята. Для каждого из 100-литровых ферментаторов среда для ферментации состояла из серии сред, разделенных на 6 групп. Для сосудов NB5, NB6 и NB7, использовалась группа 1 содержащая 704 г Na₂SO₄, 50 г NaCl, 80 г KCl, 400 г SO₄·7H₂O, 33,6 г (NH₄)₂SO₄, 80 г T154 дрожжевого экстракта и 8 мл противовспенивающего средства Dow 1520-US. Среду группы 1 стерилизовали паром при 122°C в течение 60 мин в 100-литровых ферментаторах в объеме, равном приблизительно 35 л. Группа 2 содержала 23,2 г CaCl₂·2H₂O в объеме, равном приблизительно 300 мл. Группа 3 содержала 141,2 г KH₂PO₄, растворенного в RO-воде. Группа 4 содержала 248 мг MnCl₂·4H₂O, 744 мг ZnSO₄·7H₂O, 3,2 мг Na₂MoO₄·2H₂O, 165,6 мг CuSO₄·5H₂O и 165,6 мг NiSO₄·6H₂O, 824 мг FeSO₄·7H₂O и 80 г лимонной кислоты, все было растворено в RO-воде. Группа 5 содержала 780 мг тиамин-НCl, 266,4 мг полукальциевой соли пантотеновой кислоты и 286,4 мкг биотина, все было растворено и стерилизовано фильтрованием в RO-воде. Группа 6 содержала 2400 г глюкозы приблизительно в 3 л RO-воды. Группы 2, 3, 4, 5 и 6 объединяли и добавляли к ферментатору после того, как ферментатор достигал рабочей температуры, равной 22,5°C. Для сосуда NB8, все группы были такими же, как в других трех условиях, за исключением лимонной кислоты. В NB8, группа 4 содержала только ~3,75 г лимонной кислоты. Объем в каждом ферментаторе перед инокуляцией был равен приблизительно 52-53 л. В каждый ферментатор вносили по 8 л бульона из описанного выше ферментатора для инокулята. pH ферментации контролировали с помощью 7,3 литров раствора 4н. гидроксида аммония при pH 7 вплоть до истощения азота, с этого момента для контроля pH применяли 4н. гидроксид натрия и 4н. серную кислоту. Растворенный кислород контролировали для поддержания на заданном уровне, равном 20%, в течение всего процесса ферментации с помощью перемешивание в режиме от 180 до 480 об/мин и тока воздуха в режиме от 40 л/мин до 80 л/мин. В каждом из данных сосудов поддерживали разное давление напора (NB5=2, NB6=15 и NB7=20 PSI) для оценки чувствительности организма к увеличению уровня растворенного углекислого газа. В течение всего процесса ферментации, подавали 850 г/л раствор 95% декстрозы (кукурузный сироп) для поддержания концентрации глюкозы на уровне менее чем 50 г/л. Через 8 дней сухая масса клеток и титр омега-3 в каждом из 80-литровых ферментаторов были следующими: NB5 - 110,1 г/л DCW и 44,37 г/л омега-3; NB6 - 117,7 г/л

DCW и 45,78 г/л омега-3; NB7 - 114,1 г/л DCW и 48,43 г/л омега-3; NB8 - 119,5 г/л DCW и 43,55 г/л омега-3. При увеличении давления %DHA/FAME снижалось, %EPA/FAME возрастало и отношение DHA к EPA снижалось. При сравнении конечного содержания жирной кислоты при изменении давления от 2 psi до 20 фунт/кв. дюйм, %DHA/FAME снижалось от 50,48 до 41,26%, а %EPA/FAME возрастало от 18,95 до 23,28%. Результаты представлены в табл. 7.

Таблица 7

% EPA/FAME				
часы	NB5 (2 фунта/кв. дюйм)	NB6 (15 фунтов/кв. дюйм)	NB7 (20 фунтов/кв. дюйм)	NB8 (20 фунтов/кв. дюйм)
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	25,52
139,0	21,24	24,57	25,85	25,25
161,5	19,95	20,42	27,78	24,96
185,5	18,95	18,89	23,28	23,90

% DHA/FAME				
часы	NB5 (2 фунта/кв. дюйм)	NB6 (15 фунтов/кв. дюйм)	NB7 (20 фунтов/кв. дюйм)	NB8 (20 фунтов/кв. дюйм)
17,5	48,66	52,94	52,56	49,15
41,5	52,62	52,38	52,98	43,43
65,5	45,69	41,45	44,05	35,17
89,5	40,35	39,22	34,81	31,87
116,5	42,26	39,77	34,14	32,43
139,0	45,70	41,93	34,92	33,31
161,5	48,55	44,96	38,09	35,65
185,5	50,48	47,52	41,26	38,38

отношение DHA:EPA				
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

Пример 5.

В данном примере [Nx0719et10], *Schizochytrium* sp. (ATCC PTA-10208) культивировали в четырех 14-литровых ферментаторах модели "BioFlo 310" компании "Scientific New Brunswick" в конечном (составе) объеме, равном 10 л, в способе с подпиткой углеродом (глюкоза) и азотом (гидроксид аммония). В три из четырех ферментаторов дополнительно вводили оксид углерода в разные моменты времени в процессе ферментации для оценки чувствительности культуры к увеличению растворенного углекислого газа. В NBS1, NBS2 и NBS3 дополнительно вводили оксид углерода, на 12, 24 и 48 ч с начала культивирования соответственно. Для каждой ферментации использовали по 1 л культуры в качестве инокулята. Для размножения инокулята применяли 14-литровый ферментатор "Virtis". Среда для роста инокулята состояла из 10 литровых сред, разделенных на четыре отдельные группы. Группа 1 содержала 90 г MSG·1H₂O, 10 г KCl, 50 г SO₄·7H₂O, 3,3 г (NH₄)₂SO₄, 6,25 г NaCl, 60 г T154 (дрожжевого экстракта), 4,97 г KH₂PO₄, 2,9 г CaCl₂·2H₂O и 2 мл Dow 1520US (противовспенивающего средства). Среду группы 1 автоклавировали при 121 градусе в течение 120 мин в объеме, равном приблизительно 9,8 л. Группа 2 содержала 500 г глюкозы, растворенной в объеме, равном 800 мл RO-воды. Группа 3 содержала 31 мг MnCl₂·4H₂O, 31 мг ZnSO₄·7H₂O, 0,4 мг CoCl₂·6H₂O, 0,4 мг Na₂MoO₄·2H₂O, 20,7 мг CuSO₄·5H₂O, 20,7 мг NiSO₄·6H₂O, 103 мг FeSO₄·7H₂O и 234,1 мг лимонной кислоты. Каждую из сред групп 2 и 3 автоклавировали 60 мин. Группа 4 содержала 97,5 мг тиамин-НCl, 1,6 мг витамина B12 и 33,3 мг полукальциевой соли пантотеновой кислоты, которые растворяли в RO-воде и затем стерилизовали фильтрованием. После охлаждения ферментатора до 22,5°C, в него вносили группы 2, 3, 4 и 5. С помощью гидроксида натрия и серной кислоты pH в ферментаторе доводили до 7 и уровень растворенного кислорода доводили до 100% перед инокуляцией. В ферментатор для инокулята вносили 150 мл ферментационной культуры меньшего объема (ферментационную культуру меньшего объема получали и культивировали таким же способом как 10-литровые культуры инокулята) и культивировали при 22,5°C, pH 7, перемешивание при 433 об/мин и 5 л/мин воздуха в течение 44,5 ч, после этого 1 л бульона инокулята переносили в каждый из 14-литровых ферментаторов. Каждый из 14-литровых ферментаторов содержал по 10 л среды для

ферментации. Среду для ферментации получали таким же способом, как среду для ферментатора для инокулята. Для каждого из 14-литровых ферментатора, среда для ферментации состояла из серии сред, разделенных на 6 групп. Для всех сосудов группа 1 содержала 60 г Na_2SO_4 , 6,25 г NaCl , 10 г KCl , 50 г $\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,43 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 г T154 дрожжевого экстракта и 1 мл противовспенивающего средства Dow 1520-US. Среду группы 1 автоклавировали при 121°C в течение 120 мин в 14-литровых ферментаторах в объеме, равном приблизительно 6,5 л. Группа 2 содержала 2,9 г $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ в RO-воде в объеме, равном приблизительно 20 мл. Группа 3 содержала 17,61 г KH_2PO_4 , растворенного в 100 мл RO-воды. Группа 4 содержала 31 мг $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 93 мг $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,4 мг $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 20,7 мг $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 20,7 мг $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 103 мг $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ и 10 г лимонной кислоты, все растворено в 50 мл RO-воды. Группа 5 содержала 97,5 мг тиамин- HCl , 33,3 мг полу кальциевой соли пантотеновой кислоты и 36,3 мкг биотина, все было растворено и стерилизовано фильтрованием в 10 мл RO-воды. Группа 6 содержала 300 г глюкозы приблизительно в 0,5 л RO-воды. Группы 2, 3, 4, 5 и 6 объединяли и добавляли к ферментатору после того, как ферментатор достигал рабочей температуры, равной $22,5^\circ\text{C}$. Объем в каждом ферментаторе перед инокуляцией был равен приблизительно 6,5 л. В каждый ферментатор вносили по 1 л бульона из описанного выше ферментатора для инокулята. pH ферментации контролировали, применяя 0,85 л раствора 4н. гидроксид аммония при pH 7 вплоть до истощения азота, после этого применяли 4н. гидроксид натрия и 3н. серную кислоту для поддержания pH при заданном значении, равном 7,5. Растворенный кислород поддерживали на заданном уровне, равном 20%, в течение всего процесса ферментации с помощью перемешивания в режиме от 357 до 833 об/мин и тока воздуха в режиме от 7 л/мин до 7 л/мин. В каждый из сосудов NBS1, NBS2, NBS3 дополнительно вводили оксид углерода в разные временные интервалы для оценки чувствительности организма к увеличению уровня растворенного углекислого газа. В течение всего процесса ферментации, 850 г/л раствора 95% декстрозы (кукурузный сироп) подавали для поддержания концентрации глюкозы на уровне менее чем 50 г/л. Через 8 дней сухая масса клеток и титр омега-3 в каждом из 10-литровых ферментаторов изменились в зависимости от условий дополнительного введения оксида углерода. К 183 ч эти параметры были равны, в NBS1 - 109,1 г/л DCW и 45,87 г/л омега-3; в NBS2 - 108,9 г/л DCW и 45,41 г/л омега-3; в NBS3 - 116,4 г/л DCW и 50,6 г/л омега-3; NBS4 - 95,7 г/л DCW и 40,36 г/л омега-3. Вскоре после того как было инициировано введение оксида углерода, %EPA/FAME снижалось, %DHA/FAME возрастало и отношение DHA к EPA снижалось. При сравнении максимального %EPA/FAME в условиях с дополнительной подачей оксида углерода и в условиях, в которых содержание оксида углерода было как в окружающей среде, наблюдали 65% увеличение в максимальном содержании EPA в условиях с дополнительным введением CO_2 . Результаты представлены в табл. 8.

Таблица 8

EPA/FAME				
часы	NBS1 (+CO ₂ @ 12 часов)	NBS2 (+CO ₂ @ 24 часа)	NBS3 (+CO ₂ @ 48 часов)	NBS4 (без добавленного CO ₂)
15	12,29	10,67	10,22	10,14
39	22,82	19,32	10,37	9,85
63	23,79	24,58	19,77	15,09
87	23,69	23,71	23,85	14,09
114	27,85	27,55	26,91	16,98
137	29,47	27,94	26,76	17,81
159	29,13	27,20	26,52	17,81
183	27,62	25,50	25,62	17,09
%DHA/FAME				
часы	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	25,53	27,47	31,11	46,47
159	28,54	30,59	33,70	48,59
183	31,83	33,70	35,98	50,98
отношение DHA:EPA				
часы	NBS1	NBS2	NBS3	NBS4
15	3,52	4,19	4,53	4,53
39	1,46	2,23	3,81	3,94
63	1,35	1,37	1,83	3,14
87	1,11	1,12	1,17	3,25
114	0,86	0,88	1,04	2,60
137	0,86	0,98	1,16	2,61
159	0,98	1,12	1,27	2,73
183	1,15	1,32	1,40	2,98

[углекислый газ - добавление в течение выделенных временных интервалов].

Пример 6.

В данном примере [Nx0106et10], *Schizochytrium* sp. (ATCC PTA-10208) культивировали в четырех 14-литровых ферментаторах модели "BioFlo 310" компании "Scientific New Brunswick" в конечном (составе) объеме, равном 10 л в способе с подпиткой углеродом (глюкоза) и азотом (гидроксид аммония). Температуру контролировали в течение всего цикла процесса ферментации для поддержания заданной температуры 21,0, 22,5, 24,0 и 25,5°C для NBS1, NBS2, NBS3 и NBS4 соответственно. Для каждой ферментации использовали по 1 л культуры в качестве инокулята. Для размножения инокулята применяли 14-литровые ферментаторы "Virtis". Среда для роста инокулята состояла из 10-литровых сред, разделенных на четыре отдельные группы. Группа 1 содержала 90 г MSG·1H₂O, 10 г KCl, 50 г SO₄·7H₂O, 3,7 г (NH₄)₂SO₄, 6,25 г NaCl, 60 г T154 (дрожжевого экстракта), 5,2 г KH₂PO₄, 2,9 г CaCl₂·2H₂O и 2 мл Dow 1520US (противовспенивающего средства). Среду группы 1 автоклавировали при 121 градусе в течение 120 мин в объеме, равном приблизительно 9,8 л. Группа 2 содержала 500 г глюкозы, растворенной в RO-воде в объеме, равном 800 мл. Группа 3 содержала 31 мг MnCl₂·4H₂O, 31 мг ZnSO₄·7H₂O, 0,4 мг CoCl₂·6H₂O, 0,4 мг Na₂MoO₄·2H₂O, 20,7 мг CuSO₄·5H₂O, 20,7 мг NiSO₄·6H₂O, 103 мг FeSO₄·7H₂O и 234,1 мг лимонной кислоты. Каждую из сред групп 2 и 3 автоклавировали в течение 60 мин. Группа 4 содержала 97,5 мг тиамин-НCl, 1,6 мг витамина B12 и 33,3 мг полукальциевой соли пантотеновой кислоты, которые растворяли в RO-воде и затем стерилизовали фильтрованием. После охлаждения ферментатора до 22,5°C к ферментатору добавляли среды групп 2, 3, 4 и 5. С помощью гидроксида натрия и серной кислоты pH в ферментаторе доводили до 7 и уровень растворенного кислорода доводили до 100% перед инокуляцией. В ферментатор для инокулята вносили 200 мл ферментационной культуры меньшего объема (ферментационную культуру меньшего объема получали и культивировали таким же способом, как 10-литровые культуры инокулята) и культивировали при 22,5°C, pH 7, при перемешивании при 433 об/мин и 5 л/мин воздуха в течение 42 ч, после этого 1 л бульона инокулята переносили в каждый из 14-литровых ферментатор. Каждый из 14-литровых ферментаторов содержал по 10 л среды для ферментации. Среду для ферментации получали таким же способом как среду для ферментатора для инокулята. Для каждого из 14-литровых ферментаторов среда для ферментации состояла из серии сред, разделенных на 4 группы. Для всех сосудов группа 1 содержала 88 г Na₂SO₄, 6,25 г NaCl, 10 г KCl, 50 г SO₄·7H₂O, 4,2 г (NH₄)₂SO₄, 2,9 г CaCl₂·2H₂O, 17,65 г KH₂PO₄, 10 г T154 дрожжевого экстракта и 1 мл противовспенивающего средства Dow 1520-US. Среду группы 1 автоклавировали при 121°C в течение 120 мин в 14-литровых ферментаторах в объеме, равном приблизительно 7,0 л. Группа 2 содержала 31 мг MnCl₂·4H₂O, 93 мг ZnSO₄·7H₂O, 0,4 мг Na₂MoO₄·2H₂O, 20,7 мг CuSO₄·5H₂O, 20,7 мг NiSO₄·6H₂O, 103 мг FeSO₄·7H₂O и 468 мг лимонной кислоты, растворенной в 50 мл RO-воды. Среду группы 2 автоклавировали в течение 60 мин. Группа 3 содержала 97,5 мг тиамин-НCl, 33,3 мг полукальциевой соли пантотеновой кислоты и 35,8 мг биотина, все было растворено и стерилизовано фильтрованием в 10 мл RO-воде. Группа 4 содержала 300 г глюкозы приблизительно в 0,5 л RO-воды и ее автоклавировали в течение 60 мин. Группы 2, 3 и 4 объединяли и добавляли к ферментатору после того, как ферментатор достигал рабочей температуры, равной 22,5°C. Объем каждого ферментатора перед инокуляцией был равен приблизительно 6,5 л. В каждый ферментатор вносили по 1 л бульона из описанного выше ферментатора инокулята. pH ферментации контролировали при 7,0 в течение всего процесса ферментации, применяя 0,85 л раствора 4н. гидроксида аммония вплоть до истощения азота, после этого для поддержания pH на заданном уровне применяли 4н. гидроксид натрия и 3н. серную кислоту. Растворенный кислород контролировали для поддержания на заданном уровне, равном 20%, вплоть до истощения азота. После истощения азота растворенный кислород контролировали для поддержания заданных 10% до окончания ферментации с помощью перемешивание в режиме от 357 до 714 об/мин и тока воздуха, равном 8 л/мин. В течение всего процесса ферментации, подавали 850 г/л раствора 95% декстрозы (кукурузного сиропа) для поддержания концентрации глюкозы на уровне менее чем 50 г/л. Через 8 дней сухая масса клеток или титр омега-3 изменились лишь незначительно при различных повышенных температурах; однако снижение температуры ферментации приводило к повышению %EPA/FAME. К 184 ч, в NBS1 было 85,2 г/л DCW и 29,9 г/л омега-3; в NBS2 - 92,0 г/л DCW и 35,0 г/л омега-3; в NBS3 - 86,8 г/л DCW и 31,7 г/л омега-3; в NBS4 - 84,2 г/л DCW и 29,4 г/л омега-3.

Для NBS1, %EPA/FAME изменялся от 12,36 до 19,02% от начала до конца цикла ферментации с максимумом, равным 21,57%. Для NBS2, %EPA/FAME изменялся от 11,72 до 18,11% от начала до конца цикла ферментации с максимумом, равным 20,21%. NBS3, %EPA/FAME изменялся от 11,49 до 15,43% от начала до конца цикла ферментации с максимумом, равным 18,09%. NBS4, %EPA/FAME изменялся от 11,65 до 13,65% от начала до конца цикла ферментации с максимумом, равным 15,70%. При сравнении максимальных %EPA/FAME, самая низкая температура ферментации приводили к 37%-ному увеличению в максимальном содержании EPA по сравнению с самой высокой из оцениваемых температурой ферментации. Результаты приведены в приведенной ниже табл. 9.

Таблица 9

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

%DHA / FAME				
Часы	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

Отношение DHA:EPA				
Часы	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

Пример 7.

В данном примере [Nx0614et10], *Schizochytrium* sp. (ATCC PTA-10208) культивировали в двух 14-литровых ферментаторах модели "BioFlo 310" компании "Scientific New Brunswick" в конечном (составе) объеме, равном 10 л в способе с подпиткой углеродом (глюкоза) и азотом (гидроксид аммония). Один ферментатор (NBS15) продували воздухом, дополненным 15% оксида углерода от начала до конца цикла ферментации, и другой ферментатор (NBS17) продували воздухом только для оценки чувствительности культуры к увеличению растворенного углекислого газа. Для каждой ферментации использовали по 1 л культуры в качестве инокулята. Для размножения инокулята применяли 14-литровый ферментатор "Virtis". Среда для роста инокулята состояла из 10 литровых сред, разделенных на четыре отдельные группы. Группа 1 содержала 90 г MSG·1H₂O, 10 г KCl, 50 г SO₄·7H₂O, 3,3 г (NH₄)₂SO₄, 6,25 г NaCl, 60 г T154 (дрожжевого экстракта), 4,97 г KH₂PO₄, 2,9 г CaCl₂·2H₂O и 2 мл Dow 1520US (противовспенивающего средства). Среду группы 1 автоклавировали при 121°C в течение 120 мин в объеме, равном приблизительно 9,8 л. Группа 2 содержала 500 г глюкозы, растворенной в объеме, равном 800 мл RO-воде. Группа 3 содержала 31 мг MnCl₂·4H₂O, 31 мг ZnSO₄·7H₂O, 0,4 мг CoCl₂·6H₂O, 0,4 мг Na₂MoO₄·2H₂O, 20,7 мг CuSO₄·5H₂O, 20,7 мг NiSO₄·6H₂O, 103 мг FeSO₄·7H₂O и 234,1 мг лимонной кислоты. Каждую из сред групп 2 и 3 автоклавировали в течение 60 мин. Группа 4 содержала 97,5 мг тиамин-НCl, 1,6 мг витамина B12 и 33,3 мг полукальциевой соли пантотеновой кислоты, которые растворяли в RO-воде и затем стерилизовали фильтрованием. После охлаждения ферментатора до 22,5°C, среду групп 2, 3, 4 и 5 добавляли к ферментатору. С помощью гидроксида натрия и серной кислоты pH ферментатора доводили до 7, и уровень растворенного кислорода доводили до 100% перед инокуляцией. В ферментатор для инокулята вносили 200 мл ферментационной культуры меньшего объема (ферментационную культуру меньшего объема получали и культивировали таким же способом как 10-литровую культуру инокулята) и культивировали при 22,5°C, pH 7, при перемешивании при 433 об/мин и 5 л/мин воздуха в течение 40 ч, после этого в каждый из 14-литровых ферментаторов инокулировали по 1 л бульона. Каждый из 14-литровых ферментаторов содержал 10 л среды для ферментации. Среда для ферментации получали таким же способом, как среду ферментатора для инокулята. Для каждого из 14-литровых ферментаторов среда для ферментации состояла серии сред, разделенных на из 6 групп. Для всех сосудов группа 1 содержала 88 г Na₂SO₄, 6,25 г NaCl, 10 г KCl, 50 г SO₄·7H₂O, 4,2 г (NH₄)₂SO₄, 10 г T154 дрожжевого экстракта и 1 мл противовспенивающего средства Dow 1520-US. Группу 1 автоклавировали при 121°C в течение 120 мин в 14-литровых ферментаторах в объеме, равном приблизительно 6,5 л. Группа 2 содержала 2,9 г CaCl₂·2H₂O в RO-воде в объеме, равном приблизительно 20 мл. Группа 3 содержала 17,65 г KH₂PO₄, растворенного в 100 мл RO-воды. Группа 4 содержала 31 мг MnCl₂·4H₂O, 93 мг ZnSO₄·7H₂O, 0,4 мг

Na₂MoO₄·2H₂O, 20,7 мг CuSO₄·5H₂O, 20,7 мг NiSO₄·6H₂O, 103 мг FeSO₄·7H₂O и 468 мг лимонной кислоты, растворенной в 50 мл RO-воды. Каждую из сред групп 2, 3 и 4 автоклавируют в течение 60 мин. Группа 5 содержала 97,5 мг тиамин-НСl, 33,3 мг полукальциевой соли пантотеновой кислоты и 36,3 мкг биотина, все было растворено и стерилизовано фильтрованием в 10 мл RO-воде. Группа 6 содержала 300 г глюкозы приблизительно в 0,5 л RO-воды и ее автоклавируют в течение 60 мин. Среда групп 2, 3, 4, 5 и 6 объединяли и добавляли к ферментатору после того, как ферментатор достигал рабочей температуры, равной 22,5°C. Объем каждого ферментатора перед инокуляцией был равен приблизительно 6,5 л. В каждый ферментатор вносили по 1 л бульона из описанного выше ферментатора для инокулята. рН ферментации поддерживали при 7,0 в течение всего процесса ферментации, применяя 0,85 л раствора 4н. гидроксида аммония вплоть до истощения азота, после этого для поддержания рН на заданном уровне применяли 4н. гидроксид натрия и 3н. серную кислоту. Растворенный кислород контролировали для поддержания на заданном уровне, равном 20%, вплоть до истощения азота. После истощения азота растворенный кислород контролировали для поддержания целевого значения, равного 10%, до окончания ферментации с помощью перемешивания в режиме от 357 до 833 об/мин и тока воздуха, равном 8 л/мин. В течение всего процесса ферментации, подавали 850 г/л раствора 95% декстрозы (кукурузный сироп) для поддержания концентрации глюкозы на уровне менее чем 50 г/л. Через 8 дней сухая масса клеточек и титр омега-3 в каждом из 10-литровых ферментаторов изменялись в зависимости от условий поступления дополнительного оксида углерода. К 188 ч, в NBS15 эти параметры были равны 54,5 г/л DCW и 13,7 г/л омега-3; в NBS17 - 96,1 г/л DCW и 37,5 г/л омега-3. %EPA/FAME был повышенным в NBS15 (условия с поставкой дополнительного CO₂ в течении цикла) по сравнению с NBS17 (нет дополнительного CO₂). Для NBS15, %EPA/FAME изменялся от 25,50 до 35,48% от начала до конца цикла ферментации с максимумом, равным 38,34%. Для NBS 17, %EPA/FAME изменялся от 12,31 до 19,80% от начала до конца цикла ферментации с максимумом, равным 22,29%. При сравнении максимальных %EPA/FAME в условиях с дополнительной подачей оксида углерода и в условиях, в которых содержание оксида углерода было как в окружающей среде, наблюдали 73% увеличение в максимальном содержании EPA в условиях с дополнительной подачей CO₂.

%DHA/FAME был ниже для условий с дополнительной подачей CO₂ по сравнению с условиями, в которых содержание оксида углерода было как в окружающей среде в течение всего процесса цикла ферментации. Результаты представлены в нижеприведенной табл. 10.

Таблица 10

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

%DHA / FAME				
Часы	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

Отношение DHA:EPA				
Часы	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

Пример 8.

В данном примере [K019], *Schizochytrium* sp. (ATCC PTA-10208) культивировали в 157000-литровом ферментаторе с перемешиванием в конечной (составе) массе, равной 100000 кг, в способе с подпиткой углеродом (глюкоза) и азотом (безводный газообразный аммиак). Для каждой ферментации

использовали 4500 кг культуры в качестве инокулята. Для размножения инокулята применяли 7500-литровый ферментатор-инокулятор с перемешиванием. Среда для роста инокулята состояла из 4500 кг среды, которая была разделена на четыре отдельные группы. Группа 1 содержала 40,5 кг MSG-1H₂O, 4,5 кг KCl, 22,5 кг SO₄·7H₂O, 1,7 кг (NH₄)₂SO₄, 2,81 кг NaCl, 27 кг T154 (дрожжевого экстракта), 2 кг KН₂PO₄, 985 г CaCl₂ и 0,9 кг Dow 1520US (противовспенивающего средства), растворенных в технологической воде до общей массы, равной 2300 кг. Группа 2 содержала 247,5 кг глюкозы 1H₂O, растворенной в технологической воде с общей массой равной 1500 кг. Среду группы 1 стерилизовали в ферментаторе-инокуляторе а среду группы 2 стерилизовали в отдельном сосуде паром на месте при 122-123°C в течение 30 мин. Группа 3 содержала 14 г MnCl₂·4H₂O, 14 г ZnSO₄·7H₂O, 180 мг CoCl₂·6H₂O, 180 мг Na₂MoO₄·2H₂O, 9,3 г CuSO₄·5H₂O, 9,3 г NiSO₄·6H₂O, 46,4 г FeSO₄·7H₂O и 105,3 г лимонной кислоты, растворенных в 5 л дистиллированной воды. Среду группы 3 автоклавировали при 121°C в течение 60 мин. Группа 4 содержала 43,9 г тиамин-НCl, 720 мг витамина B12 и 15 г полукальциевой соли пантотеновой кислот, которые растворяли в 5 л дистиллированной воды, и затем стерилизовали фильтрованием. После охлаждения ферментатора-инокулятора до 22,5°C в ферментатор вносили среды групп 2, 3, 4. Перед инокуляцией pH в ферментаторе доводили до 7 с помощью гидроксида натрия и серной кислоты и уровень растворенного кислорода доводили до 100%. В ферментатор-инокулятор вносили 12 л ферментационной культуры меньшего объема (ферментационную культуру меньшего объема получали и культивировали таким же способом как посевную культуру) и культивировали при 22,5°C, pH 7, при перемешивании 90 об/мин и токе воздуха 130-170 Nm³/ч в течение 4-5 дней для получения сухой массы клеток, равной примерно 15 г/л. Среду для ферментации получали таким же способом, как среду ферментатора для инокулята. Среда для ферментации была разделена на 5 групп. Группа 1 содержала 177 кг KН₂PO₄, 880 кг Na₂SO₄, 500 кг SO₄·7H₂O, 42 кг (NH₄)₂SO₄, 100 кг T154 дрожжевого экстракта и 10 кг противовспенивающего средства Dow 1520-US в 9000 кг раствора. Группа 2 содержала 21,9 кг CaCl₂, 62,5 кг NaCl, 100 кг KCl в 9000 кг раствора. Среду групп 1 и 2 прокачивали через теплообменник в ферментатор, затем подавали воду для достижения в ферментаторе массы, равной 67000 кг. Группа 3 содержала 310 г MnCl₂·4H₂O, 930 г ZnSO₄·7H₂O, 4 г Na₂MoO₄·2H₂O, 207 г CuSO₄·5H₂O, 207 г NiSO₄·6H₂O, 1,03 кг FeSO₄·7H₂O и 4,68 кг лимонной кислоты, растворенных в 1500 кг технологической воды. Группа 4 содержала 4300 кг кукурузного сиропа (DE-95, 70,5%). Среду групп 3 и группу 4 стерилизовали в разных сосудах, паром на месте при 122-123°C в течение 30 мин. Группа 5 содержала 975 г тиамин-НCl, 333 г полукальциевой соли пантотеновой кислоты и 358 мг биотина, растворенных и стерилизованных фильтрованием в 5 л дистиллированной воды. Среду групп 3, 4 и 5 добавляли к ферментатору после того как ферментатор был охлажден до 22,5°C. Масса в объеме ферментатора перед инокуляцией была равна приблизительно 73500 кг. После того как были выставлены исходные условия ферментации (температура: 22,5°C, давление: 0,34 бар, ток воздуха: 3000 норм. куб. м/ч, перемешивание, 40 об/мин), pH ферментации доводили до 7 и уровень растворенного кислорода доводили до 100%. Масса после инокуляции была равна примерно 78000 кг. В начале цикла pH поддерживали при 7, применяя безводный аммиак до тех пор, пока не было добавлено 550 кг аммония, и затем применяли 30% раствор гидроксида натрия для поддержания pH при заданном значении, равном 7,5. С момента подачи аммиака растворенный кислород поддерживали на заданном уровне, равном 20%, а затем на уровне, равном 10%, с помощью перемешивание в режиме от 40 до 100 об/мин и тока воздуха в режиме от 2000 до 8000 норм. куб. м/ч. В течение всего процесса ферментации подавали 65% раствор кукурузного сиропа DE-95 для поддержания концентрации глюкозы примерно 35 г/л. В другой пример [K020], внесли три изменения по сравнению с примером K019: 1) давление снизили до 0,15 бар, 2) массу после инокуляции снизили до 68000 кг, 3) на 60-м ч после инокуляции ток воздуха увеличили до свыше 5000 Nm³/ч, и его поддерживали высоким в течение всего цикла независимо от концентрации растворенного кислорода. Три вышеперечисленных изменения снизили концентрацию растворенного оксида углерода в бульоне. Результаты показали, что при снижении CO₂, %DHA/FAME увеличился от 38,38 до 43,8% и %EPA/FAME снизился от 24,42 до 20,68%. Отношение DHA:EPA увеличилось от 1,57 до 2,12. Результаты представлены в приведенной ниже табл. 11.

Таблица 11

K019			
Возраст Часы	DHA/FAME %	EPA/FAME %	Отношение 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

Таблица 12

K020 (Растворенный CO ₂ снижен)			
Возраст часы	DHA/FAME %	EPA/FAME %	Отношение 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

Пример 9.

В приведенной ниже таблице максимальное содержание растворенного CO₂ рассчитывали для некоторых из примеров, применяя константу Генри. Первое условие, "10 л (NBS4 0719et10) при обратном давлении, равном 0 psi и CER - 45,5 ммоль/л/ч" представляет собой рассчитанный растворенный CO₂ для NBS4 в табл. 8 при интенсивности подачи оксида углерода, равной 45,5 ммоль/л/ч, объеме ферментации равном 10 л, скорости аэрации - 0,8 vvm (объем потока газа на единицу объема жидкости в минуту) и обратном давлении - 0 фунт/кв. дюйм. Второе условие, "10 л (NBS2 0719et10) при обратном давлении, равном 0 фунт/кв. дюйм, с 6% CO₂ во вводимом газе и CER - 50 ммоль/л/ч" представляет собой рассчитанный растворенный CO₂ для NBS2 в табл. 8 при интенсивности подачи оксида углерода, равной 50 ммоль/л/ч, объеме ферментации равном 10 л, скорости аэрации, равной 0,8 vvm, при обратном давлении, равном 0 фунт/кв. дюйм, и с дополнительным CO₂ во входящем потоке, равным 6% от общего газа по измерениям с помощью масс-спектрометрии с применением масс-спектрометра "Thermo Prima dB". Третье условие, "80 л (NB5 0614et10) при 2 psi обратном давлении и CER - 55 ммоль/л/ч" представляет собой рассчитанный растворенный CO₂ для NB5 в табл. 7 при интенсивности подачи оксида углерода, равной 55 ммоль/л/ч, объеме ферментации, равном 80 л, скорости аэрации, равной 1,0 vvm, и обратном давлении - 2 фунт/кв. дюйм. Четвертое условие, "80 л (NB6 0614et10) при обратном давлении - 15 psi и CER - 50 ммоль/л/ч" представляет собой рассчитанный растворенный CO₂ для NB6 в табл. 7 при интенсивности подачи оксида углерода, равной 50 ммоль/л/ч, при объеме ферментации, равном 80 л, скорости аэрации, равной 1,0 vvm и обратному давлению - 15 фунт/кв. дюйм. Пятое условие, "80 л (NB7 & NB8 0614et10) при обратном давлении - 20 psi и CER - 50 ммоль/л/ч" представляет собой рассчитанный растворенный CO₂ для NB7 и NB8 в табл. 7 при интенсивности подачи оксида углерода, равной 50 ммоль/л/ч, объему ферментации, равному 80 л, скорости аэрации, равной 1,0 vvm, и обратном давлении - 20 фунт/кв. дюйм. Все величины CER были рассчитаны с помощью данных по CO₂ в отходящих газах, полученных с помощью масс-спектрометра "Thermo Prima dB". Результаты расчетов представлены в приведенных ниже табл. 13 и 14.

Таблица 13

10-литровый (NBS4 0719et10) при обратном давлении 0 psi и CER 45,5 моль/л/час			
RV	10	L	
Абсолютное давление	вход	1,01	бар
Ток воздуха	вход	8	литр/мин
Vvm		0,8	
Заданный CO ₂ во входном отверстии для воздуха	выход	0,14	%
Разница в CO ₂ в отходящем газе		2,309125	%
CO ₂ в отходящем газе		2,446301	%
Парциальное давление CO ₂		0,024708	бар
	растворенный CO ₂	0,000785	моль/л
	растворенный CO ₂	34,53	мд
10-литровый (NBS2 0719et10) при обратном давлении 0 psi с 6% CO₂ во входящем газе и CER 50 моль/л/час			
RV	10	L	
Абсолютное давление	вход	1,01	бар
Ток воздуха	вход	8	литр/мин
Vvm		0,8	
Заданный CO ₂ во входном отверстии для воздуха	выход	7,00	%
Разница в CO ₂ в отходящем газе		2,5375	%
CO ₂ в отходящем газе		9,534653	%
Парциальное давление CO ₂		0,0963	бар
	растворенный CO ₂	0,003059	моль/л
	растворенный CO ₂	134,58	мд
80-литровый (NB5 0614et10) при обратном давлении 2 psi и CER 55 моль/л/час			
RV	80	L	
Обратное давление	вход	0,138	бар
Суммарное давление		1,21	бар
Ток воздуха	вход	80	литр/мин
Vvm		1	
Разница в CO ₂	из CPR	2,233	%
CO ₂ на выходе		2,233	%
Парциальное давление CO ₂		0,026975	бар
	растворенный CO ₂	0,000857	моль/л
	растворенный CO ₂	37,70	мд
80-литровый (NB6 0614et10) при обратном давлении 15 psi и CER 50 моль/л/час			
RV	80	L	
Обратное давление	вход	1,0345	бар
Суммарное давление		2,10	бар
Ток воздуха	вход	80	литр/мин
Vvm		1	
Разница в CO ₂	из CPR	2,03	%
CO ₂ на выходе		2,03	%
Парциальное давление CO ₂		0,042721	бар
	растворенный CO ₂	0,001357	моль/л
	растворенный CO ₂	59,71	мд
80-литровый (NB7 & NB8 0614et10) при обратном давлении 20 psi и CER 50 моль/л/час			
RV	80	L	
Обратное давление	вход	1,38	бар
Суммарное давление		2,45	бар
Ток воздуха	вход	80	литр/мин
Vvm		1	
Разница в CO ₂	из CPR	2,03	%
CO ₂ на выходе		2,03	%
Парциальное давление CO ₂		0,049735	бар
	растворенный CO ₂	0,00158	моль/л
	растворенный CO ₂	69,51	мд

Таблица 14

	nb5 (2 фунт/кв. дюйм)	nb6 (15 фунт/кв. дюйм)	nb7 (20 фунт/кв. дюйм)	nb8 (20 фунт/кв. дюйм)	NBS2 (+CO ₂ @ 24 часа)	NBS4 (без добавленного CO ₂)
%EPA/FAME	21,99	21,57	25,85	25,25	27,94	17,81
%DHA/FAME	40,35	39,22	34,14	32,42	24,36	38,81
Максимальный растворенный CO ₂	37,70	59,71	69,51	69,51	134,58	34,53

Пример 10.

Эксперименты проводили для определения влияния градиентов витаминов на производительность (сухая масса клеток биомассы (DW), % DHA, % жира и % EPA), применяя организм с номером доступа в ATCC PTA-9695 в среде для роста *Thraustochytrium* (TSFM) в условия, где уровень CO₂ равен уровню газа в окружающей среде.

Материалы и методы. Использовали четыре витамина (тиамин·HCl, B12, биотин и пантотенат Ca) в среде TSFM с 0,25 г/л Tastone и 0,625 г/л NaCl (см. табл. 16). Дополнительные количества MSG и KH₂PO₄ добавляли к средам для поддержания в них общего содержания азота и фосфора. Общие концентрации витаминов в средах были равны 0, 0,5×, 1×, 5×, 10×, 20× или 30× стандартное количество, в зависимости от изучаемого витамина (см. табл. 17). Исследование градиентов проводили отдельно по каждому витамину. Однако в случае биотина и пантотената Ca в среды также включали стандартные количества тиамин HCl и B12, поскольку концентрации двух последних были очень низкими в стандартной TSFM. Три контрольных TSFM также были включены в эксперимент для сравнения. Данные контроли представляли собой стандартные TSFM с 2 г/л Tastone (см. табл. 15) и 1× тиамин·HCl и 1× B12 (C1); свободные от Tastone TSFM без каких-либо витаминов (A); и свободные от Tastone TSFM с 1× тиамин·HCl и 1× B12 (B). Все контроли содержали 0,625 г/л NaCl. Трехдневную старую культуру PTA-9695 применяли для инокуляции в 250-миллилитровые встряхиваемые колбы в двух повторах в количестве 0,1 г DW/л. Все колбы (плоскостонные, с общим объемом среды 50 мл) инкубировали аэробно при 22,5±/-1°C на роторной качалке (200 об/мин). Все культуры собирали через 7 дней и проводили FAME-анализ в образцах конечной лиофилизированной биомассы.

Таблица 15. Среда роста *Thraustochytrium* во встряхиваемой колбе (TSFM) с 2 г/л Tastone

Компонент	Количество литр (г)	на [Исходный раствор] (г/л)	мл исходного раствора на 1 литр	
NaCl	0,625	сухой		
KCl	1	50	20 мл	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	5	227	22 мл	
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,2	190	1,05 мл	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,29	сухой		
MSG моногидрат	2	сухой		
Tastone 154	2	сухой		
HEPES (100 мМ)				
pH 7	23,8	сухой		
KH ₂ PO ₄	0,1	56,5	1,77 мл	добавить после автоклавирования
Глюкоза	50	500	100 мл	добавить после автоклавирования
Микроэлементы		смотри ниже	1 мл	добавить после автоклавирования
Витамины		смотри ниже	1 мл	добавить после автоклавирования
Раствор микроэлементов				
FeCl·6H ₂ O	2,9 мг	2,9		
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,02 мг	0,02		
MnCl ₂ ·4H ₂ O	8,6 мг	8,6		
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,26 мг	0,26		
ZnCl ₂	0,6 мг	0,6		
Лимонная кислота	12 мг	12 г (сухая)		
Раствор витаминов				
Тиамин	10 мкг	10 мг/л		
Витамин B12	1 мкг	1 мг/л		

Таблица 16. Среда роста *Thraustochytrium* во встряхиваемой колбе (TSFM) с 0,25 г/л Tastone

Компонент	Количество литр (г)	на [Исходный раствор] (г/л)	мл исходного раствора на 1 литр	
NaCl	0,625	сухой		
KCl	1	50	20 мл	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	5	227	22 мл	
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,2	190	1,05 мл	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,29	сухой		
MSG моногидрат	4,554	сухой		
Tastone GC 7189-1	0,25	сухой		
HEPES (100 мМ)				
pH 7	23,8	сухой		
КН ₂ РО ₄	0,1	56,5	4,28 мл	добавить после автоклавирования
Глюкоза	50	500	100 мл	добавить после автоклавирования
Микро-элементы		смотри ниже	1 мл	добавить после автоклавирования
Витамины		смотри ниже	1 мл	добавить после автоклавирования
Микро-элементы в TSFM				
FeCl ₃ ·6H ₂ O	2,9 мг	2,9		
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,02 мг	0,02		
MnCl ₂ ·4H ₂ O	8,6 мг	8,6		
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,26 мг	0,26		
ZnCl ₂	0,6 мг	0,6		
Лимонная кислота	12 мг	12 г (сухой)		
Раствор витаминов				
Тиамин	10 мкг	10 мг/л		
Витамин В12	1 мкг	1 мг/л		

Таблица 17. Концентрации витаминов, примененные в данном исследовании (мг/л)

Конц. витаминов[X]	Тиамин·HCl	В12	Биотин	Са-Пантотенат
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	

Результаты. Самые высокие DW и % жира (6,7 г/л и 38,5% соответственно) для градиента тиамин достигали, если добавленное количество данного витамина к среде в 5 раз превышало стандартный уровень (фиг. 1). % ДНА при этом уровне тиамин был равен 44,1%. При уровне тиамин ниже и выше 5×, как DW, так и % жира начал снижаться. % ДНА также снижался в средах с менее чем 5× тиамин и немного колебалась на уровне выше 5× тиамин без существенного улучшения. % ЕРА в культурах с градиентом тиамин изменялся от 8,6 до 11,5. Если Tastone или витамин не добавляли к среде (фиг. 5, среда А), все, кроме %ДНА, значительно снижалось. Однако, скорее всего, увеличение в % ДНА, было артефактом, поскольку, как и DW, так и % жира, были крайне низкими для этого условия. Похоже, что 1× концентрация В12 была оптимальной для DW, % ДНА, % жира и % ЕРА (фиг. 2). При этом уровне витамин В12, были получены следующие величины: 7,1 г/л DW, 50,6% ДНА, 42,7% жира и 2,1% ЕРА. Наиболее высокий уровень % ЕРА (11,5) получали, В12 не добавляли к среде. Свободная от Tastone среда без добавленного витамин дополнительно не улучшала производительность организма и повышенный % ДНА, скорее всего, был артефактом, как это было описано ранее (фиг. 5, среда А).

Аналогично, 1× концентрация биотин была оптимальной для DW, % ДНА и % жира (фиг. 3). Соответствующие значения для этих параметров были равны: 6,8 г/л, 47,7 и 37,9% соответственно. Процент ЕРА в этой точке был равен 1,9. Свободная от Tastone среда с 1× тиамин и 1× В12 (фиг. 5, среда В) значительно нарушала общую производительность РТА-9695.

Пантотенат Ca производил наиболее высокий уровень DW, % ДНА и % жира, если данный витамин добавляли к среде, в количестве 10× стандартное количество (фиг. 4). Оптимальные концентрации данных параметров были равны 7,0 г/л, 47,3 и 39,1% соответственно. Содержание EPA во всем эксперименте с градиентом пантотената Ca было менее чем 2%. Значительное снижение общей производительности РТА-9695 было замечено, когда организм был выращен на свободной от Tastone среде только с 1 × тиамин и 1 × B12 (фиг. 5, среда В).

Результаты также показаны в приведенных ниже таблицах данных

Trt ID -->	1a	1b	2a	2b	3a	3b	4a	4b	5a	5b	6a	6b
Тиамин HCL [x]	0	0	0.5	0.5	1	1	5	5	10	10	20	20
Биотин [x]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Са-пантотенат [x]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
% ДНА	39.31	38.49	40.43	44.27	45.32	43.95	41.49	46.61	42.87	48.90	44.14	42.29
средний % ДНА		38.90		42.35		44.63		44.05		45.89		43.21
% ЖИРА	32.31	31.47	32.40	37.82	37.25	32.74	34.92	42.03	36.85	39.11	36.63	36.27
средний % ЖИРА		31.89		35.01		35.00		38.48		37.98		36.45
% EPA	11.48	11.61	10.38	9.11	8.94	8.28	10.28	8.06	10.45	6.68	8.73	10.03
средний % EPA		11.54		9.74		8.61		9.17		8.57		9.38
% 16:0	29.58	29.48	31.34	31.19	30.38	31.87	30.15	31.04	30.20	30.87	31.59	30.00
средний % 16:0		29.53		31.26		31.13		30.59		30.58		30.80
% ARA	1.33	1.38	1.25	1.12	1.03	0.98	1.29	1.05	1.34	0.86	1.05	1.24
средний % ARA		1.36		1.18		1.00		1.17		1.10		1.15

стандартные концентрации витаминов (r/l)

Тиамин [HCL] [1x]	1.00E-05
Биотин [1x]	1.00E-06
Биотин [1x]	4.68E-06
Са-пантотенат [1x]	3.33E-03

градиенты витаминов [x]

	0	0.5	1	5	10	20	30
Тиамин HCL (r/l)	0	5.00E-06	1.00E-05	5.00E-05	1.00E-04	2.00E-04	3.00E-04
Биотин (r/l)	0	5.00E-07	1.00E-06	5.00E-06	1.00E-05	2.00E-05	3.00E-05
Биотин (r/l)	0	2.34E-06	4.68E-06	2.34E-05	4.68E-05	9.36E-05	1.40E-04
Са-пантотенат (r/l)	0	1.67E-03	3.33E-03	1.67E-02	3.33E-02	6.66E-02	9.99E-02

Суммарные концентрации витаминов, включая перенесенные с инокулятом

Тиамин HCL (r/l)	2.38E-05	2.88E-05	3.38E-05	7.38E-05	1.24E-04	2.24E-04	3.24E-04
Биотин (r/l)	1.37E-05	5.14E-07	1.01E-06	5.01E-06	1.00E-05	2.00E-05	3.00E-05
Биотин (r/l)	2.49E-04	2.51E-04	2.53E-04	2.72E-04	2.96E-04	3.42E-04	3.89E-04
Са-пантотенат (r/l)	3.10E-05	1.70E-03	3.36E-03	1.67E-02	3.33E-02	6.66E-02	9.99E-02

Суммарные концентрации витаминов (мг/л), включая перенесенные с инокулятом

Тиамин HCL	2.38E-02	2.88E-02	3.38E-02	7.38E-02	1.24E-01	2.24E-01	3.24E-01
Биотин	1.37E-05	5.14E-04	1.01E-03	5.01E-03	1.00E-02	2.00E-02	3.00E-02
Биотин	2.49E-01	2.51E-01	2.53E-01	2.72E-01	2.96E-01	3.42E-01	3.89E-01
Са-пантотенат	3.10E-02	1.70E+00	3.36E+00	1.67E+01	3.33E+01	6.66E+01	9.99E+01

Trt ID -->	13a	13b	14a	14b	15a	15b	16a	16b	17a	17b	18a	18b
Тиамин HCL [x]	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Биотин [x]	0.5	0.5	1	1	10	10	20	20	30	30	0	0
Са-пантотенат [x]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
% ДНА	48.32	46.94	46.13	49.18	45.43	43.83	44.37	41.79	44.36	42.19	42.07	42.74
средний % ДНА		47.63		47.65		44.53		43.08		43.28		42.41
% ЖИРА	28.16	35.67	34.34	41.39	35.67	32.04	33.84	31.41	35.51	31.11	32.04	28.89
средний % ЖИРА		31.92		37.87		33.85		32.63		33.31		30.46
% EPA	2.36	1.83	1.92	1.91	1.81	1.77	1.82	1.84	1.94	1.88	1.76	2.14
средний % EPA		2.09		1.92		1.79		1.83		1.91		1.95
% 16:0	38.18	40.33	40.70	38.13	41.64	43.28	42.34	44.57	42.40	44.16	44.55	43.42
средний % 16:0		39.26		39.42		42.46		43.46		43.28		43.99
% ARA	0.21	0.00	0.00	0.16	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
средний % ARA		0.11		0.08		0.00		0.00		0.00		0.00

Trt ID -->	12a	12b
Тиамин HCL [x]	0	0
Биотин [x]	0	0
Биотин [x]	0	0
Са-пантотенат [x]	0	0
% ДНА	39.31	38.49
средний % ДНА		38.90
% ЖИРА	32.31	31.47
средний % ЖИРА		31.89
% EPA	11.48	11.61
средний % EPA		11.54
% 16:0	29.58	29.48
средний % 16:0		29.53
% ARA	1.33	1.38
средний % ARA		1.36

Trt ID ---->	19a	19b	20a	20b	21a	21b	22a	22b	C1a (0.625 r/n NaCl)	C1b (0.625 r/n NaCl)
Тиамин HCl [x]	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Биотин [x]	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Са-пантотенат [x]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
средний % DHA	45.05	41.28	44.94	46.70	50.66	43.87	44.23	38.53	56.95	56.92
средний % ЖИРА	32.05	31.10	32.32	36.07	45.61	32.61	26.50	27.42	50.11	53.39
средний % EPA	1.94	1.73	1.86	1.83	1.87	1.82	2.21	1.73	2.50	2.45
средний % 16:0	41.55	45.27	41.79	40.38	37.09	42.91	42.30	47.56	31.04	31.08
средний % ARA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.15	0.00	0.00	0.00	0.20	0.21

Trt ID ---->	Aa	Ab	Ba	Bb
Тиамин HCl [x]	0	0	0	0
Биотин [x]	0	0	0	0
Са-пантотенат [x]	0	0	0	0
средний % DHA	51.82	56.09	50.74	54.23
средний % ЖИРА	9.02	7.13	20.86	26.54
средний % EPA	5.91	6.63	3.71	3.38
средний % 16:0	25.07	20.69	34.01	31.44
средний % ARA	0.00	0.00	0.00	0.23

Trt ID ---->	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Тиамин HCl [x]	0	0.5	1	5	10	20	0	0	0	0	0	0
Биотин [x]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Са-пантотенат [x]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
средний % DHA	38.90	42.35	44.63	44.05	45.89	43.21	38.90	50.60	50.44	46.21	45.89	45.89
средний % ЖИРА	31.89	35.01	35.00	36.48	37.98	36.45	31.89	42.73	41.36	35.59	34.06	34.06
средний % EPA	11.54	9.74	8.61	9.17	8.57	9.38	11.54	2.06	2.01	2.17	2.10	2.10
средний % 16:0	29.53	31.26	31.13	30.59	30.58	30.80	29.53	36.74	37.08	40.94	41.50	41.50
средний % ARA	1.36	1.18	1.00	1.17	1.10	1.15	1.36	0.15	0.15	0.07	0.00	0.00

Trt ID ---->	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Тиамин HCl/Био/Са-Пант. [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	0/20/0/0
Конц. витаминов (г/л)	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	0/0.00001/0/0	0/0.00005/0/0	0/0.00001/0/0	0/0.00002/0/0	0/0.00002/0/0
средний % DHA	38.90	42.35	44.63	44.05	45.89	43.21	38.90	50.60	50.44	46.21	45.89	45.89
средний % ЖИРА	31.89	35.01	35.00	36.48	37.98	36.45	31.89	42.73	41.36	35.59	34.06	34.06
средний % EPA	11.54	9.74	8.61	9.17	8.57	9.38	11.54	2.06	2.01	2.17	2.10	2.10
средний % 16:0	29.53	31.26	31.13	30.59	30.58	30.80	29.53	36.74	37.08	40.94	41.50	41.50
средний % ARA	1.36	1.18	1.00	1.17	1.10	1.15	1.36	0.15	0.15	0.07	0.00	0.00

Суммарная конц. витаминов (мг/л)	2.38E-02	2.98E-02	3.38E-02	7.38E-02	1.24E-01	2.24E-01	3.38E-02	4.01E-02	4.69E-02	3.10E-02	2.00E-02
средний DW г/л	5.863	6.214	6.112	6.658	6.355	6.277	5.863	7.079	7.001	6.505	6.442

Trt ID ---->	12	13	14	15	16
Тиамин HCl [x]	1	1	1	1	1
Биотин [x]	1	1	1	1	1
Са-пантотенат [x]	0	0.5	1	10	20
средний % DHA	42.41	47.63	47.65	44.53	43.08
средний % ЖИРА	30.46	31.92	37.87	33.85	32.63
средний % EPA	1.95	2.09	1.92	1.79	1.83
средний % 16:0	43.99	39.26	39.42	42.46	43.46
средний % ARA	0.00	0.11	0.08	0.00	0.00

Trt ID ---->	12	13	14	15	16
Тиамин HCl/Био/Са-Пант. [x]	1/1/0/0	1/1/0.5/0	1/1/1/0	1/1/10/0	1/1/20/0
Конц. витаминов (г/л)	0.00001/0.000001/0/0	0.00001/0.00001/0.000023/0	0.00001/0.00001/0.0000468/0	0.00001/0.00001/0.0000468/0	0.00001/0.00001/0.0000936/0
средний % DHA	42.41	47.63	47.65	44.53	43.08
средний % ЖИРА	30.46	31.92	37.87	33.85	32.63
средний % EPA	1.95	2.09	1.92	1.79	1.83
средний % 16:0	43.99	39.26	39.42	42.46	43.46
средний % ARA	0.00	0.11	0.08	0.00	0.00
Суммарная конц. витаминов (мг/л)	2.49E-01	2.51E-01	2.53E-01	2.96E-01	3.42E-01
средний DW г/л	6.029	5.705	6.813	6.458	6.286

Tit ID →	17	18	19	20	21
Титан НС1 [x]	1	1	1	1	1
Биотин [x]	1	1	1	1	1
Са-пантотенат [x]	30	0	0	0	0
Средний % DHA	43.28	42.41	43.16	45.82	47.27
Средний % ЖИРА	33.31	30.46	31.57	34.20	39.06
Средний % EPA	1.91	1.95	1.83	1.84	1.85
Средний % 16:0	43.28	43.99	43.41	41.09	40.00
Средний % ARA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.08

Tit ID →	17	18	19	20	21
Титан В12/Био/Са-Пант. [x]	1/1/30/0	1/1/0/0	1/1/0/1	1/1/0/5	1/1/0/10
Конц. витаминов (г/л)	0.00001/0.000001/0.000140/4/0	0.00001/0.000001/0/0	0.00001/0.000001/0/0.00333	0.00001/0.000001/0/0.01665	0.00001/0.000001/0/0.0333
Средний % DHA	43.28	42.41	43.16	45.82	47.27
Средний % ЖИРА	33.31	30.46	31.57	34.20	39.06
Средний % EPA	1.91	1.95	1.83	1.84	1.85
Средний % 16:0	43.28	43.99	43.41	41.09	40.00
Средний % ARA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.08

Суммарная конц. витаминов (мг/л)	3.89E-01	3.10E-02	3.36E+00	1.67E+01	3.33E+01
Средний DW г/л	6.356	6.029	6.068	6.349	6.961

Tit ID →	22	C1 (0.625 μm NaCl)	A	B
Титан НС1 [x]	1	1	0	1
Биотин [x]	1	1	0	1
Биотин [x]	0	0	0	0
Са-пантотенат [x]	20	0	0	0
Средний % DHA	41.38	56.93	53.96	52.48
Средний % ЖИРА	26.46	51.75	8.07	23.70
Средний % EPA	1.97	2.47	6.27	3.54
Средний % 16:0	44.93	31.05	22.88	32.72
Средний % ARA	0.00	0.20	0.00	0.11

Tit ID →	22	C1	A	B
Титан В12/Био/Са-Пант. [x]	1/1/0/20	1/1/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0
Конц. витаминов (г/л)	0.00001/0.000001/0/0.0666	0.00001/0.000001/0/0	0/0/0/0	0.00001/0.000001/0/0
Средний % DHA	41.38	56.93	53.96	52.48
Средний % ЖИРА	26.46	51.75	8.07	23.70
Средний % EPA	1.97	2.47	6.27	3.54
Средний % 16:0	44.93	31.05	22.88	32.72
Средний % ARA	0.00	0.20	0.00	0.11
Суммарная конц. витаминов (мг/л)	6.66E+01			
Средний DW г/л	5.492	7.851	0.428	4.899

Пример 11.

Эксперименты проводили для определения минимальной потребности организма с номером доступа в ATCC PTA-9695 в витамине B12 для достижения максимальной производительности при 10% CO₂, в том числе определяли, что минимальное количество витамина B12, которое необходимо для того, чтобы культура PTA-9695 производила максимальную сухую массу и выход DHA в условиях с 10%-ным CO₂.

Температура: 22,5 +/-1°C (10% CO₂).

Скорость перемешивания: 200 об/мин.

Основная среда: стандартная обедненная среда для ферментатора (DSDFM-B) (табл. 20).

Инокулят: 3-дневная старая культура PTA-9695, выращенная в DSDFM-B с различными концентрациями витамина B12.

Вначале разрабатывали новую криопробирку с PTA-9695 в SDFM-B (табл. 19) и клетки последовательно растили и переносили несколько раз в стандартной SDFM-B при 10% CO₂. Применяли 3-дневную старую культуру PTA-9695 в DSDFM-B (при 4%) для получения колб с исходным инокулятом, содержащих DSDFM-B с различными концентрациями витамина B12 (т.е. от 7,68 до 0 мг/л B12 для обработок от А до I, соответственно; см. табл. 18). Колбы с инокулятом для каждой концентрации витамина B12 поддерживали при 10% CO₂ и переносили культуры в соответствующие свежие среды каждые 7 дней. Ежедневный перенос культур был необходим для отмывки любого избытка витамина B12, который мог сохраниться внутри клеток, так что минимальная потребность в данном витамине могла быть точно определена. В две встряхиваемые колбы инокулировали соответствующие им 3-дневные старые инокуляты с теоретической DW, равной 0,1 г/л, применяя значение оптической плотности при 600 нм. Перед сбором культуры растили при 10% CO₂ в течение 9 дней, и затем анализировали с помощью FAME-анализа.

Результаты.

Примечание. Полученные точки для недели 3 исключили из данного исследования, так как подача CO₂ в инкубатор была прервана, и колбы пришлось удалить из инкубатора на 6 ч на время ремонта.

Длительное воздействие (вплоть до 4 недель) на PTA-9695 высоких концентраций витамина B12 (более чем 3,84 мг/л) может отрицательно сказаться на сухой массе, % жира и выходе DHA, тогда как концентрация, равная от 1,5 до 768 мкг/л витамина B12 не оказывала существенного влияния на DW, % жира, % EPA и выход DHA в PTA-9695.

Увеличение числа отдельных клеток (вплоть до 15, в отличие от 3-4) было отмечено в культурах, которые были выращены в присутствии 7,68 мг/л витамина B12 (обработка А).

Исключение витамина B12 из состава среды значительно увеличивает % EPA, примерно на 10%, в то же время это приводит к небольшому снижению как % DHA, так и % 16:0. Приведенные ниже фиг. 6-19 и табл. 21 показывают результаты экспериментов.

Заключение.

Минимум равный примерно 1,5 мкг/л витамина B12 (1/500 от стандартной концентрации в SDFM-

В), был незаменим для получения максимальных DW, % ДНА, % жира и выхода ДНА. Хотя очень высокие концентрации витамина В12 (более чем 3,84 мг/л) могут существенно снизить DW, % жира и выходе ДНА, полное лишение РТА-9695 данного витамин могут значительно (приблизительно на 10%) увеличить его % ЕРА. Очень высокие уровни витамина В12 также могут играть определенную роль в содействии трансформации "комковатой" культуры в культуру "отдельных клеток".

Таблица 18. Обработки витамином В12

Обработки	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Вит. В12 (мкг/л)	7680	3840	768	384	153,6	76,8	15,36	7,68	1,536	0

Таблица 19. Обедненная среда для фермента для РТА-9695 (SDFM-B), pH 7

Компонент	MW	[Исходный раствор] (г/л)	мл исходного раствора в 1 л встряхиваемой колбы	граммов сухого вещества в 1 л встряхиваемой колбе	Конечная концентрация (г/л)
NaCl	58,44			0,625	0,625
KCl	74,56	56	17,9		1,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	246,5	227	22		5,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	132,14	190	0,525		0,1
CaCl ₂ ·2H ₂ O	147	60	4,833		0,290
MSG (w/ 1 моль H ₂ O)	187,1			1,0	1,0
Na ₂ SO ₄	142,04			6,0	6,0
K ₂ SO ₄	174,27			1,0959	1,0959
Tastone (GC9156-1)				1,0	1,0
HEPES (100 мМ) pH 7,0	195,2			23,8	23,8
KH ₂ PO ₄	136,07	56,5	0,885		0,05
Глюкоза	180	500	100		50
Смесь микроэлементов					
FeSO ₄ ·7H ₂ O	278,02	1,03	10		0,0103
MnCl ₂ ·4H ₂ O	198	3,1	1		0,0031
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	287,4	9,3	1		0,0093
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	241,95	0,04	1		0,00004
CuSO ₄ ·5H ₂ O	249,5	2,07	1		0,00207
NiSO ₄ ·6H ₂ O	262,84	2,07	1		0,00207
Лимонная кислота (в FeSO ₄ ·7H ₂ O)		117,5			1,175
Раствор витаминов					
Витамин В12	1355,4	0,768	1		0,000768
Тиамин·HCl	337,3	11,7	1		0,0117
Са-Пантотенат	476,54	3,996	1		0,003996
Биотин	244,3	0,002	2,17		0,0000434

Таблица 20. Стандартная SDFM-B (DSDFM-B), pH 7

Компонент	MW	[Исходный раствор] (г/л)	мл исходного раствора в 1 л встряхиваемой колбы	граммов сухого вещества в 1 л встряхиваемой колбы	Конечная концентрация (г/л)
NaCl	58,44			0,625	0,625
KCl	74,56	56	17,9		1,0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	246,5	227	22		5,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	132,14	190	1,1483		0,218
CaCl ₂ ·2H ₂ O	147	60	4,833		0,290
MSG (w/ 1 моль H ₂ O)	187,1			2,188	2,188
Na ₂ SO ₄	142,04			6,0	6,0
K ₂ SO ₄	174,27			1,1240	1,1240
Tastone (GC9156-1)				0,0	0,0
HEPES (100 мМ) pH 7,0	195,2			23,8	23,8
KH ₂ PO ₄	136,07	56,5	2,475		0,140
Глюкоза	180	500	100		50
Смесь микроэлементов					
FeSO ₄ ·7H ₂ O	278,02	1,03	10		0,0103
MnCl ₂ ·4H ₂ O	198	3,1	1		0,0031
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	287,4	9,3	1		0,0093
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	241,95	0,04	1		0,00004
CuSO ₄ ·5H ₂ O	249,5	2,07	1		0,00207
NiSO ₄ ·6H ₂ O	262,84	2,07	1		0,00207
Лимонная кислота (в FeSO ₄ ·7H ₂ O)		117,5			1,175
Раствор витаминов					
Витамин В12	1355,4	0,768	1		0,000768
Тиамин·HCl	337,3	11,7	1		0,0117
Са-Пантотенат	476,54	3,996	1		0,003996
Биотин	244,3	0,002	2,65		0,0000053

Таблица 21. Данные из экспериментов

Серии встряхиваемых колб (SF)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Обработка ID	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Конц. вит. B12 (мг/л)	7680	3840	768	384	153,6	76,8	15,36	7,68	1,536	0
Конц. вит. B12 (Log 10 -мг/л)	3,885361	3,584331	2,885361	2,584331	2,186391	1,885361	1,186391	0,885361	0,186391	0,001
DW (г/л)										
колба 1	2,832	3,48	3,64	4,186	3,728	3,952	3,71	3,96	4,5	3,868
колба 2	3,03	3,324	3,88	3,412	3,626	3,746	4,024	3,682	4,17	4,094
среднее	2,931	3,402	3,76	3,799	3,677	3,849	3,867	3,821	4,335	3,981
% Жиры (как % от площади)										
колба 1	56,9	55,5	58,9	63,9	61,6	60,5	60,4	64,7	66,6	60,4
колба 2	52,4	56,7	61,6	59,8	58,7	60,7	64,1	57,9	66,3	62,9
среднее	54,6	56,1	60,3	61,9	60,1	60,6	62,2	61,3	66,5	61,7
% ДНА										
колба 1	45,4	45,8	46,6	48,2	45,3	46,4	47,9	47,4	48,9	46,4
колба 2	45,7	44,0	47,1	46,4	46,3	46,0	48,8	46,6	48,0	46,5
среднее	45,5	44,9	46,9	47,3	45,8	46,2	48,4	47,0	48,4	46,5
ДНА (мг/г)										
колба 1	260,1	256,6	277,2	310,6	281,1	283,0	291,7	309,4	328,2	283,0
колба 2	241,4	251,1	292,7	279,8	274,2	281,7	315,4	271,9	320,9	294,9
среднее	250,8	253,9	285,0	295,2	277,7	282,3	303,5	290,6	324,6	289,0
% Жиры (как мг/г)										
колба 1	57,3	56,0	59,4	64,4	62,1	61,0	60,9	65,2	67,1	60,9
колба 2	52,8	57,1	62,1	60,3	59,2	61,2	64,6	58,4	66,9	63,4
среднее	55,1	56,5	60,8	62,4	60,6	61,1	62,7	61,8	67,0	62,2
Жир (г/л)										
колба 1	1,6	1,9	2,2	2,7	2,3	2,4	2,3	2,6	3,0	2,4
колба 2	1,6	1,9	2,4	2,1	2,1	2,3	2,6	2,1	2,8	2,6
среднее	1,6	1,9	2,3	2,4	2,2	2,4	2,4	2,4	2,9	2,5
Выход ДНА (г/л)										
колба 1	0,7	0,9	1,0	1,3	1,0	1,1	1,1	1,2	1,5	1,1
колба 2	0,7	0,8	1,1	1,0	1,0	1,1	1,3	1,0	1,3	1,2
среднее	0,7	0,9	1,1	1,1	1,0	1,1	1,2	1,1	1,4	1,2
% ЕРА										
колба 1	19,2	20,1	18,7	16,7	20,4	19,0	16,1	17,5	15,5	19,3
колба 2	18,6	21,6	18,2	18,3	19,0	19,5	15,2	18,9	16,7	19,2
среднее	18,9	20,8	18,5	17,5	19,7	19,2	15,6	18,2	16,1	19,3
ЕРА (мг/г)										
колба 1	108,2	110,3	109,2	105,8	124,7	113,6	96,1	112,2	102,5	115,5
колба 2	96,3	121,4	111,1	108,4	110,6	117,3	96,3	108,1	110,0	120,0
среднее	102,3	115,8	110,2	107,1	117,7	115,5	96,2	110,1	106,3	117,7
Выход ЕРА (г/л)										
колба 1	0,3	0,4	0,4	0,5	0,5	0,5	0,4	0,5	0,5	0,5
колба 2	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5
среднее	0,3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5	0,4	0,4	0,5	0,5
L-F DW (г/л)										
колба 1	1,2	1,5	1,5	1,5	1,4	1,5	1,5	1,4	1,5	1,5
колба 2	1,4	1,4	1,5	1,4	1,5	1,5	1,4	1,5	1,4	1,5

среднее	1,3	1,5	1,5	1,4	1,4	1,5	1,4	1,5	1,4	1,5
% 16:0										
колба 1	24,0	22,8	23,1	23,6	22,6	23,0	24,4	23,4	23,9	22,5
колба 2	24,2	22,7	23,1	23,8	23,1	22,8	24,5	23,0	23,6	22,5
среднее	24,1	22,7	23,1	23,7	22,9	22,9	24,4	23,2	23,7	22,5
% DPA n-3										
колба 1	1,1	1,0	1,2	1,0	1,2	1,1	1,1	1,1	1,0	1,1
колба 2	1,1	1,1	1,1	1,2	1,1	1,2	1,1	1,1	1,0	1,1
среднее	1,1	1,1	1,1	1,1	1,2	1,2	1,1	1,1	1,0	1,1
% DPA n-6										
колба 1	2,1	2,1	2,3	2,5	2,1	2,2	2,4	2,4	2,6	2,2
колба 2	2,2	2,0	2,3	2,2	2,2	2,2	2,5	2,2	2,5	2,2
среднее	2,1	2,0	2,3	2,3	2,2	2,2	2,5	2,3	2,5	2,2
% Суммарных омега-3										
колба 1	65,7	66,9	66,5	66,0	66,9	66,5	65,1	66,0	65,4	66,9
колба 2	65,4	66,7	66,5	65,9	66,5	66,7	65,1	66,5	65,8	66,9
среднее	65,6	66,8	66,5	65,9	66,7	66,6	65,1	66,3	65,6	66,9
pH										
колба 1	6,81	6,83	6,84	6,83	6,82	6,82	6,83	6,83	6,82	6,81
колба 2	6,81	6,83	6,81	6,82	6,83	6,82	6,82	6,82	6,82	6,81
среднее	6,81	6,83	6,83	6,83	6,83	6,82	6,83	6,83	6,82	6,81
Серии встряхиваемых колб (SF)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Обработка ID	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Конц. вит. B12 (мг/л)	7680	3840	768	384	153,6	76,8	15,36	7,68	1,536	0
Конц. вит. B12 (Log 10 -мг/л)	3,885361	3,584331	2,885361	2,584331	2,186391	1,885361	1,186391	0,885361	0,186391	0,001
DW (г/л)										
колба 1	2,01	4,17	4,176	3,764	4,276	4,218	3,916	4,44	4,59	3,676
колба 2	2,574	3,354	4,106	3,824	3,922	4,21	4,046	4,352	4,518	3,174
среднее	2,292	3,762	4,141	3,794	4,099	4,214	3,981	4,396	4,554	3,425
% Жира (как % от площади)	28,8	62,2	64,4	60,5	65,3	58,8	58,2	66,4	63,0	61,4
колба 1	39,2	55,6	65,0	55,9	62,6	62,2	65,4	62,0	66,3	53,0
колба 2	34,0	58,9	64,7	58,2	63,9	60,5	61,8	64,2	64,7	57,2
среднее										
% ДНА	38,9	46,4	47,5	46,1	48,0	45,7	43,2	47,7	47,9	38,5
колба 1	40,9	41,3	46,9	43,6	46,3	47,1	45,2	47,6	47,5	35,3
колба 2	39,9	43,9	47,2	44,9	47,1	46,4	44,2	47,6	47,7	36,9
среднее										
ДНА (мг/г)	109,7	283,1	300,1	273,9	307,2	263,4	246,7	310,6	296,0	232,1
колба 1	157,3	225,4	299,0	239,5	284,4	287,8	290,3	289,4	309,4	183,6
колба 2	133,5	254,3	299,6	256,7	295,8	275,6	268,5	300,0	302,7	207,8
среднее	28,8	62,2	64,4	60,5	65,3	58,8	58,2	66,4	63,0	61,4
% Жира (как мг/г)										
колба 1	28,2	61,0	63,1	59,4	64,0	57,7	57,1	65,1	61,9	60,2
колба 2	38,5	54,5	63,7	54,9	61,4	61,1	64,2	60,8	65,1	52,0
среднее	33,3	57,8	63,4	57,2	62,7	59,4	60,6	63,0	63,5	56,1
Жир (г/л)										
колба 1	0,6	2,5	2,6	2,2	2,7	2,4	2,2	2,9	2,8	2,2
колба 2	1,0	1,8	2,6	2,1	2,4	2,6	2,6	2,6	2,9	1,7

среднее	0,8	2,2	2,6	2,2	2,6	2,5	2,4	2,8	2,9	1,9
Выход ДНА (г/л)										
колба 1	0,2	1,2	1,3	1,0	1,3	1,1	1,0	1,4	1,4	0,9
колба 2	0,4	0,8	1,2	0,9	1,1	1,2	1,2	1,3	1,4	0,6
среднее	0,3	1,0	1,2	1,0	1,2	1,2	1,1	1,3	1,4	0,7
% EPA										
колба 1	22,9	19,0	18,8	17,4	17,1	18,8	21,6	18,0	16,4	28,3
колба 2	20,8	24,5	18,8	19,6	18,8	17,0	20,0	16,1	16,8	31,4
среднее	21,8	21,8	18,8	18,5	17,9	17,9	20,8	17,0	16,6	29,8
EPA (мг/г)										
колба 1	63,9	114,9	117,4	102,4	108,3	107,6	122,1	115,8	100,5	168,9
колба 2	79,1	132,4	118,6	106,6	114,4	102,8	127,0	96,9	108,3	161,6
среднее	71,5	123,6	118,0	104,5	111,4	105,2	124,5	106,4	104,4	165,2
Выход EPA (г/л)										
колба 1	0,1	0,5	0,5	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,6
колба 2	0,2	0,4	0,5	0,4	0,5	0,4	0,5	0,4	0,5	0,5
среднее	0,2	0,5	0,5	0,4	0,5	0,4	0,5	0,5	0,5	0,6
L-F DW (г/л)										
колба 1	1,4	1,6	1,5	1,5	1,5	1,8	1,7	1,5	1,8	1,5
колба 2	1,6	1,5	1,5	1,7	1,5	1,6	1,5	1,7	1,6	1,5
среднее	1,5	1,6	1,5	1,6	1,5	1,7	1,6	1,6	1,7	1,5
% 16:0										
колба 1	26,0	22,5	21,7	24,3	22,5	23,1	23,0	22,0	23,2	20,2
колба 2	25,9	22,1	21,9	24,2	22,6	23,3	22,5	23,5	23,1	19,9
среднее	26,0	22,3	21,8	24,3	22,5	23,2	22,7	22,8	23,2	20,0
% DPA n-3										
колба 1	1,5	1,0	1,1	1,0	1,0	1,0	1,0	0,9	1,0	1,4
колба 2	1,2	1,1	1,0	1,0	1,0	1,0	0,9	1,0	0,9	1,4
среднее	1,4	1,0	1,1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	0,9	1,4
% DPA n-6										
колба 1	1,3	2,3	2,3	2,3	2,5	2,3	1,9	2,4	2,6	1,3
колба 2	1,7	1,6	2,3	2,1	2,3	2,5	2,1	2,6	2,5	1,1
среднее	1,5	1,9	2,3	2,2	2,4	2,4	2,0	2,5	2,6	1,2
% Суммарных омега-3										
колба 1	63,2	66,4	67,4	64,5	66,1	65,5	65,8	66,6	65,2	68,2
колба 2	62,9	66,9	66,7	64,2	66,1	65,1	66,1	64,6	65,2	68,1
среднее	63,1	66,7	67,0	64,4	66,1	65,3	66,0	65,6	65,2	68,1
pH										
колба 1	6,70	6,69	6,72	6,71	6,71	6,72	6,71	6,71	6,72	6,71
колба 2	6,67	6,71	6,72	6,71	6,72	6,72	6,71	6,71	6,72	6,71
среднее	6,69	6,70	6,72	6,71	6,72	6,72	6,71	6,71	6,72	6,71
Серии встряхиваемых колб (SF)	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Обработка ID	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Конц. вит. B12 (мг/л)	7680	3840	768	384	153,6	76,8	15,36	7,68	1,536	0
Конц. вит. B12 (Log 10 -мг/л)	3,885361	3,584331	2,885361	2,584331	2,186391	1,885361	1,186391	0,885361	0,186391	0,001
DW (г/л)										
колба 1	2,786	2,92	4,108	3,258	3,524	4,258	3,974	3,794	3,74	3,902
колба 2	2,868	3,106	2,87	3,376	3,234	4,39	4,834	3,374	4,434	3,82
среднее	2,827	3,013	3,489	3,317	3,379	4,324	4,404	3,584	4,087	3,861

% Жиры (как % от площади)										
колба 1	42,6	41,0	54,5	46,5	50,7	59,8	57,0	51,0	55,9	62,3
колба 2	44,0	43,1	48,4	49,8	49,3	56,8	62,2	52,3	56,4	56,5
среднее	43,3	42,0	51,4	48,1	50,0	58,3	59,6	51,7	56,2	59,4
% ДНА										
колба 1	42,0	39,8	43,0	43,1	43,1	44,8	45,4	44,0	43,4	45,4
колба 2	41,9	39,9	40,5	42,8	42,5	44,2	46,3	43,8	37,7	38,3
среднее	41,9	39,9	41,8	42,9	42,8	44,5	45,9	43,9	40,6	41,9
ДНА (мг/г)										
колба 1	177,2	161,7	232,4	198,4	216,2	265,6	256,5	222,5	240,8	280,2
колба 2	182,6	170,3	194,2	210,9	207,6	248,8	285,6	227,2	211,0	214,4
среднее	179,9	166,0	213,3	204,6	211,9	257,2	271,1	224,8	225,9	247,3
% Жиры (как мг/г)										
колба 1	42,2	40,6	54,0	46,1	50,2	59,2	56,4	50,5	55,4	61,7
колба 2	43,6	42,7	47,9	49,3	48,9	56,3	61,7	51,9	55,9	56,0
среднее	42,9	41,7	51,0	47,7	49,5	57,8	59,1	51,2	55,7	58,8
Жир (г/л)										
колба 1	1,2	1,2	2,2	1,5	1,8	2,5	2,2	1,9	2,1	2,4
колба 2	1,2	1,3	1,4	1,7	1,6	2,5	3,0	1,7	2,5	2,1
среднее	1,2	1,3	1,8	1,6	1,7	2,5	2,6	1,8	2,3	2,3
Выход ДНА (г/л)										
колба 1	0,5	0,5	1,0	0,6	0,8	1,1	1,0	0,8	0,9	1,1
колба 2	0,5	0,5	0,6	0,7	0,7	1,1	1,4	0,8	0,9	0,8
среднее	0,5	0,5	0,8	0,7	0,7	1,1	1,2	0,8	0,9	1,0
% EPA										
колба 1	22,4	24,7	23,9	22,0	23,5	22,1	20,9	22,3	23,8	21,3
колба 2	23,0	24,9	25,7	22,8	24,4	23,0	20,1	22,6	31,3	30,9
среднее	22,7	24,8	24,8	22,4	24,0	22,6	20,5	22,4	27,5	26,1
EPA (мг/г)										
колба 1	93,6	99,2	127,3	100,4	116,5	129,6	116,7	111,3	130,2	129,9
колба 2	98,9	105,2	121,5	111,2	118,0	128,1	122,6	115,5	173,1	170,7
среднее	96,2	102,2	124,4	105,8	117,2	128,8	119,7	113,4	151,6	150,3
Выход EPA (г/л)										
колба 1	0,3	0,3	0,5	0,3	0,4	0,6	0,5	0,4	0,5	0,5
колба 2	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,6	0,6	0,4	0,8	0,7
среднее	0,3	0,3	0,4	0,4	0,4	0,6	0,5	0,4	0,6	0,6
L-F DW (г/л)										
колба 1	1,6	1,7	1,9	1,8	1,8	1,7	1,7	1,9	1,7	1,5
колба 2	1,6	1,8	1,5	1,7	1,7	1,9	1,9	1,6	2,0	1,7
среднее	1,6	1,8	1,7	1,7	1,7	1,8	1,8	1,8	1,8	1,6
% 16:0										
колба 1	24,0	23,8	21,4	23,1	21,7	21,3	21,9	22,0	21,0	21,6
колба 2	23,5	23,5	21,7	22,8	21,4	21,0	21,5	22,0	18,2	18,0
среднее	23,7	23,6	21,5	23,0	21,6	21,1	21,7	22,0	19,6	19,8
% DPA n-3										
колба 1	1,2	1,2	1,0	1,2	1,2	1,0	1,0	1,1	1,0	0,9
колба 2	1,2	1,2	1,1	1,2	1,2	1,0	1,0	1,1	1,3	1,4
среднее	1,2	1,2	1,1	1,2	1,2	1,0	1,0	1,1	1,2	1,1
% DPA n-6										
колба 1	1,7	1,4	1,8	1,8	1,8	2,0	2,1	1,9	1,8	2,1

колба 2	1,7	1,5	1,5	1,8	1,7	2,0	2,3	1,9	1,2	1,3
среднее	1,7	1,5	1,7	1,8	1,8	2,0	2,2	1,9	1,5	1,7
% Суммарных омега-3										
колба 1	65,6	65,8	67,9	66,3	67,7	67,9	67,4	67,4	68,2	67,6
колба 2	66,0	66,0	67,3	66,8	68,1	68,3	67,4	67,5	70,4	70,5
среднее	65,8	65,9	67,6	66,6	67,9	68,1	67,4	67,5	69,3	69,1
pH										
колба 1	6,85	6,89	6,89	6,88	6,88	6,88	6,87	6,88	6,88	6,87
колба 2	6,86	6,89	6,89	6,88	6,88	6,89	6,86	6,87	6,88	6,86
среднее	6,86	6,89	6,89	6,88	6,88	6,89	6,87	6,88	6,88	6,87
Серии встряхиваемых колб (SF)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Обработка ID	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Конц. вит. B12 (мг/л)	7680	3840	768	384	153,6	76,8	15,36	7,68	1,536	0
Конц. вит. B12 (Log 10 -мг/л)	3,885361	3,584331	2,885361	2,584331	2,186391	1,885361	1,186391	0,885361	0,186391	0,001
DW (г/л)										
колба 1	2,538	2,512	4,242	4,528	2,498	3,796	3,79	3,87	3,676	3,972
колба 2	2,646	3,162	2,86	4,368	2,744	3,774	3,81	4,002	4,202	4,35
среднее	2,592	2,837	3,551	4,448	2,621	3,785	3,8	3,936	3,939	4,161
% Жира (как % от площади)										
колба 1	42,5	41,9	57,5	66,7	43,6	58,1	58,2	60,0	57,1	59,2
колба 2	44,6	32,9	45,4	63,0	43,9	57,3	57,7	59,9	60,4	62,0
среднее	43,5	37,4	51,5	64,9	43,8	57,7	57,9	59,9	58,8	60,6
% ДНА										
колба 1	41,1	38,0	47,6	47,1	36,6	45,1	46,0	44,6	43,8	38,0
колба 2	40,2	40,8	40,0	46,7	39,0	45,5	45,1	45,9	46,7	40,2
среднее	40,7	39,4	43,8	46,9	37,8	45,3	45,5	45,2	45,2	39,1
ДНА (мг/г)										
колба 1	172,7	157,5	270,6	311,0	157,7	259,4	264,6	264,2	247,3	222,3
колба 2	177,2	132,8	179,6	290,9	169,2	257,3	257,1	271,7	278,5	246,0
среднее	175,0	145,2	225,1	300,9	163,5	258,4	260,9	267,9	262,9	234,2
% Жира (как мг/г)										
колба 1	42,0	41,4	56,9	66,0	43,1	57,5	57,5	59,3	56,5	58,5
колба 2	44,1	32,5	44,9	62,3	43,4	56,6	57,0	59,2	59,7	61,3
среднее	43,0	37,0	50,9	64,1	43,2	57,0	57,3	59,3	58,1	59,9
Жир (г/л)										
колба 1	1,1	1,0	2,4	3,0	1,1	2,2	2,2	2,3	2,1	2,3
колба 2	1,2	1,0	1,3	2,7	1,2	2,1	2,2	2,4	2,5	2,7
среднее	1,1	1,0	1,8	2,9	1,1	2,2	2,2	2,3	2,3	2,5
Выход ДНА (г/л)										
колба 1	0,4	0,4	1,1	1,4	0,4	1,0	1,0	1,0	0,9	0,9
колба 2	0,5	0,4	0,5	1,3	0,5	1,0	1,0	1,1	1,2	1,1
среднее	0,5	0,4	0,8	1,3	0,4	1,0	1,0	1,1	1,0	1,0
% ЕРА										
колба 1	22,8	27,1	17,8	16,7	29,2	21,6	20,0	21,9	22,2	31,3
колба 2	24,5	24,4	26,7	19,5	26,3	21,0	20,9	20,5	19,2	28,5
среднее	23,6	25,7	22,3	18,1	27,7	21,3	20,4	21,2	20,7	29,9
ЕРА (мг/г)										
колба 1	94,9	111,3	100,5	109,1	124,9	123,0	114,1	128,8	124,1	181,9

колба 2	106,9	78,5	118,8	120,4	113,0	118,1	117,9	120,4	113,7	173,2
среднее	100,9	94,9	109,7	114,7	119,0	120,5	116,0	124,6	118,9	177,6
Выход EPA (г/л)										
колба 1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,3	0,5	0,4	0,5	0,5	0,7
колба 2	0,3	0,3	0,3	0,5	0,3	0,4	0,5	0,5	0,5	0,8
среднее	0,3	0,3	0,4	0,5	0,3	0,5	0,4	0,5	0,5	0,7
L-F DW (г/л)										
колба 1	1,5	1,5	1,8	1,5	1,4	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6
колба 2	1,5	2,1	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,6	1,7	1,7
среднее	1,5	1,8	1,7	1,6	1,5	1,6	1,6	1,6	1,6	1,7
% 16:0										
колба 1	24,1	23,1	22,7	24,5	22,4	21,6	22,3	21,7	22,3	17,8
колба 2	23,6	23,1	21,6	22,0	22,9	21,8	22,5	21,9	22,2	18,4
среднее	23,9	23,1	22,1	23,3	22,7	21,7	22,4	21,8	22,2	18,1
% DPA n-3										
колба 1	1,5	1,4	1,2	1,2	1,5	1,1	1,2	1,1	1,1	1,4
колба 2	1,5	1,3	1,5	1,1	1,4	1,1	1,1	1,1	1,2	1,3
среднее	1,5	1,4	1,4	1,2	1,5	1,1	1,2	1,1	1,1	1,3
% DPA n-6										
колба 1	1,6	1,2	2,4	2,3	1,1	2,1	2,2	2,0	1,9	1,2
колба 2	1,5	1,6	1,4	2,2	1,3	2,1	2,1	2,2	2,2	1,4
среднее	1,5	1,4	1,9	2,3	1,2	2,1	2,1	2,1	2,1	1,3
% Суммарных омега-3										
колба 1	65,4	66,6	66,6	65,0	67,3	67,8	67,2	67,6	67,0	70,7
колба 2	66,2	66,5	68,2	67,3	66,8	67,6	67,0	67,5	67,1	70,0
среднее	65,8	66,5	67,4	66,2	67,0	67,7	67,1	67,5	67,0	70,3
pH										
колба 1	6,83	6,84	6,82	6,84	6,83	6,84	6,84	6,84	6,86	6,85
колба 2	6,82	6,84	6,81	6,84	6,83	6,84	6,84	6,84	6,84	6,85
среднее	6,83	6,84	6,82	6,84	6,83	6,84	6,84	6,84	6,85	6,85

Пример 12.

Градиенты витамина В12 в организме с номером доступа в ATCC РТА-10208 при 10% CO₂.

Эксперименты проводили для определения концентрации витамина В12, которая обеспечивает оптимальный рост и продукцию EPA в РТА-10208.

Температура: 23°C.

Скорость перемешивания: 200 об/мин.

Основная среда: стандартная SDFM-O (DSDFM-O).

Инокулят: размораживают РТА-10208 в SDFM-O в условиях окружающей среды. Переносят 2 мл культуры в 48 мл DSDFM-O при 10% CO₂. Переносят культуру в свежую DSDFM-O (10% CO₂) (см. табл. 22). Переносят культуру в свежую DSDFM-O (10% CO₂). Применяют культуру для инокуляции в эксперименте с градиентами витамина В12 Неделя #1 (2 мл/колба) (10% CO₂).

Схема эксперимента.

Все культуры выращивали в 50 мл встряхиваемых колбах, и для каждого из условий брали по две колбы. Каждые семь дней РТА-10208 инокулировали в девятидневные градиенты витамина В12 в DSDFM-O (без Tastone). Инокуляты для каждой концентрации витамина В12 поддерживали на протяжении всего курса эксперимента. При многократном пересеве РТА-10208 в условиях со сниженными концентрациями витамина В12 из клеток эффективно отмывается избыток витамина В12. Инокуляты для каждой из концентраций витамина В12 переносили каждые семь дней. Четырехдневные инокуляты применяли для "запуска" каждого из девятидневных градиентов витамина В12. Каждый девятидневный градиент последовательно помечали как эксперимент номер А, В, С, D, E, F, G, H, I, J и К в приведенной ниже в табл. 23. Перед инокуляцией каждого градиента для того, чтобы переносить приблизительно одинаковое количество клеток, для каждой концентрации витамина В12 измеряли оптическую плотность. Через девять дней роста все культуры собирали для измерения pH, сухой массы и профиля жирных кислот. Эксперимент завершали в тот момент, когда устанавливали, что сухие массы при каждой концентрации витамина В12 сохраняются неизменными по меньшей мере в течение трех последовательных девятидневных градиентов.

Таблица 22. Стандартная обедненная среда для ферментера для Orca (DSDFM-O)

Компонент	Количество на литр (г)	[Исходный раствор] (г/л)	мл исходного раствора на 1 литр			г/л					мг/л				
						Na	K	Mg	Ca	Cl	Fe	Cu	Mn	Co	Zn
NaCl	0,625	сухой				0,25					0,38				
Na ₂ SO ₄	7,52	сухой													
K ₂ SO ₄	0,1	50	2 мл				0,04								
KCl	1	50	20 мл				0,52			0,48					
MgSO ₄ ·7H ₂ O	5	227	22 мл					0,47							
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,217	190	1,14 мл												
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,29	сухой							0,08	0,14					
MSG моногидрат	2,16	сухой													
HEPES (100 мМ) рН 7	23,8	сухой													
КН ₂ РО ₄	0,136	56,5	2,4	добавить после автоклавирования			0,04								
Глюкоза	50	500	100 мл	добавить после автоклавирования											
Раствор цитрата Fe		смотри ниже	10 мл	добавить после автоклавирования											
Микроэлементы		смотри ниже	1 мл	добавить после автоклавирования											
Витамины		смотри ниже	1 мл	добавить после автоклавирования											
Раствор цитрата Fe															
Лимонная кислота	1175 мг	117,5													
FeSO ₄ ·7H ₂ O	10,3 мг	1,03				Na	K	Mg	Ca	Cl	Fe	Cu	Mn	Co	Zn
Раствор микроэлементов											2,07				
MnCl ₂ ·4H ₂ O	3,1 мг	3,1											0,86		
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	9,3 мг	9,3													2,12
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,04 мг	0,04													
CuSO ₄ ·5H ₂ O	2,07 мг	2,07										0,53			
NiSO ₄ ·6H ₂ O	2,07 мг	2,07													
рН до 2,5 с помощью HCl															
Раствор витаминов															
Витамин В12	0,768 мг	0,768													
Тиамин	11,7 мг	11,7													
Са-Пантотенат	3,996 мг	3,996													
Биотин	0,00434 мг	4,34 мг													
Ионы суммарно (ppm)							607,32			995,8536					

Таблица 23

[] Витамин В12	мг/л Витамина В12
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

Было проведено семь последовательных градиентов от 5× до 1/500× витамина В12. В конце последнего эксперимента новый эксперимент начинали, сравнивая рост РТА-10208 и продукцию ЕРА при 1/500× (0,0015 мг/л) и 0× (0 мг/л витамина В12). Было проведено четыре последовательных эксперимента по сравнению эффектов 1/500× и 0× витамина В12.

Результаты.

(Для 5× --> 1/500× витамин В12): для семи последовательных девятидневных экспериментов, сухой массы, %ЕРА, %ДНА, % жира и выход ЕРА для РАТ-10208 не изменился при изменении концентрации витамина В12 от 5× (3,84 мг/л) до 1/500× (0,0015 мг/л).

(Для 1/500× и 0× витамин В12): результаты на протяжении курса четырех последовательных девятидневных экспериментов показали, что РТА-10208, выращенный в DSDFM-O, содержащей 0 мг/л ви-

тамина В12, имел значительно более высокий % EPA по сравнению с выращенным в присутствии только 1/500× (0,0015 мг/л) витамина В12. Хотя % EPA увеличился от примерно 18% в присутствии 1/500× (0,0015 мг/л) витамина В12 до примерно 27% без какого-либо витамина В12, % DHA снизился от примерно 45% в присутствии 1/500× (0,0015 мг/л) витамина В12 до примерно 36% без какого-либо витамина В12. Сухой массы и % жира РТА-10208 увеличивались незначительно, если витамина В12 полностью удаляли из DSDFM-O. В результате увеличения в % EPA и незначительного увеличения в сухой массе и % жира, выход EPA РТА-10208 увеличился примерно на 60%, если витамина В12 удаляли из DSDFM-O.

Результаты также показаны на фиг. 20-49 и в приведенных ниже таблицах.

Эксперимен

т

Серия	ОБРАЗЕЦ	О.Д. инку- лята при 600нм	Вит. В12 мг/л	рН	Тара (г)	Выход по массе (г)	Сухая масса осадка (г)	Био- масса г/л	
A	5x (1)		3,84	6,8 0	10,475 7	10,723	0,2473	4,95	
	5x (2)		3,84	6,8 0	10,453 4	10,689	0,2356	4,71	
	1x (1)		0,77	6,8 0	10,514 2	10,744 9	0,2307	4,61	
	1x (2)		0,77	6,8 1	10,431	10,651 2	0,2202	4,40	
	1/2x (1)		0,38	6,8 2	10,568 4	10,788 2	0,2198	4,40	
	1/2x (2)		0,38	6,8 2	10,637 3	10,869 1	0,2318	4,64	
	1/5x (1)		0,15	6,8 1	10,504 4	10,734 8	0,2304	4,61	
	1/5x (2)		0,15	6,8 2	10,521 9	10,747	0,2251	4,50	
	1/10x (1)		0,077	6,8 3	10,522 1	10,748 1	0,226	4,52	
	1/10x (2)		0,077	6,8 3	10,470 5	10,697 9	0,2274	4,55	
	1/20x (1)		0,038	6,8 3	10,474 3	10,698 8	0,2245	4,49	
	1/20x (2)		0,038	6,8 3	10,732 2	10,964 6	0,2324	4,65	
	1/50x (1)		0,015	6,8 4	10,477 7	10,694 5	0,2168	4,34	
	1/50x (2)		0,015	6,8 5	10,476 6	10,701 8	0,2252	4,50	
	1/100x (1)		0,0077	6,8 4	10,454 3	10,686 3	0,232	4,64	
	1/100x (2)		0,0077	6,8 5	10,504 1	10,745 2	0,2411	4,82	
	1/500x (1)		0,0015	6,8 6	10,515 2	10,756 3	0,2411	4,82	
	1/500x (2)		0,0015	6,8 5	10,574 5	10,808 1	0,2341	4,68	
	B	5x (1)	4,0445	3,84	6,6 3	10,502 1	10,733 8	0,2317	4,63
		5x (2)	4,0445	3,84	6,6 5	10,473 5	10,715 2	0,2417	4,83
1x (1)		4,3024	0,77	6,6 4	10,501 1	10,739 4	0,2383	4,77	
1x (2)		4,3024	0,77	6,6 5	10,400 4	10,636 2	0,2358	4,72	
1/2x (1)		4,1648	0,38	6,6 4	10,459 9	10,71	0,2501	5,00	
1/2x (2)		4,1648	0,38	6,6 4	10,563 0	10,804	0,241	4,82	
1/5x (1)		4,1600	0,15	6,6 3	10,652 1	10,889	0,2369	4,74	
1/5x (2)		4,1600	0,15	6,6	10,503	10,734	0,2309	4,62	

034980

	1/10x (1)	4,4997	0,077	6,6 5	3 2	10,472 6	10,699 8	0,2272	4,54
	1/10x (2)	4,4997	0,077	6,6 4	2 1	10,484 1	10,727 9	0,2438	4,88
	1/20x (1)	4,9716	0,038	6,6 4	2 5	10,378 5	10,611 2	0,2327	4,65
	1/20x (2)	4,9716	0,038	6,6 4	2 2	10,383 2	10,615 4	0,2322	4,64
	1/50x (1)	4,3049	0,015	6,6 5	2 2	10,378 2	10,612	0,2338	4,68
	1/50x (2)	4,3049	0,015	6,6 5	6 6	10,554 6	10,787 7	0,2331	4,66
	1/100x (1)	4,6035	0,0077	6,6 5	8 8	10,485 8	10,717 2	0,2314	4,63
	1/100x (2)	4,6035	0,0077	6,6 6	1 1	10,477 1	10,712 2	0,2351	4,70
	1/500x (1)	4,4494	0,0015	6,6 5	3 3	10,608 3	10,816 3	0,208	4,16
	1/500x (2)	4,4494	0,0015	6,6 5	2 2	10,572 2	10,789 6	0,2174	4,35
C	5x (1)	4,1784	3,84	6,7 7	2 2	10,484 2	10,723 7	0,2395	4,79
	5x (2)	4,1784	3,84	6,8 0	1 1	10,526 1	10,755 3	0,2292	4,58
	1x (1)	4,2842	0,77	6,8 0	5 5	10,378 5	10,619 4	0,2409	4,82
	1x (2)	4,2842	0,77	6,7 7	3 3	10,608 3	10,845 9	0,2376	4,75
	1/2x (1)	4,8865	0,38	6,8 1	4 4	10,527 4	10,718 3	0,1909	3,82
	1/2x (2)	4,8865	0,38	6,8 1	3 3	10,471 3	10,685 3	0,214	4,28
	1/5x (1)	4,5411	0,15	6,8 1	1 1	10,383 1	10,599 7	0,2166	4,33
	1/5x (2)	4,5411	0,15	6,8 4	4 4	10,544 4	10,766 6	0,2222	4,44
	1/10x (1)	5,2960	0,077	6,8 0	1 1	10,501 1	10,718 1	0,2171	4,34
	1/10x (2)	5,2960	0,077	6,8 2	3 3	10,378 3	10,597 8	0,2195	4,39
	1/20x (1)	5,2480	0,038	6,8 2	1 1	10,452 1	10,653 9	0,2018	4,04
	1/20x (2)	5,2480	0,038	6,8 3	8 8	10,401 8	10,588 1	0,1863	3,73
	1/50x (1)	5,6680	0,015	6,8 2	9 9	10,504 9	10,724 8	0,2199	4,40
	1/50x (2)	5,6680	0,015	6,8 3	7 7	10,419 7	10,644 1	0,2244	4,49
	1/100x (1)	4,9024	0,0077	6,8 3	1 1	10,553 1	10,784 7	0,2316	4,63

034980

	1/100x (2)	4,9024	0,0077	6,8 3	10,709 8	10,941 2	0,2314	4,63	
	1/500x (1)	4,6011	0,0015	6,8 3	10,554 3	10,794 2	0,2399	4,80	
	1/500x (2)	4,6011	0,0015	6,8 3	10,338 2	10,574 6	0,2364	4,73	
D	5x (1)	4,3297	3,84	6,8 5	10,341 5	10,597 6	0,2561	5,12	
	5x (2)	4,3297	3,84	6,8 5	10,454 9	10,698	0,2431	4,86	
	1x (1)	5,3731	0,77	6,8 5	10,378 5	10,614 3	0,2358	4,72	
	1x (2)	5,3731	0,77	6,8 5	10,611 7	10,840 1	0,2284	4,57	
	1/2x (1)	4,9040	0,38	6,8 5	10,431 8	10,657 3	0,2255	4,51	
	1/2x (2)	4,9040	0,38	6,8 5	10,657 2	10,874 2	0,217	4,34	
	1/5x (1)	4,7084	0,15	6,8 5	10,552	10,779 1	0,2271	4,54	
	1/5x (2)	4,7084	0,15	6,8 5	10,711 8	10,962 3	0,2505	5,01	
	1/10x (1)	4,9843	0,077	6,8 5	10,617 4	10,858 9	0,2415	4,83	
	1/10x (2)	4,9843	0,077	6,8 6	10,522 9	10,761 4	0,2385	4,77	
	1/20x (1)	4,7533	0,038	6,8 4	10,504 5	10,744 6	0,2401	4,80	
	1/20x (2)	4,7533	0,038	6,8 4	10,504 9	10,728 1	0,2232	4,46	
	1/50x (1)	4,3732	0,015	6,8 6	10,516 1	10,756 6	0,2405	4,81	
	1/50x (2)	4,3732	0,015	6,8 5	10,523 4	10,757 4	0,234	4,68	
	1/100x (1)	4,0902	0,0077	6,8 6	10,485 8	10,719 3	0,2335	4,67	
	1/100x (2)	4,0902	0,0077	6,8 6	10,552 3	10,785 6	0,2333	4,67	
	1/500x (1)	4,2472	0,0015	6,8 6	10,553	10,803 2	0,2502	5,00	
	1/500x (2)	4,2472	0,0015	6,8 6	10,448 8	10,697 6	0,2488	4,98	
	E	5x (1)	4,5635	3,84	6,7 9	10,361 3	10,610 3	0,249	4,98
		5x (2)	4,5635	3,84	6,8 0	10,531 1	10,754 6	0,2235	4,47
1x (1)		4,2673	0,77	6,8 0	10,331 1	10,565 1	0,234	4,68	
1x (2)		4,2673	0,77	6,8 0	10,466	10,716 2	0,2502	5,00	

034980

	1/2x (1)	5,1989	0,38	6,7 9	10,679 6	10,905 4	0,2258	4,52
	1/2x (2)	5,1989	0,38	6,8 0	10,555 2	10,783 6	0,2284	4,57
	1/5x (1)	5,0275	0,15	6,8 0	10,487 7	10,721	0,2333	4,67
	1/5x (2)	5,0275	0,15	6,8 0	10,506 1	10,733 1	0,227	4,54
	1/10x (1)	5,6680	0,077	6,8 1	10,358 5	10,594 6	0,2361	4,72
	1/10x (2)	5,6680	0,077	6,8 0	10,680 7	10,911 6	0,2309	4,62
	1/20x (1)	5,2891	0,038	6,8 1	10,366 4	10,614 3	0,2479	4,96
	1/20x (2)	5,2891	0,038	6,8 1	10,374 5	10,625 3	0,2508	5,02
	1/50x (1)	5,0356	0,015	6,8 1	10,428 5	10,682	0,2535	5,07
	1/50x (2)	5,0356	0,015	6,8 0	10,402 2	10,652 4	0,2502	5,00
	1/100x (1)	5,7271	0,0077	6,8 1	10,333 2	10,593 7	0,2605	5,21
	1/100x (2)	5,7271	0,0077	6,8 1	10,525	10,778 2	0,2532	5,06
	1/500x (1)	5,1000	0,0015	6,8 1	10,419 2	10,678 5	0,2593	5,19
	1/500x (2)	5,1000	0,0015	6,8 1	10,399 1	10,666 8	0,2677	5,70
F	5x (1)	4,5635	3,84	6,7 5	10,524	10,769 6	0,2456	5,23
	5x (2)	4,5635	3,84	6,7 5	10,329 1	10,572 9	0,2438	4,88
	1x (1)	4,2673	0,77	6,7 5	10,492 7	10,742 4	0,2497	4,99
	1x (2)	4,2673	0,77	6,7 6	10,525 7	10,765 2	0,2395	4,79
	1/2x (1)	5,1989	0,38	6,7 5	10,463	10,690 8	0,2278	4,56
	1/2x (2)	5,1989	0,38	6,7 6	10,375 6	10,600 3	0,2247	4,49
	1/5x (1)	5,0275	0,15	6,7 6	10,421 2	10,670 4	0,2492	4,98
	1/5x (2)	5,0275	0,15	6,7 6	10,506 1	10,750 9	0,2448	4,90
	1/10x (1)	5,6680	0,077	6,7 6	10,382 9	10,606 2	0,2233	4,47
	1/10x (2)	5,6680	0,077	6,7 6	10,365 1	10,606 8	0,2417	4,83
	1/20x (1)	5,2891	0,038	6,7 5	10,509 6	10,744 2	0,2346	4,69
	1/20x (2)	5,2891	0,038	6,7	10,387	10,622	0,2351	4,70

034980

	1/50x (1)	5,0356	0,015	6,7 8	5 10,358 4	6 10,606 3	0,2479	4,96
	1/50x (2)	5,0356	0,015	6,7 6	5 10,523 5	6 10,767 1	0,2436	4,87
	1/100x (1)	5,7271	0,0077	6,7 7	5 10,366 4	6 10,614 8	0,2484	4,97
	1/100x (2)	5,7271	0,0077	6,7 8	5 10,505 5	6 10,744 1	0,2386	4,77
	1/500x (1)	5,1000	0,0015	6,7 9	5 10,332 2	6 10,586 8	0,2546	5,09
	1/500x (2)	5,1000	0,0015	6,8 0	5 10,327 9	6 10,591	0,2631	5,26
G	5x (1)	3,7017	3,84	6,8 3	5 10,362	6 10,607 7	0,2457	4,91
	5x (2)	3,7017	3,84	6,8 2	5 10,359 5	6 10,614 5	0,255	5,10
	1x (1)	4,2905	0,77	6,8 4	5 10,364 8	6 10,615 1	0,2503	5,01
	1x (2)	4,2905	0,77	6,8 5	5 10,335 6	6 10,597 2	0,2616	5,23
	1/2x (1)	4,4548	0,38	6,8 4	5 10,509 6	6 10,768 3	0,2587	5,17
	1/2x (2)	4,4508	0,38	6,8 4	5 10,435	6 10,688 9	0,2539	5,08
	1/5x (1)	4,6844	0,15	6,8 4	5 10,330 5	6 10,586 8	0,2563	5,13
	1/5x (2)	4,6844	0,15	6,8 5	5 10,496 4	6 10,747 6	0,2512	5,02
	1/10x (1)	5,8389	0,077	6,8 5	5 10,363 7	6 10,617 3	0,2536	5,07
	1/10x (2)	5,8389	0,077	6,8 5	5 10,335 1	6 10,588 1	0,253	5,06
	1/20x (1)	4,4483	0,038	6,8 5	5 10,439 3	6 10,695 8	0,2565	5,13
	1/20x (2)	4,4483	0,038	6,8 6	5 10,379 8	6 10,641 6	0,2618	5,24
	1/50x (1)	3,9821	0,015	6,8 6	5 10,361 9	6 10,619	0,2571	5,14
	1/50x (2)	3,9821	0,015	6,8 7	5 10,517 9	6 10,772 1	0,2542	5,08
	1/100x (1)	5,0043	0,0077	6,8 7	5 10,475 6	6 10,728 8	0,2532	5,06
	1/100x (2)	5,0043	0,0077	6,8 7	5 10,499 3	6 10,756 1	0,2568	5,14
	1/500x (1)	5,0108	0,0015	6,8 8	5 10,434	6 10,694 1	0,2601	5,20
	1/500x (2)	5,0108	0,0015	6,8 7	5 10,389 6	6 10,644 6	0,255	5,10
H	1/500x (1)	4,6921	0,0015	6,8 5	5 10,359 9	6 10,595 4	0,2355	4,71

034980

	1/500x (2)	4,6921	0,0015	6,8 5	10,372 0	10,625 4	0,2534	5,07
	0x (1)	4,8144	0,0000	6,8 5	10,362 4	10,605 2	0,2428	4,86
	0x (2)	4,8144	0,0000	6,8 6	10,358 5	10,609 3	0,2508	5,02
I	1/500x (1)	4,7906	0,0015	6,8 9	10,549 2	10,792 0	0,2428	4,86
	1/500x (2)	4,7906	0,0015	6,9 0	10,595 8	10,850 8	0,255	5,10
	0x (1)	4,7063	0,0000	6,8 9	10,550 5	10,803 7	0,2532	5,06
	0x (2)	4,7063	0,0000	6,8 9	10,512 0	10,769 3	0,2573	5,15
J	1/500x (1)	5,8805	0,0015	6,9 9	10,543 3	10,808 9	0,2656	5,31
	1/500x (2)	5,8805	0,0015	7,0 0	10,597 4	10,871 4	0,274	5,48
	0x (1)	4,6385	0,0000	7,0 0	10,550 9	10,814 5	0,2636	5,27
	0x (2)	4,6385	0,0000	6,9 8	10,546 2	10,825 2	0,279	5,58
K	1/500x (1)	4,7133	0,0015	6,8 7	10,542 4	10,808 5	0,2661	5,32
	1/500x (2)	4,7133	0,0015	6,8 8	10,344 4	10,611 1	0,2667	5,33
	0x (1)	4,2141	0,0000	6,8 6	10,387 3	10,658 7	0,2714	5,43
	0x (2)	4,2141	0,0000	6,8 6	10,418 8	10,686 6	0,2678	5,36
Эксперимент		%	%	%	(n-6)	(n-3)	%	%
Серия	ОБРАЗЕЦ	16:0	ARA	ЕРА	DPA	DPA	DHA	Жиры
A	5x (1)	27,53	1,67	16,0 1	2,22	2,33	41,72	67,22
	5x (2)	27,65	1,71	16,0 2	2,16	2,41	41,17	66,07
	1x (1)	27,73	1,72	16,0 0	2,15	2,44	41,06	66,25
	1x (2)	27,72	1,75	16,3 2	2,10	2,48	40,46	65,42
	1/2x (1)	27,86	1,74	16,3 6	2,09	2,49	40,54	65,45
	1/2x (2)	27,73	1,77	16,5 3	2,14	2,32	40,93	66,57
	1/5x (1)	27,60	1,73	16,3 3	2,13	2,38	41,03	66,59
	1/5x (2)	27,88	1,74	15,9 4	2,17	2,43	41,04	66,28

034980

	1/10x (1)	27,87	1,75	16,2 8	2,09	2,56	40,66	65,14
	1/10x (2)	27,81	1,74	16,0 7	2,13	2,48	40,96	65,39
	1/20x (1)	27,70	1,75	16,3 6	2,08	2,52	40,53	65,64
	1/20x (2)	27,63	1,75	16,4 2	2,13	2,36	40,93	66,30
	1/50x (1)	27,83	1,76	16,6 1	2,07	2,43	40,60	66,02
	1/50x (2)	27,82	1,69	16,3 5	2,11	2,49	40,84	64,97
	1/100x (1)	27,50	1,72	16,1 3	2,16	2,50	41,19	66,21
	1/100x (2)	27,60	1,69	15,6 4	2,24	2,34	41,72	66,56
	1/500x (1)	27,58	1,70	15,6 3	2,24	2,28	41,74	66,99
	1/500x (2)	27,57	1,75	16,8 6	2,06	2,41	40,59	64,91
B	5x (1)	28,30	1,75	16,4 4	2,32	2,35	42,35	64,09
	5x (2)	28,45	1,74	15,9 6	2,36	2,36	42,62	62,46
	1x (1)	28,55	1,74	16,1 0	2,32	2,43	42,35	62,96
	1x (2)	28,47	1,78	16,3 3	2,33	2,44	42,26	63,13
	1/2x (1)	28,21	1,71	15,9 0	2,39	2,34	42,95	64,75
	1/2x (2)	28,15	1,75	16,6 5	2,29	2,33	42,32	63,50
	1/5x (1)	28,51	1,74	16,3 4	2,29	2,37	42,23	62,02
	1/5x (2)	28,43	1,75	16,3 5	2,29	2,48	42,24	63,88
	1/10x (1)	28,66	1,77	15,8 5	2,37	2,45	42,45	62,47
	1/10x (2)	28,52	1,74	15,7 4	2,40	2,39	42,70	63,14
	1/20x (1)	28,67	1,75	15,8 6	2,33	2,37	42,55	63,10
	1/20x (2)	28,36	1,75	16,1 3	2,35	2,26	42,62	63,90
	1/50x (1)	28,36	1,79	16,6 4	2,29	2,42	42,04	62,31
	1/50x (2)	28,43	1,77	15,9 2	2,40	2,42	42,57	62,77
	1/100x (1)	28,81	1,75	16,0 1	2,30	2,49	42,16	61,70
	1/100x (2)	28,61	1,73	15,9 3	2,35	2,40	42,51	63,60
	1/500x (1)	28,62	1,85	17,1 5	2,17	2,59	41,19	60,91

034980

	1/500x (2)	28,30	1,84	$\frac{17,3}{9}$	2,20	2,43	41,40	61,56
C	5x (1)	27,97	1,95	$\frac{16,0}{8}$	2,60	2,43	42,37	67,30
	5x (2)	28,24	1,96	$\frac{15,9}{9}$	2,55	2,54	42,02	66,72
	1x (1)	28,20	1,94	$\frac{15,9}{6}$	2,60	2,61	42,06	66,98
	1x (2)	28,10	1,98	$\frac{16,3}{9}$	2,54	2,64	41,73	66,30
	1/2x (1)	27,77	2,14	$\frac{17,6}{7}$	2,40	2,85	40,46	64,53
	1/2x (2)	27,84	2,10	$\frac{17,2}{7}$	2,50	2,62	40,85	65,79
	1/5x (1)	27,57	2,06	$\frac{17,3}{7}$	2,46	2,64	41,17	66,69
	1/5x (2)	27,71	2,05	$\frac{17,0}{5}$	2,50	2,70	41,31	65,86
	1/10x (1)	28,02	2,06	$\frac{16,8}{9}$	2,48	2,70	41,27	65,53
	1/10x (2)	27,66	2,05	$\frac{16,7}{6}$	2,55	2,64	41,66	65,85
	1/20x (1)	27,64	2,13	$\frac{17,2}{7}$	2,52	2,74	41,03	65,00
	1/20x (2)	27,56	2,19	$\frac{18,6}{2}$	2,27	2,88	39,82	64,23
	1/50x (1)	27,78	2,02	$\frac{16,9}{8}$	2,51	2,52	41,61	66,22
	1/50x (2)	27,82	2,01	$\frac{16,9}{2}$	2,53	2,65	41,47	65,85
	1/100x (1)	27,85	2,01	$\frac{16,7}{7}$	2,54	2,67	41,50	65,23
	1/100x (2)	27,91	2,01	$\frac{16,6}{1}$	2,58	2,59	41,72	66,87
	1/500x (1)	27,73	2,02	$\frac{17,4}{2}$	2,41	2,58	41,10	65,60
1/500x (2)	27,48	2,05	$\frac{17,9}{3}$	2,39	2,54	40,85	65,85	
D	5x (1)	27,80	1,85	$\frac{15,9}{7}$	2,59	2,32	42,99	67,08
	5x (2)	27,89	1,86	$\frac{16,2}{7}$	2,52	2,42	42,60	66,60
	1x (1)	27,60	1,92	$\frac{16,5}{9}$	2,54	2,53	42,42	66,32
	1x (2)	27,75	1,89	$\frac{16,4}{0}$	2,53	2,48	42,60	66,35
	1/2x (1)	27,35	1,98	$\frac{17,1}{9}$	2,52	2,53	41,97	65,19
	1/2x (2)	27,26	2,01	$\frac{17,6}{5}$	2,45	2,45	41,58	66,67
	1/5x (1)	27,42	1,97	$\frac{17,5}{3}$	2,42	2,55	41,72	66,69
	1/5x (2)	27,46	1,91	$\frac{16,6}{0}$	2,60	2,45	42,44	66,58

034980

	1/10x (1)	27,45	1,97	17,0 3	2,50	2,61	42,04	66,06
	1/10x (2)	27,45	1,90	16,6 6	2,52	2,46	42,46	66,91
	1/20x (1)	27,45	1,96	16,9 5	2,58	2,41	42,11	66,10
	1/20x (2)	27,30	2,00	17,9 4	2,42	2,45	41,50	65,30
	1/50x (1)	27,58	1,87	16,6 5	2,55	2,33	42,61	66,84
	1/50x (2)	27,69	1,89	16,8 5	2,50	2,44	42,27	65,40
	1/100x (1)	27,44	1,92	16,8 8	2,51	2,51	42,38	65,88
	1/100x (2)	27,47	1,92	16,6 7	2,58	2,43	42,56	65,83
	1/500x (1)	26,91	1,98	18,0 5	2,40	2,47	41,66	66,18
	1/500x (2)	27,03	1,99	18,0 8	2,40	2,36	41,69	65,80
E	5x (1)	27,46	1,89	16,0 2	2,60	2,30	43,33	66,12
	5x (2)	27,86	1,93	16,0 5	2,50	2,38	43,02	63,64
	1x (1)	27,75	1,95	15,9 1	2,58	2,39	43,09	65,41
	1x (2)	27,51	1,94	15,5 9	2,72	2,29	43,52	67,35
	1/2x (1)	27,07	2,04	16,9 9	2,52	2,42	42,64	65,01
	1/2x (2)	26,86	2,05	17,2 3	2,48	2,35	42,59	65,00
	1/5x (1)	27,05	1,96	16,6 5	2,55	2,29	43,21	65,66
	1/5x (2)	27,12	1,98	16,6 9	2,52	2,41	43,08	63,58
	1/10x (1)	27,35	1,95	16,4 5	2,55	2,48	42,94	64,34
	1/10x (2)	27,31	1,92	16,2 2	2,60	2,41	43,24	64,49
	1/20x (1)	26,72	1,93	16,7 3	2,64	2,31	43,21	65,83
	1/20x (2)	26,47	1,94	17,1 1	2,65	2,21	43,14	66,13
	1/50x (1)	26,63	1,86	16,3 0	2,72	2,19	43,84	65,30
	1/50x (2)	26,68	1,86	16,3 3	2,69	2,26	43,76	65,67
	1/100x (1)	26,47	1,87	16,3 9	2,69	2,28	43,89	63,98
	1/100x (2)	26,45	1,89	16,7 8	2,62	2,38	43,49	65,21
	1/500x (1)	26,06	1,88	17,1 3	2,60	2,23	43,73	66,13

034980

	1/500x (2)	25,95	1,88	17,5 8	2,57	2,10	43,40	65,46
F	5x (1)	25,71	1,96	17,5 0	2,46	2,34	43,56	65,46
	5x (2)	25,91	1,93	17,2 6	2,47	2,38	43,73	65,71
	1x (1)	25,93	1,90	16,7 0	2,54	2,43	43,93	66,05
	1x (2)	26,03	1,94	17,1 7	2,48	2,39	43,41	65,34
	1/2x (1)	25,76	2,03	18,1 1	2,43	2,38	42,76	65,27
	1/2x (2)	25,74	2,05	18,5 2	2,37	2,31	42,52	65,75
	1/5x (1)	25,44	1,95	17,6 2	2,49	2,27	43,73	65,80
	1/5x (2)	25,41	1,94	17,3 5	2,52	2,32	43,99	65,88
	1/10x (1)	26,13	2,04	18,0 6	2,36	2,55	42,43	64,10
	1/10x (2)	25,62	1,98	17,5 3	2,48	2,44	43,52	65,51
	1/20x (1)	25,77	2,01	17,9 7	2,45	2,34	42,94	65,21
	1/20x (2)	25,55	2,03	18,4 5	2,42	2,24	42,78	66,05
	1/50x (1)	25,26	1,96	17,5 4	2,55	2,18	44,07	66,41
	1/50x (2)	25,48	1,95	17,5 8	2,50	2,30	43,72	65,93
	1/100x (1)	25,50	1,93	17,0 0	2,62	2,23	44,36	65,37
	1/100x (2)	25,59	1,96	17,3 7	2,56	2,26	43,80	65,18
	1/500x (1)	25,54	1,99	18,1 1	2,45	2,20	43,08	65,05
1/500x (2)	25,55	2,00	18,5 9	2,36	2,18	42,66	64,57	
G	5x (1)	25,74	1,95	17,5 8	2,37	2,08	43,04	63,68
	5x (2)	25,79	1,89	16,8 3	2,51	2,04	43,69	63,67
	1x (1)	26,01	1,90	16,6 9	2,52	2,08	43,42	64,95
	1x (2)	25,71	1,91	16,7 4	2,57	1,98	43,85	65,37
	1/2x (1)	25,47	1,93	17,1 4	2,52	1,97	43,69	64,28
	1/2x (2)	25,68	1,95	17,8 0	2,42	1,94	42,76	64,15
	1/5x (1)	25,63	1,94	17,4 3	2,46	2,02	43,21	63,70
	1/5x (2)	25,86	1,91	17,0 3	2,47	2,04	43,16	64,14

034980

	1/10x (1)	26,34	1,95	17,0 9	2,48	2,14	42,35	63,27
	1/10x (2)	26,24	1,93	16,7 9	2,52	2,04	42,93	64,71
	1/20x (1)	25,47	1,97	18,0 6	2,37	2,12	42,62	63,38
	1/20x (2)	25,38	1,98	18,1 6	2,40	1,95	42,73	62,81
	1/50x (1)	25,46	1,94	18,0 6	2,37	2,02	42,72	63,38
	1/50x (2)	25,50	1,94	17,4 6	2,46	2,04	43,15	63,66
	1/100x (1)	25,52	1,92	16,6 9	2,60	1,81	44,16	65,74
	1/100x (2)	25,96	1,92	17,1 1	2,48	1,96	43,00	63,89
	1/500x (1)	25,71	1,95	17,7 8	2,41	1,97	42,83	64,61
	1/500x (2)	25,56	2,02	18,2 5	2,37	1,90	42,63	64,80
H	1/500x (1)	25,19	2,03	19,3 6	2,14	2,02	41,86	65,21
	1/500x (2)	25,41	1,94	17,8 5	2,37	1,83	43,31	65,75
	0x (1)	21,45	2,62	27,5 4	1,31	2,50	35,78	67,83
	0x (2)	21,79	2,63	27,3 3	1,30	2,51	35,66	67,07
I	1/500x (1)	25,21	2,02	19,8 9	2,15	2,10	41,48	64,17
	1/500x (2)	25,00	2,02	20,0 0	2,11	2,09	41,63	64,04
	0x (1)	21,82	2,62	28,5 5	1,20	2,61	34,16	67,22
	0x (2)	21,66	2,64	28,8 3	1,18	2,55	34,20	66,93
J	1/500x (1)	24,44	1,81	16,7 5	2,49	2,22	45,20	63,43
	1/500x (2)	24,34	1,82	17,7 3	2,39	1,95	44,71	63,88
	0x (1)	21,56	2,58	26,9 6	1,30	2,60	36,04	66,74
	0x (2)	21,53	2,61	27,3 0	1,31	2,43	35,96	65,71
K	1/500x (1)	23,87	1,82	17,3 3	2,46	2,00	45,45	64,67
	1/500x (2)	24,07	1,82	17,6 7	2,42	1,93	45,06	64,30
	0x (1)	21,77	2,63	26,1 3	1,39	2,81	36,49	66,14
	0x (2)	21,91	2,63	27,1 9	1,29	2,63	35,60	66,81

Эксперимент	(г/л)	(г/л)	(г/л)	(г/л)	(г/л)	г В12/	г/л	
Серия	ОБРАЗЕЦ	Выход ЕРА	мг/г ЕРА	Выход ДНА	мг/г ДНА	LFDW	г LFDW	Жиры
А	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
	1/500x (2)	0,51	109,46	1,23	274,01	1,64	0,00000091	3,04
В	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	101,36	1,24	269,37	1,80	0,000083	2,94
	1/5x (2)	0,48	104,41	1,25	277,49	1,67	0,000090	2,95
	1/10x (1)	0,45	98,98	1,20	272,75	1,71	0,000045	2,84
	1/10x (2)	0,48	99,38	1,31	277,29	1,80	0,000043	3,08
	1/20x (1)	0,47	100,10	1,25	276,16	1,72	0,000022	2,94
	1/20x (2)	0,48	103,06	1,26	280,15	1,68	0,000023	2,97
	1/50x (1)	0,48	103,67	1,22	269,42	1,76	0,0000085	2,91
	1/50x (2)	0,47	99,90	1,25	274,84	1,74	0,0000086	2,93
	1/100x (1)	0,46	98,77	1,20	267,53	1,77	0,0000043	2,86
	1/100x (2)	0,48	101,29	1,27	278,11	1,71	0,0000045	2,99
	1/500x (1)	0,43	104,49	1,04	258,03	1,63	0,00000092	2,53
	1/500x (2)	0,47	107,03	1,11	262,14	1,67	0,00000090	2,68
С	5x (1)	0,52	108,25	1,37	292,82	1,57	0,0025	3,22
	5x (2)	0,49	106,70	1,29	287,91	1,53	0,0025	3,06
	1x (1)	0,51	106,88	1,36	289,31	1,59	0,00048	3,23
	1x (2)	0,52	108,67	1,31	284,09	1,60	0,00048	3,15
	1/2x (1)	0,44	114,02	1,00	268,13	1,35	0,00028	2,46
	1/2x (2)	0,49	113,61	1,15	275,95	1,46	0,00026	2,82
	1/5x (1)	0,50	115,85	1,19	281,94	1,44	0,00010	2,89
	1/5x (2)	0,50	112,29	1,21	279,43	1,52	0,00010	2,93
	1/10x (1)	0,48	110,70	1,17	277,71	1,50	0,000051	2,85
	1/10x (2)	0,48	110,39	1,20	281,73	1,50	0,000051	2,89
	1/20x (1)	0,45	112,23	1,08	273,88	1,41	0,000027	2,62
	1/20x (2)	0,45	119,57	0,95	262,65	1,33	0,000029	2,39
	1/50x (1)	0,49	112,42	1,21	282,97	1,49	0,000010	2,91

034980

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

	1/50x (1)	0,58	116,45	1,45	299,69	1,67	0,00000901	3,29
	1/50x (2)	0,56	115,90	1,40	295,17	1,66	0,00000904	3,21
	1/100x (1)	0,55	111,13	1,44	296,95	1,72	0,00000448	3,25
	1/100x (2)	0,54	113,25	1,36	292,35	1,66	0,00000463	3,11
	1/500x (1)	0,60	117,81	1,43	286,97	1,78	0,00000084	3,31
	1/500x (2)	0,63	120,03	1,45	282,05	1,86	0,00000080	3,40
G	5x (1)	0,55	111,96	1,35	279,27	1,78	0,00215168	3,13
	5x (2)	0,55	107,14	1,42	283,43	1,85	0,00207251	3,25
	1x (1)	0,54	108,42	1,41	287,31	1,75	0,00043883	3,25
	1x (2)	0,57	109,44	1,50	292,04	1,81	0,00042495	3,42
	1/2x (1)	0,57	110,17	1,45	286,10	1,85	0,00020558	3,33
	1/2x (2)	0,58	114,19	1,39	279,49	1,82	0,00020874	3,26
	1/5x (1)	0,57	111,03	1,41	280,46	1,86	0,00008062	3,27
	1/5x (2)	0,55	109,25	1,39	282,05	1,80	0,00008326	3,22
	1/10x (1)	0,55	108,14	1,36	273,02	1,86	0,00004134	3,21
	1/10x (2)	0,55	108,66	1,41	283,05	1,79	0,00004313	3,27
	1/20x (1)	0,59	114,48	1,39	275,22	1,88	0,00002023	3,25
	1/20x (2)	0,60	114,04	1,41	273,40	1,95	0,00001951	3,29
	1/50x (1)	0,59	114,46	1,39	275,82	1,88	0,00000797	3,26
	1/50x (2)	0,57	111,16	1,40	279,89	1,85	0,00000812	3,24
	1/100x (1)	0,56	109,75	1,47	295,79	1,73	0,00000444	3,33
	1/100x (2)	0,56	109,31	1,41	279,92	1,85	0,00000415	3,28
	1/500x (1)	0,60	114,86	1,44	281,92	1,84	0,00000081	3,36
1/500x (2)	0,60	118,27	1,41	281,47	1,79	0,00000084	3,31	
H	1/500x (1)	0,59	126,25	1,29	279,17	1,64	0,00000092	3,07
	1/500x (2)	0,59	117,35	1,44	291,28	1,74	0,00000086	3,33
	0x (1)	0,91	186,81	1,18	248,20	1,56	0,00000000	3,29
	0x (2)	0,92	183,32	1,20	244,63	1,65	0,00000000	3,36
I	1/500x (1)	0,62	127,64	1,29	272,24	1,74	0,00000086	3,12
	1/500x (2)	0,65	128,06	1,36	272,66	1,83	0,00000082	3,27
	0x (1)	0,97	191,93	1,16	234,87	1,66	0,00000000	3,40
	0x (2)	0,99	192,97	1,18	234,10	1,70	0,00000000	3,44
J	1/500x (1)	0,56	106,22	1,52	292,66	1,94	0,00000077	3,37
	1/500x (2)	0,62	113,25	1,57	291,57	1,98	0,00000076	3,50
	0x (1)	0,95	179,92	1,27	245,50	1,75	0,00000000	3,52
	0x (2)	1,00	179,38	1,32	241,17	1,91	0,00000000	3,67
K	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	3,58

Заключение. Рост РГА-10208 и выход EPA не изменялись при изменении концентрации витамина B12 от 5x (3,84 мг/л) до 1/500x (0,0015 мг/л) в DSDFM-O при 10% CO₂. Однако если витамин B12 полностью удаляли из DSDFM-O, то % EPA увеличивался примерно на 50%, тогда сухая масса и % жира также слабо увеличивались, что приводило к 60%-ному увеличению в выходе EPA.

Все различные аспекты, воплощения и варианты, описанные в настоящем документе, могут быть объединены в любые и во все вариации.

Все публикации, патенты и патентные заявки, упомянутые в данном описании, включены в настоящий документ путем отсылки в той же степени, как если бы было конкретно и индивидуально указано, что каждая индивидуальная публикация, патент и патентная заявка включены путем отсылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ увеличения содержания эйкозапентаеновой кислоты (EPA) в биомассе микроорганизма, содержащей жирные кислоты, включая EPA, включающий:

- (а) культивирование микроорганизма в ферментере для получения биомассы; и
- (б) обеспечение давления в ферментере, которое превышает атмосферное давление на 0,5 psi в течение вплоть до 120 ч для увеличения содержания EPA в биомассе, где микроорганизм относится к порядку Thraustochytriales.

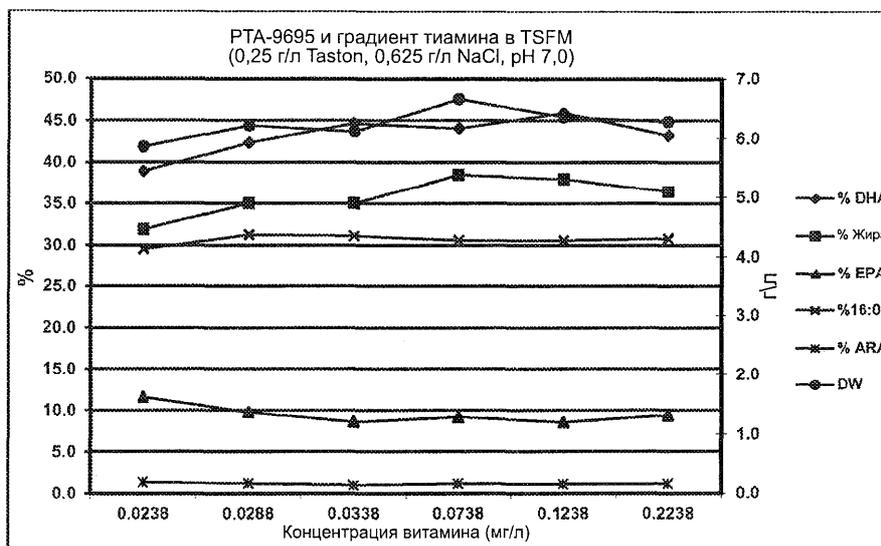
2. Способ по п.1, в котором давление в ферментере равно от примерно 0,4 psi вплоть до примерно 30 psi.

3. Способ по п.2, в котором давление напора в ферментере равно от примерно 1 вплоть до примерно 30 psi.

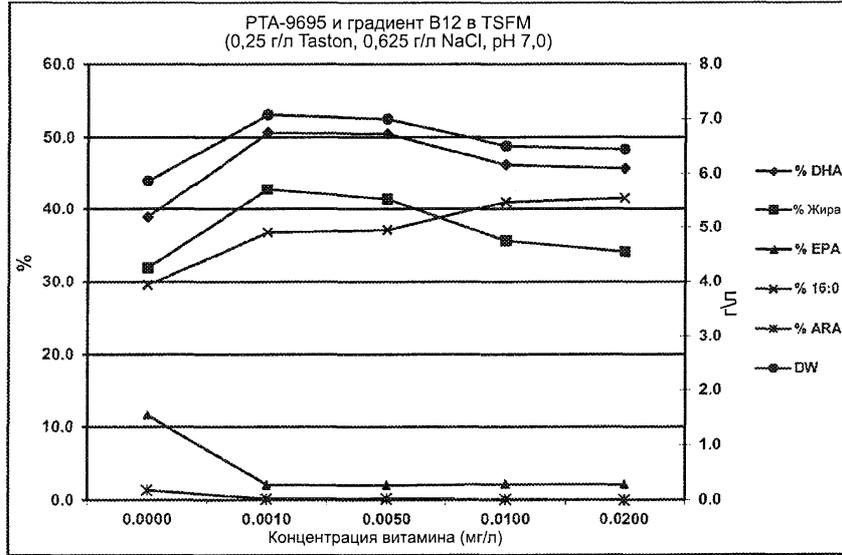
4. Способ по п.3, в котором давление напора в ферментере равно от примерно 1 вплоть до примерно 20 psi.

5. Способ по п.1, в котором биомасса имеет плотность выше чем или равную 10 г/л.

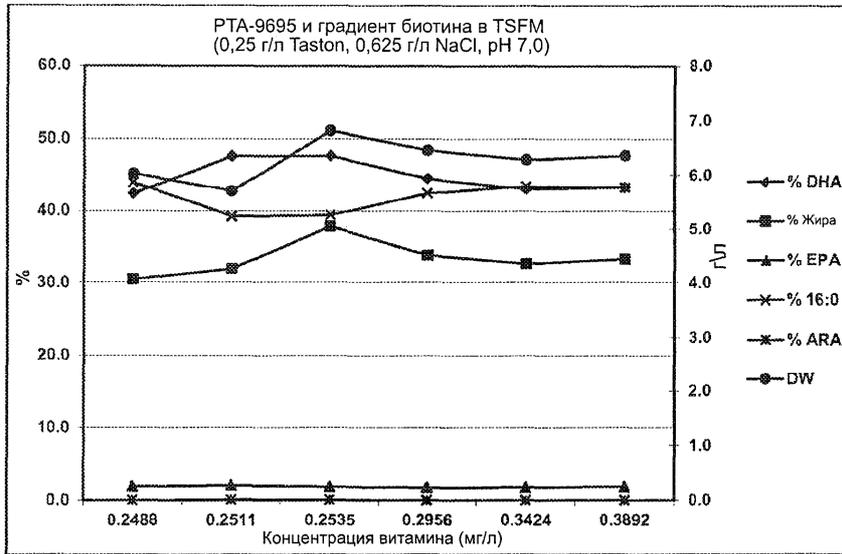
6. Способ по п.5, в котором биомасса имеет плотность от примерно 10 г/л вплоть до примерно 250 г/л.
7. Биомасса, полученная способом по любому из пп.1-6, предназначенная для использования в пищевом продукте.
8. Биомасса, полученная способом по любому из пп.1-6, предназначенная для использования в корме для животного.
9. Масло, экстрагированное из биомассы по п.7, которая является биомассой микроорганизма *Schizochytrium* sp. ATCC PTA-10208, где масло содержит жирные кислоты, в том числе омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты, включающие докозагексаеновую кислоту (DHA) и EPA в количестве примерно ≥ 90 мас.% от общего количества омега-3 полиненасыщенных жирных кислот, причем количество EPA по массе равно от примерно 6% вплоть до примерно 65% от общего количества EPA и DHA.
10. Масло по п.9, в котором количество EPA по массе равно от примерно 6% вплоть до примерно 28% от общего количества EPA и DHA.
11. Масло по п.9, в котором количество EPA по массе равно от примерно 36% вплоть до примерно 65% от общего количества EPA и DHA.
12. Масло по п.9, в котором количество EPA по массе равно от примерно 28% до примерно 36% от общего количества EPA и DHA.
13. Масло, экстрагированное из биомассы по п.7, которая является биомассой микроорганизма *Thraustochytrium* sp. ATCC PTA-10212, где масло содержит жирные кислоты, в том числе DHA и EPA, причем количество EPA по массе равно от примерно 15 вплоть до примерно 70% от общей массы EPA и DHA.
14. Масло, экстрагированное из биомассы по п.7, которая является биомассой микроорганизма *Schizochytrium* sp. ATCC PTA-9695, где масло содержит жирные кислоты, в том числе омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты, включающие DHA и EPA в количестве от примерно 50 до примерно 70 мас.% от общего количества омега-3 полиненасыщенных жирных кислот, причем количество EPA по массе равно от примерно 5% вплоть до примерно 60% от общего количества EPA и DHA.
15. Масло по п.14, в котором DHA и EPA содержатся в количестве, равном примерно 60% от общего количества омега-3 жирных кислот.
16. Способ получения масла, включающий получение биомассы по любому из пп.1-6 и экстрагирование масла из биомассы.



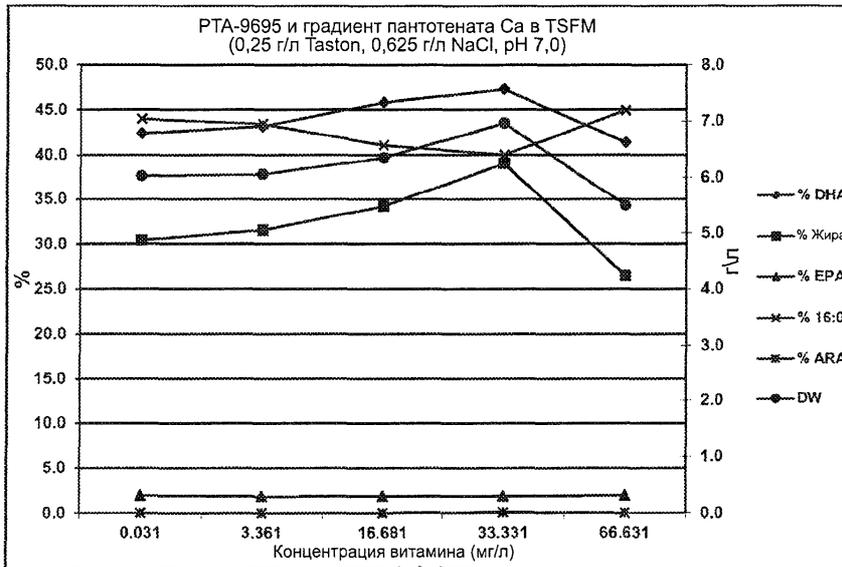
Фиг. 1



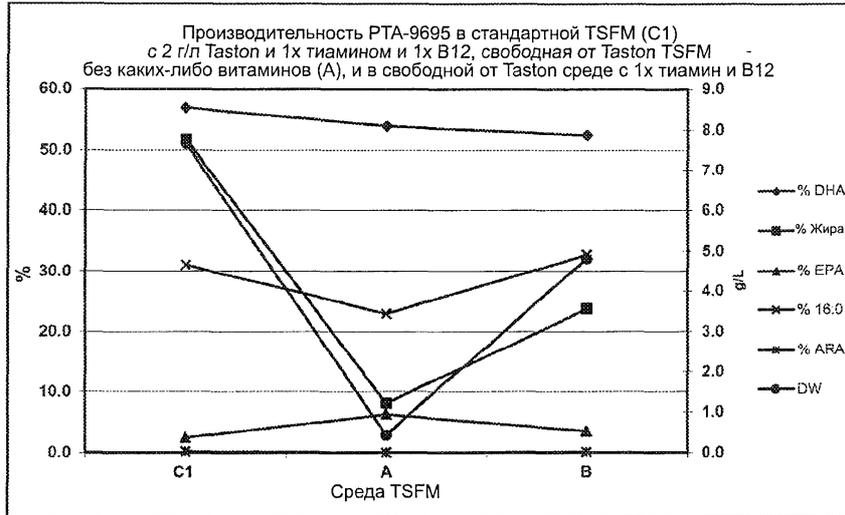
Фиг. 2



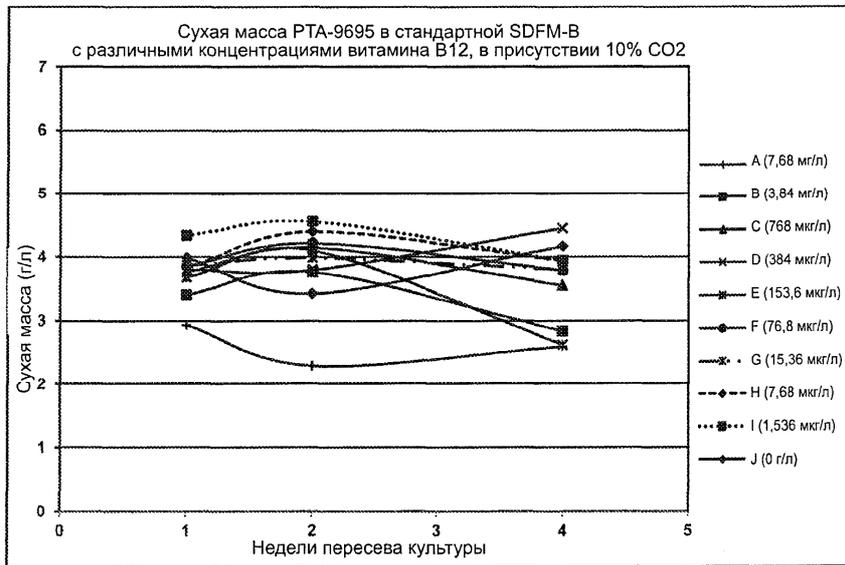
Фиг. 3



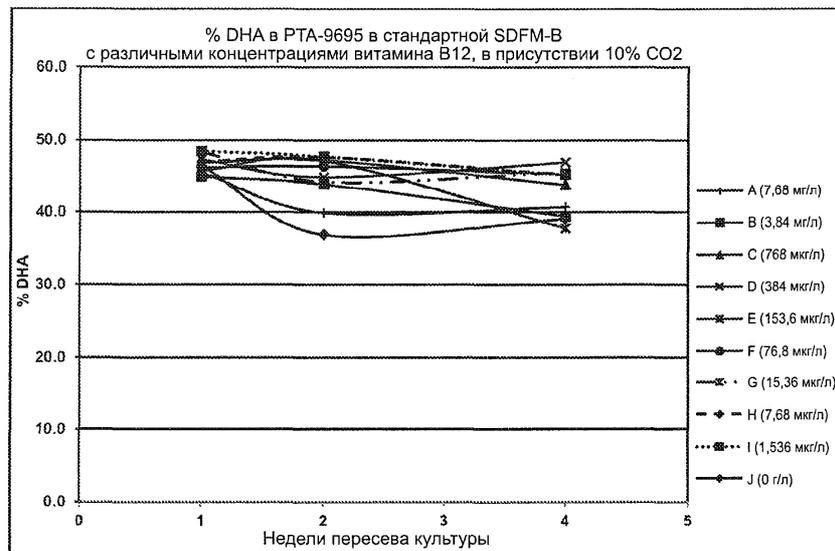
Фиг. 4



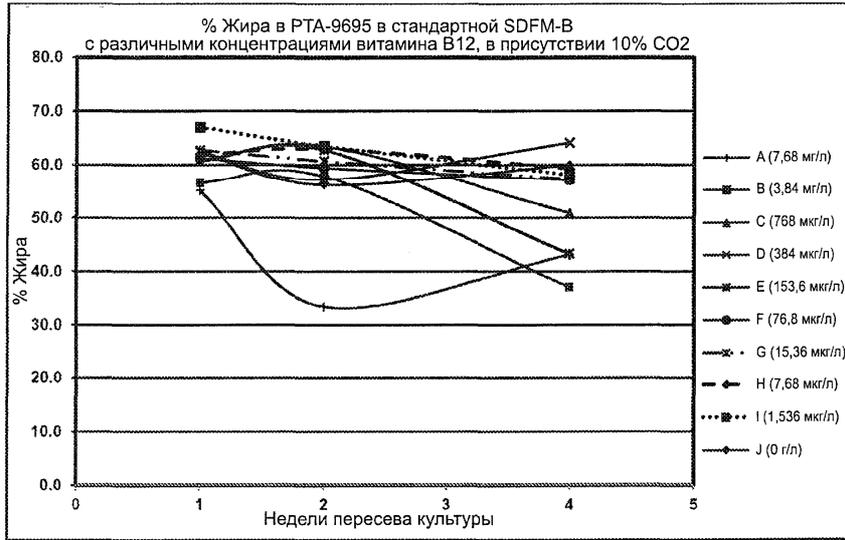
Фиг. 5



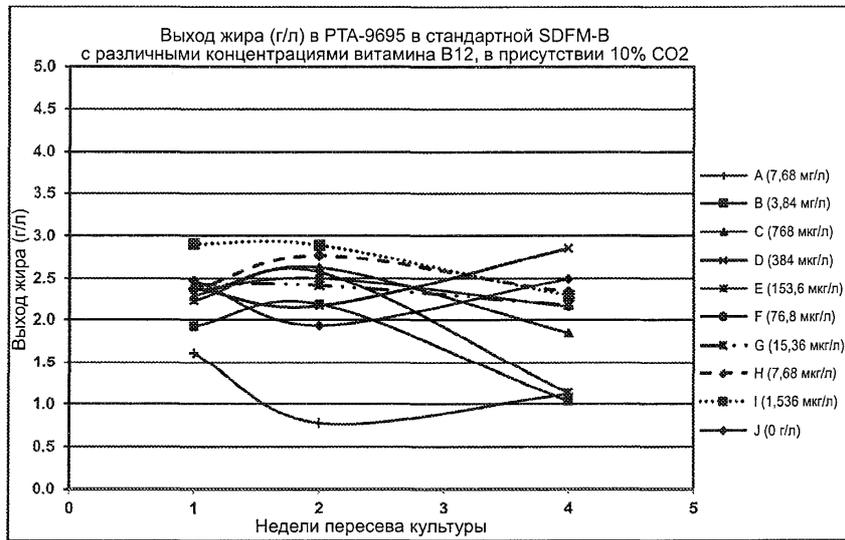
Фиг. 6



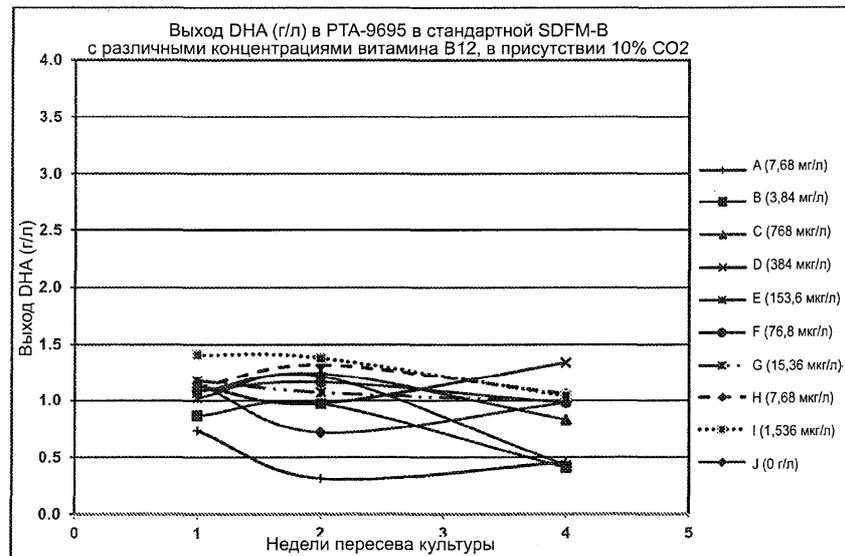
Фиг. 7



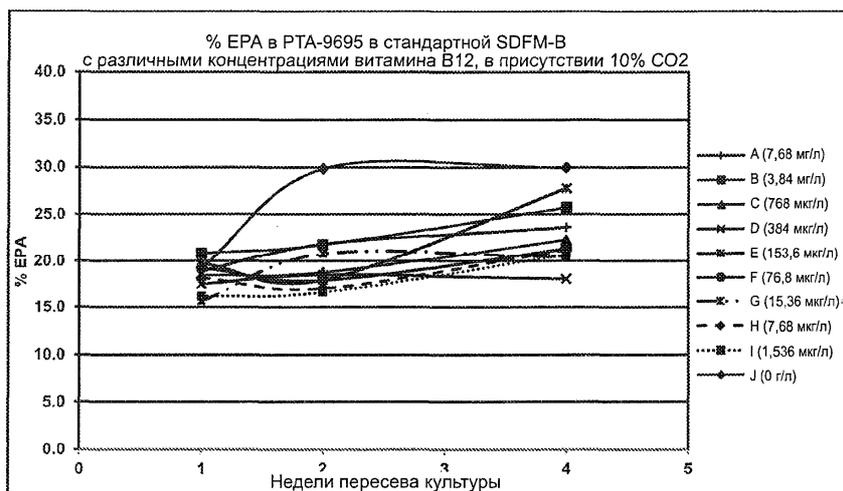
Фиг. 8



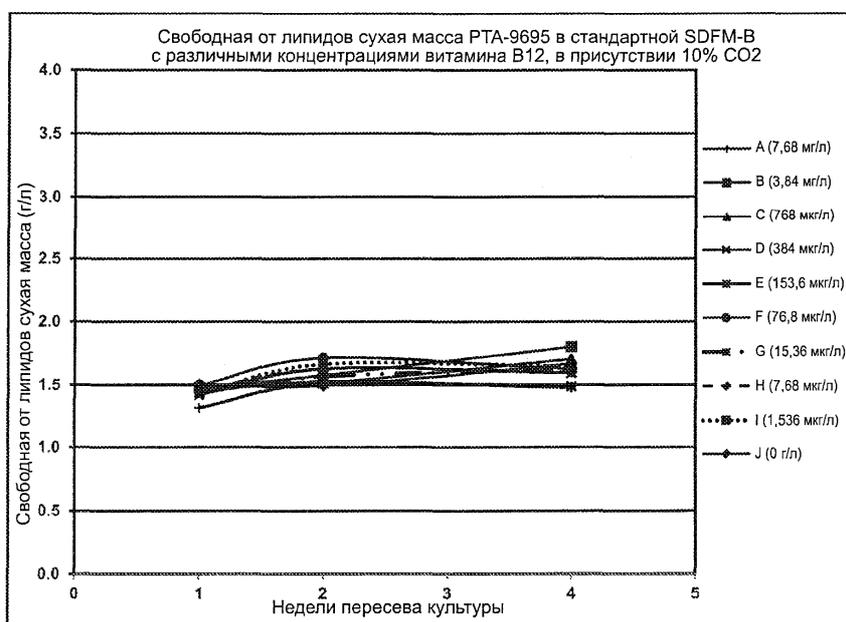
Фиг. 9



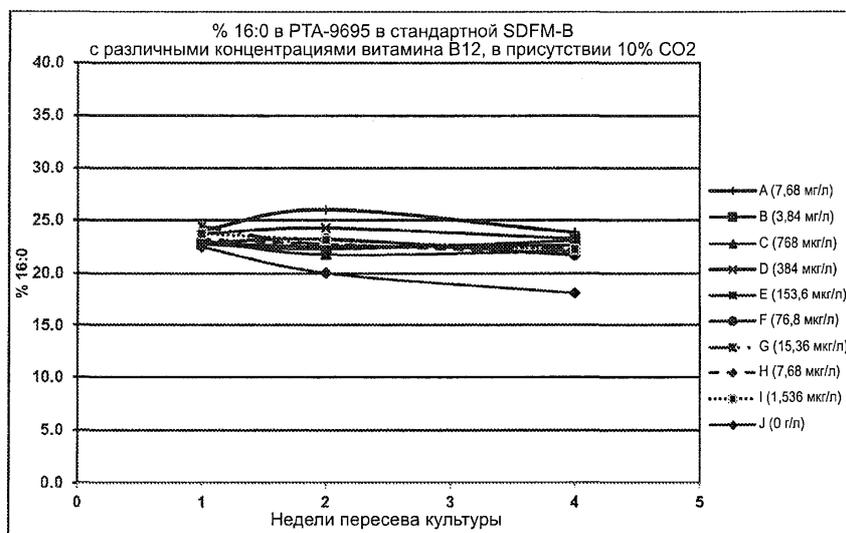
Фиг. 10



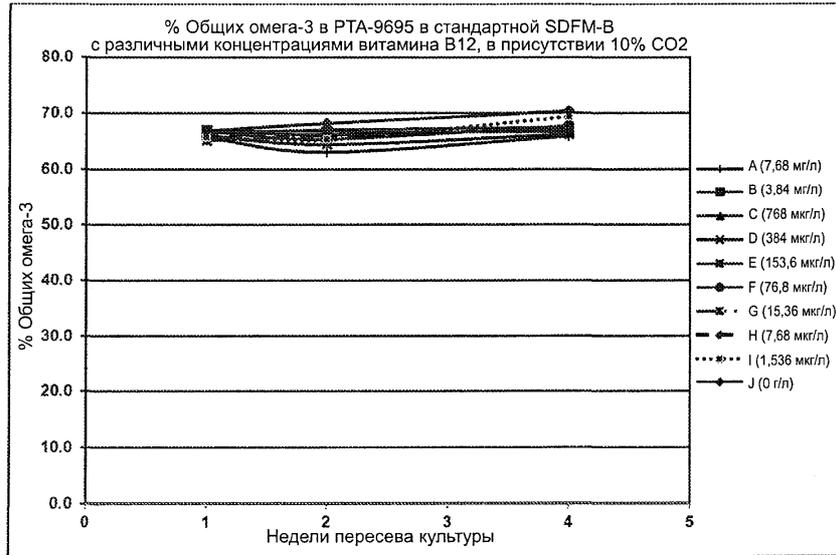
Фиг. 11



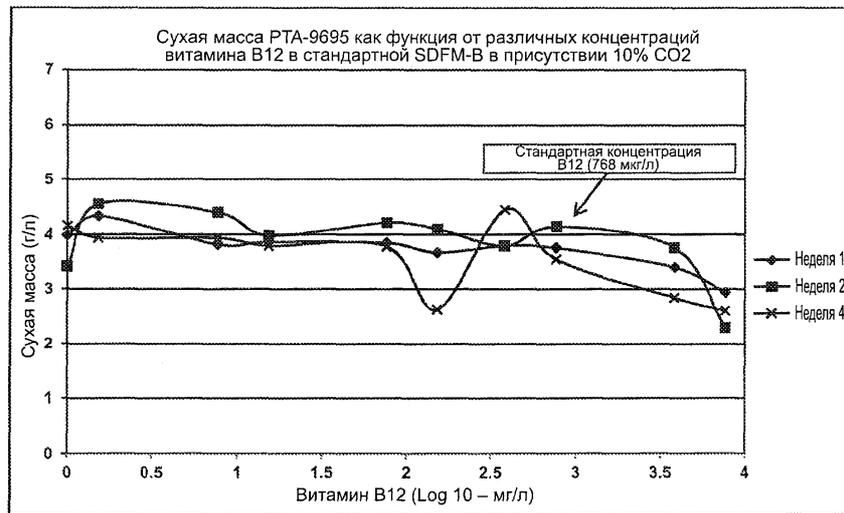
Фиг. 12



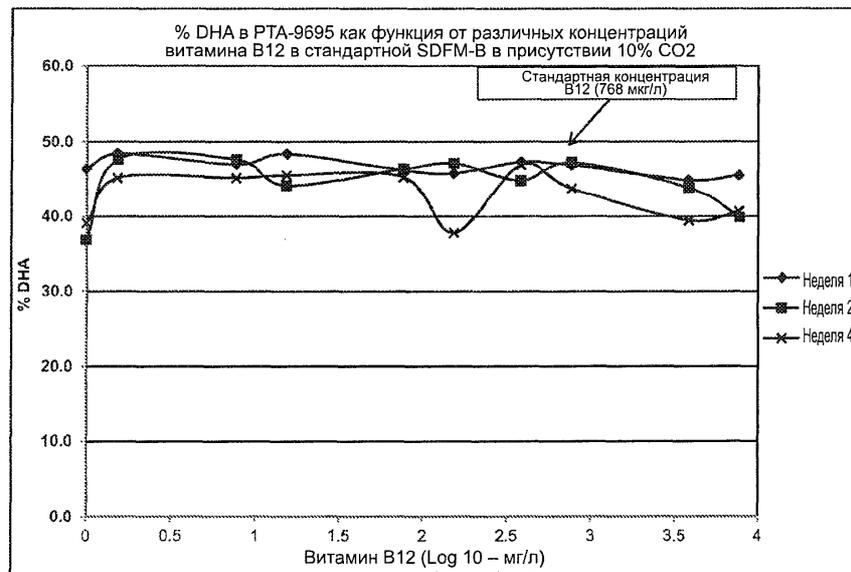
Фиг. 13



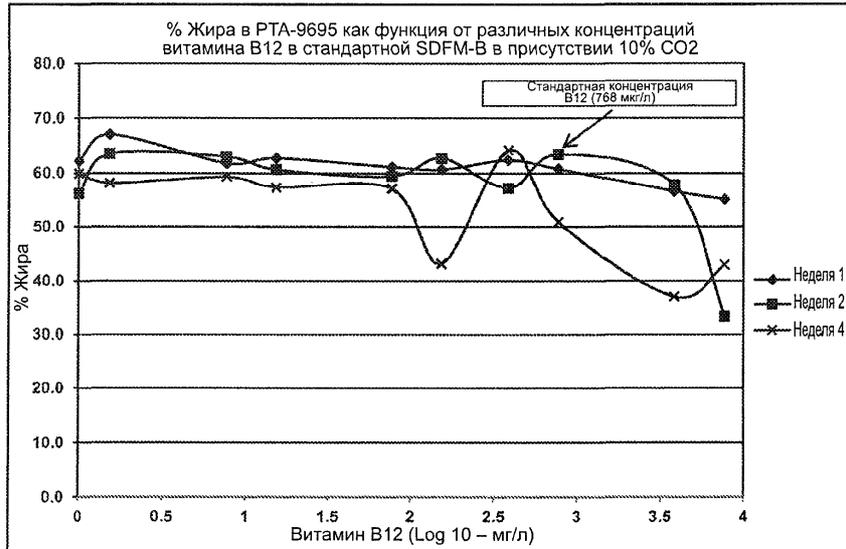
Фиг. 14



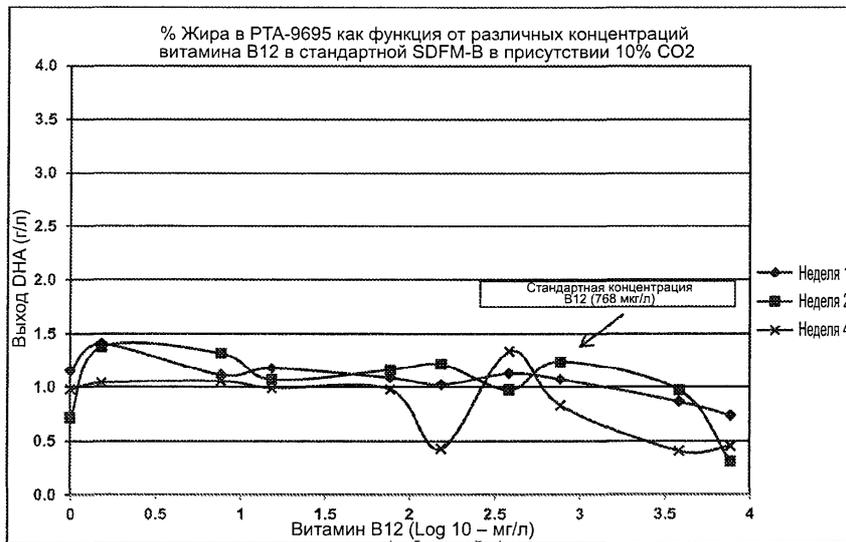
Фиг. 15



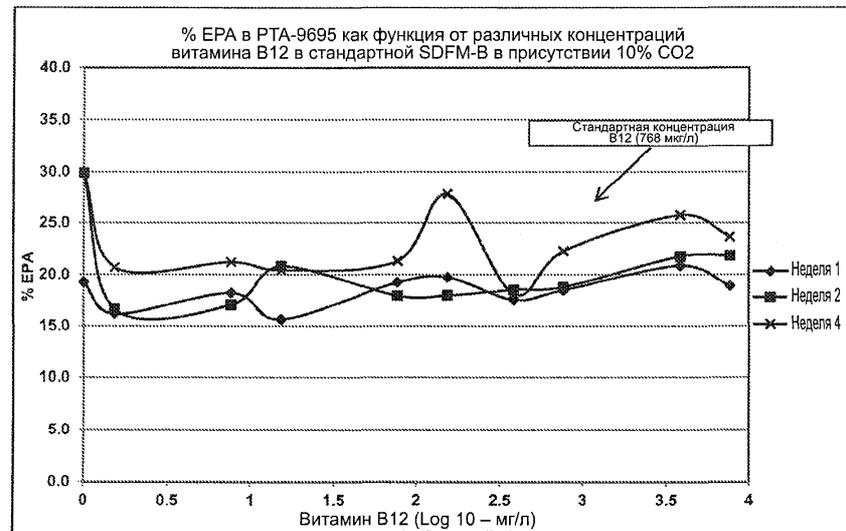
Фиг. 16



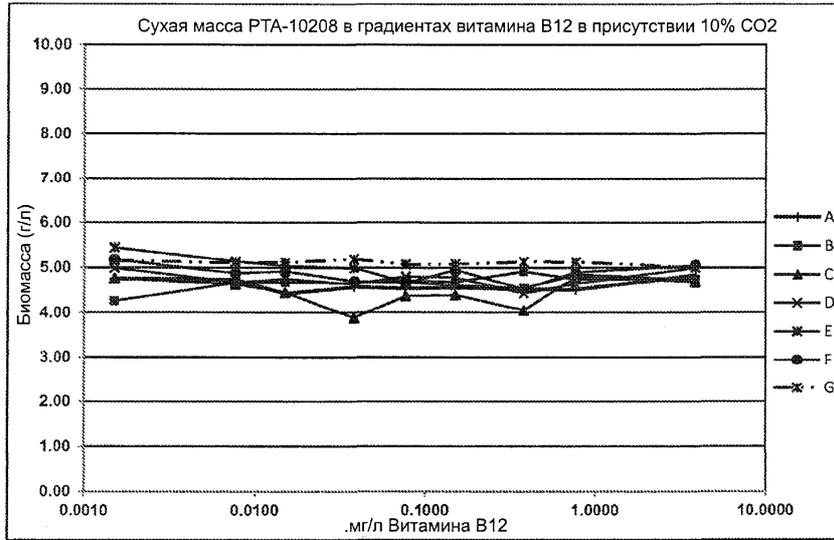
Фиг. 17



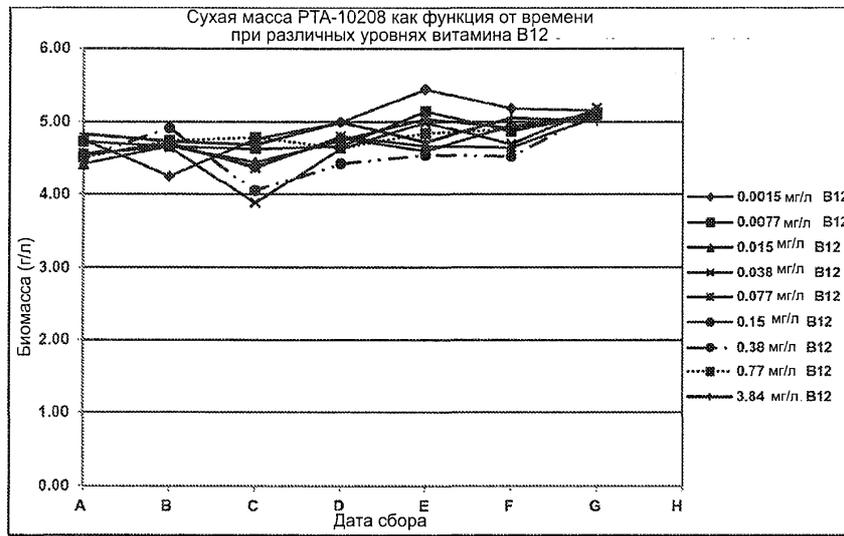
Фиг. 18



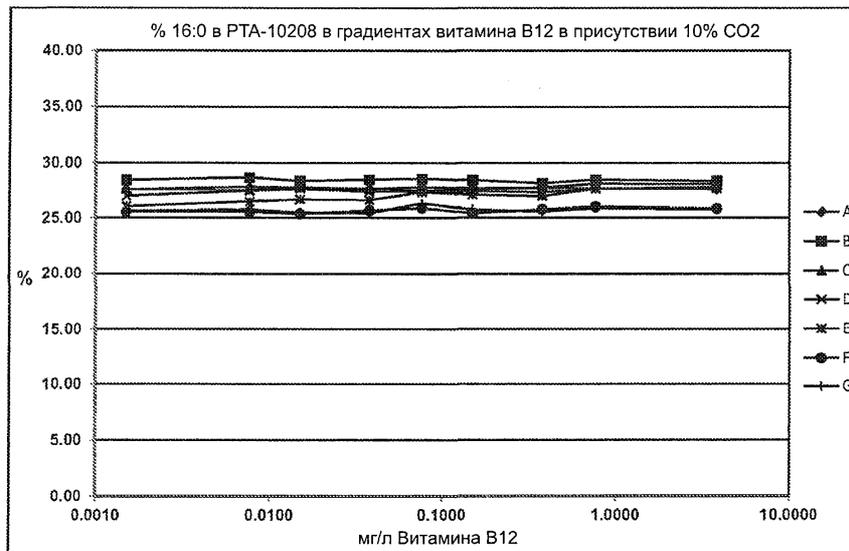
Фиг. 19



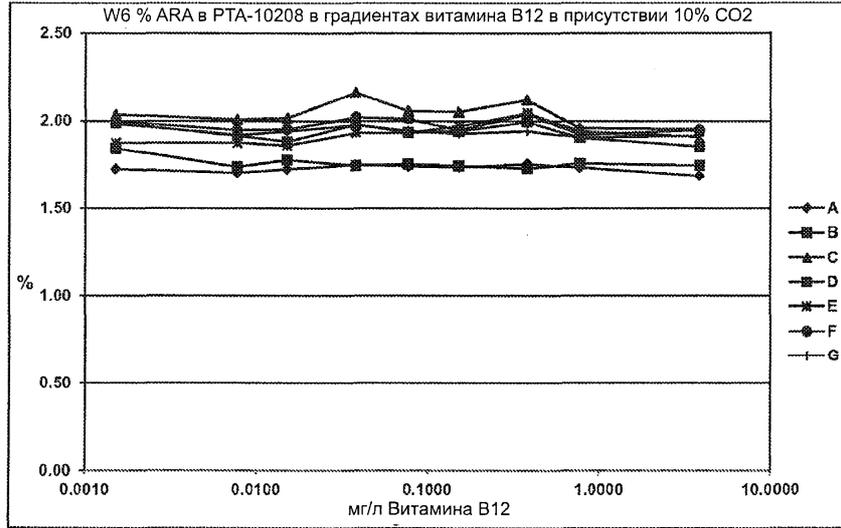
Фиг. 20



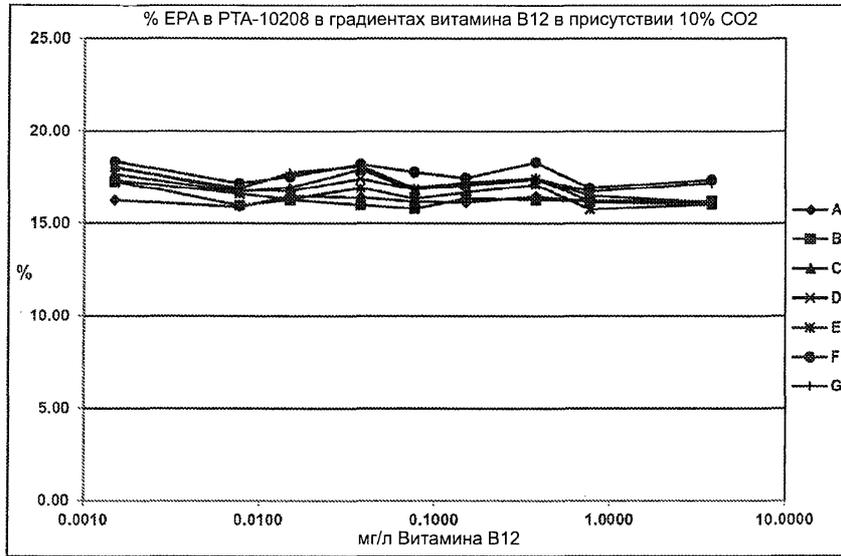
Фиг. 21



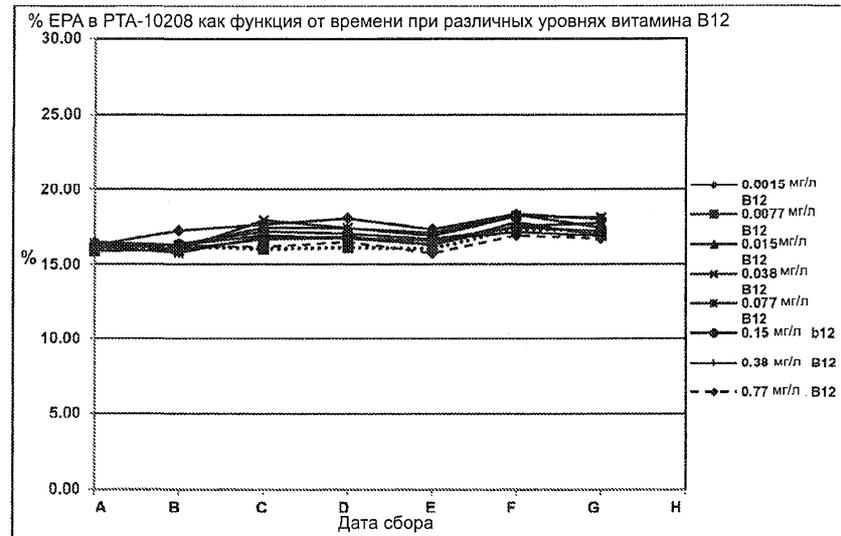
Фиг. 22



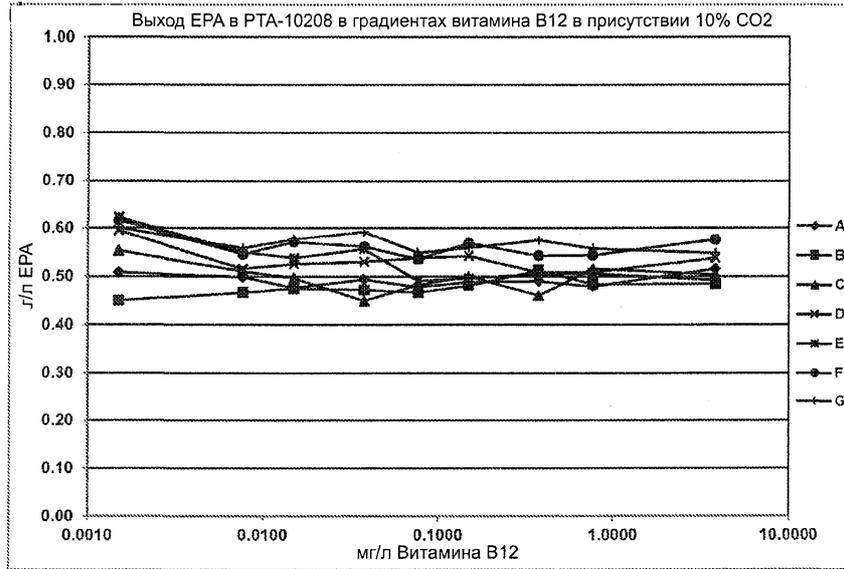
Фиг. 23



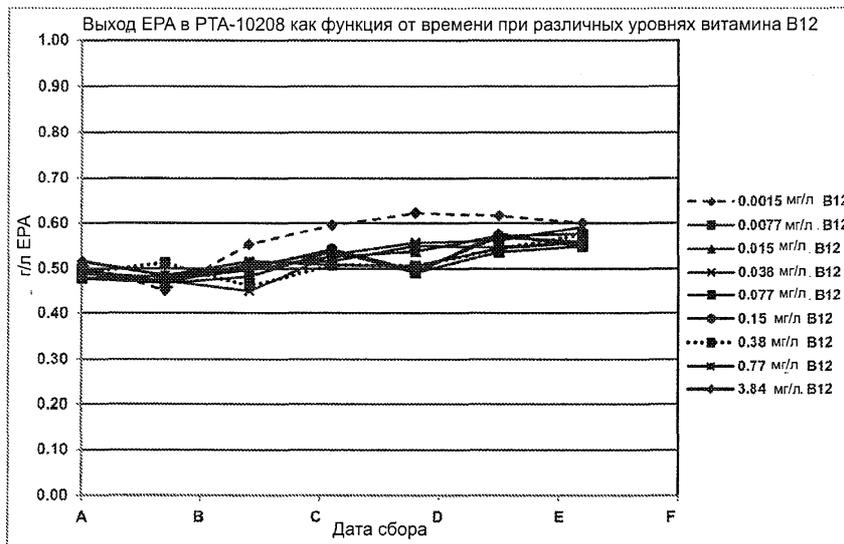
Фиг. 24



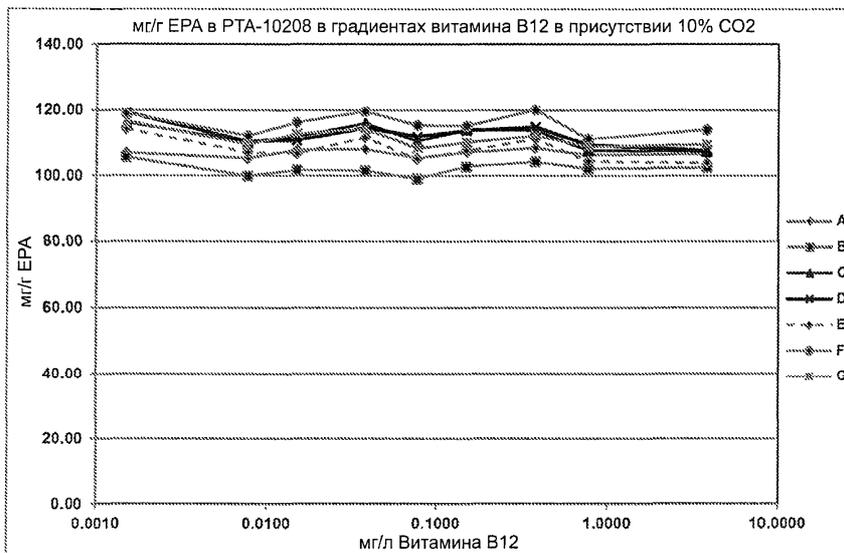
Фиг. 25



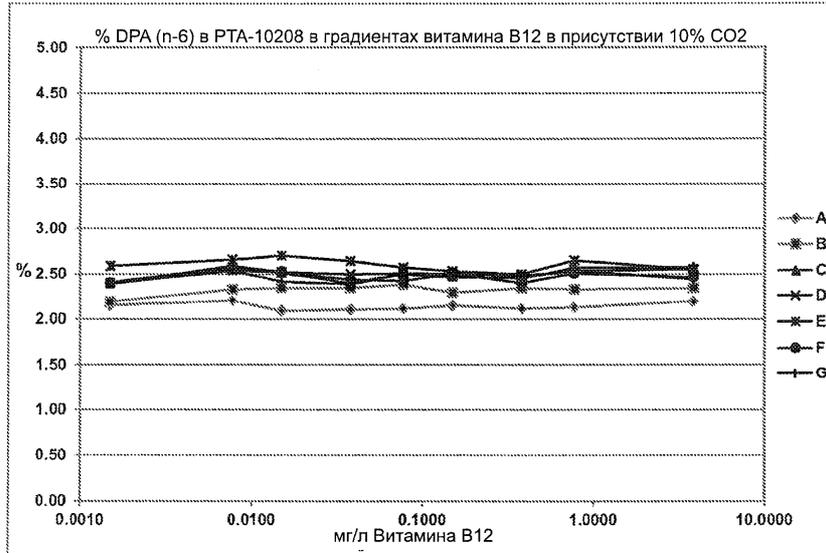
Фиг. 26



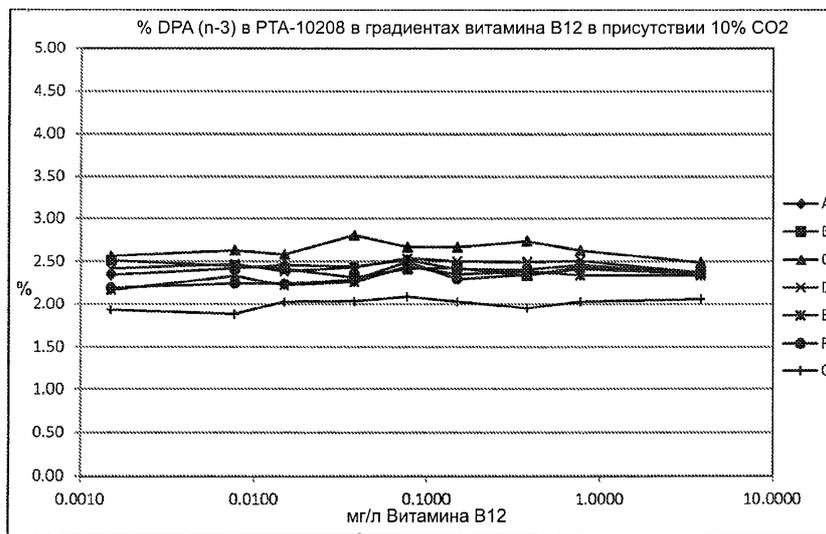
Фиг. 27



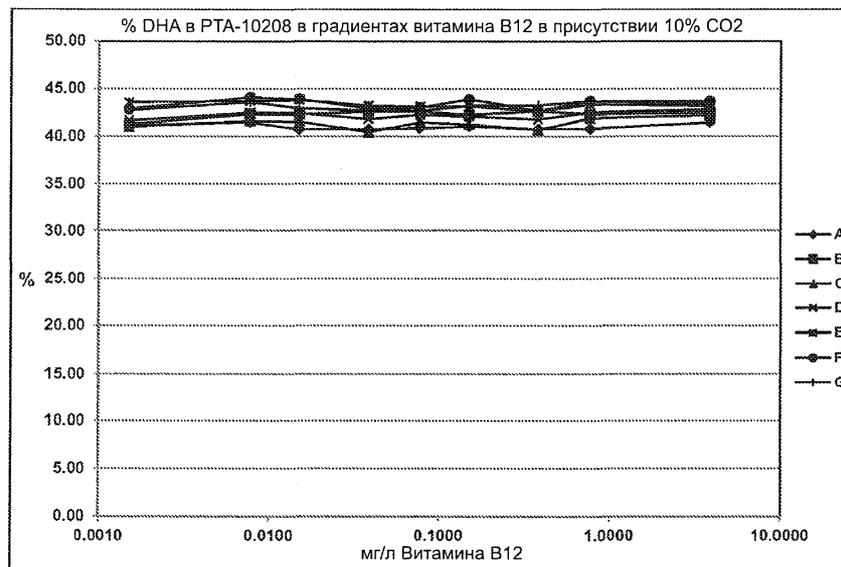
Фиг. 28



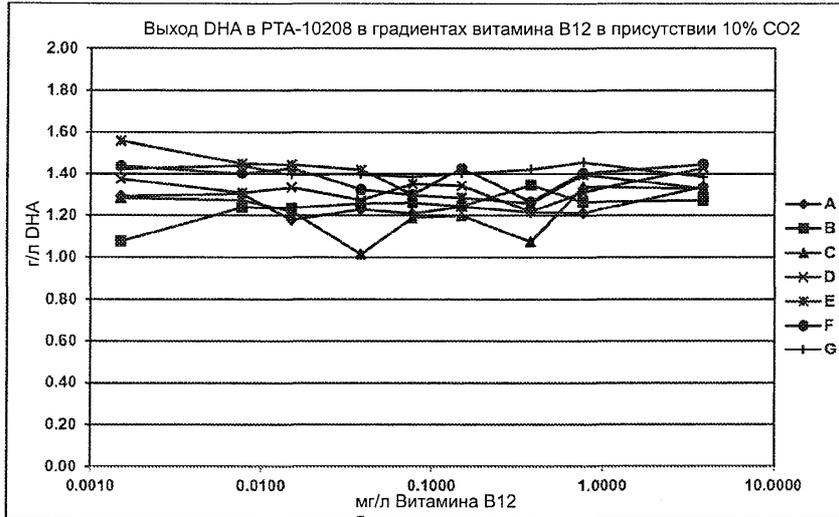
Фиг. 29



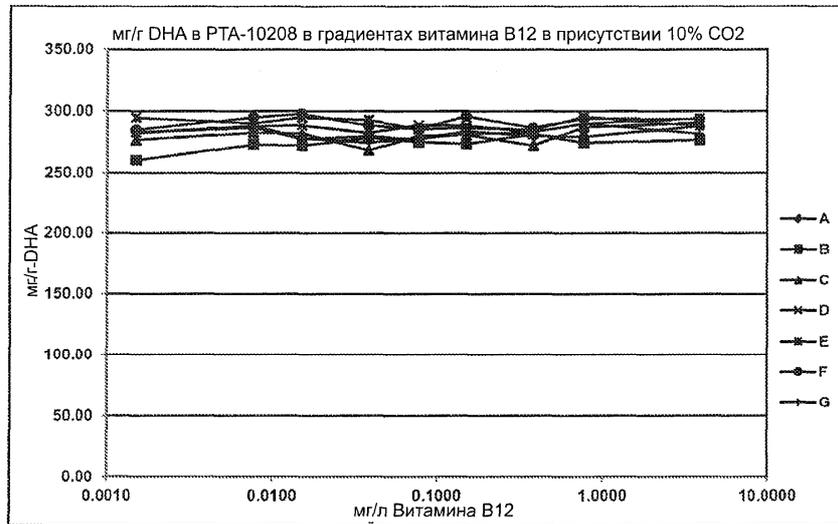
Фиг. 30



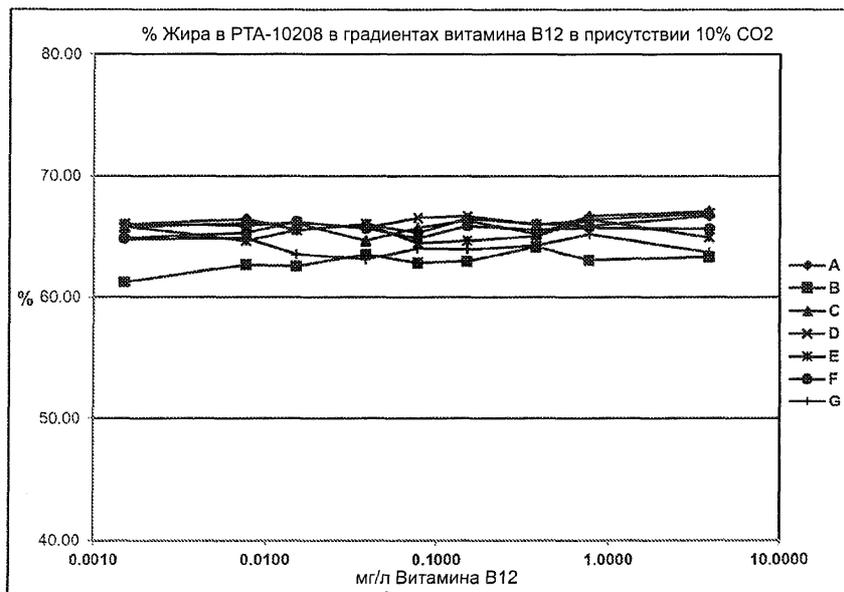
Фиг. 31



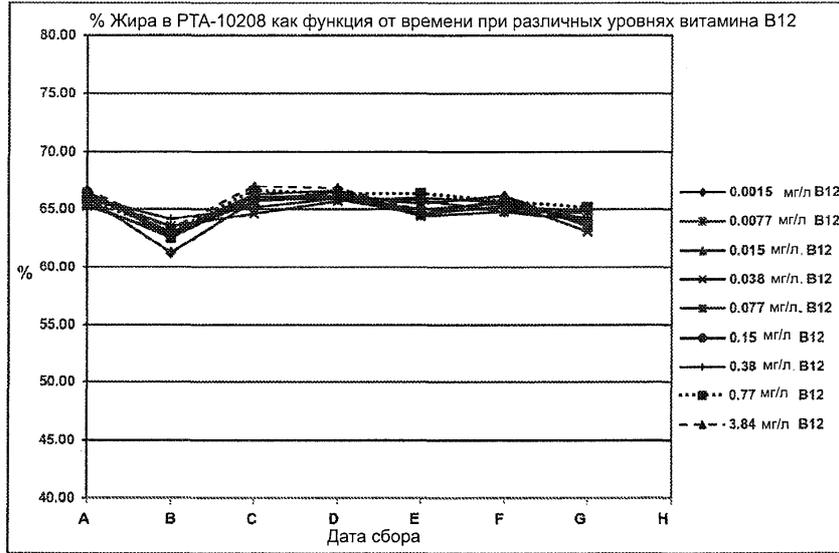
Фиг. 32



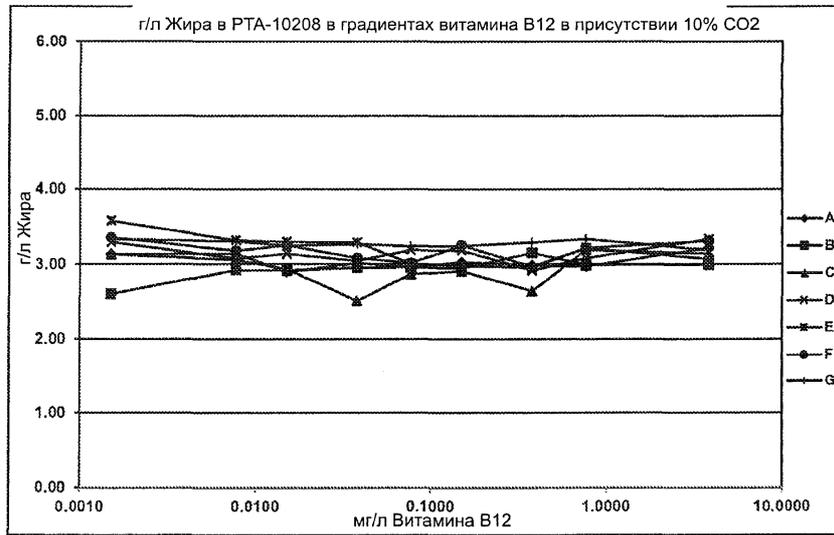
Фиг. 33



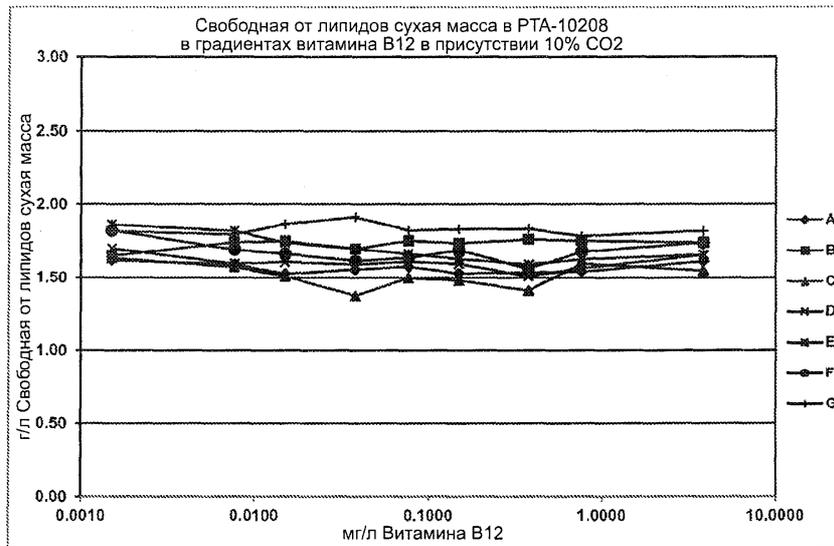
Фиг. 34



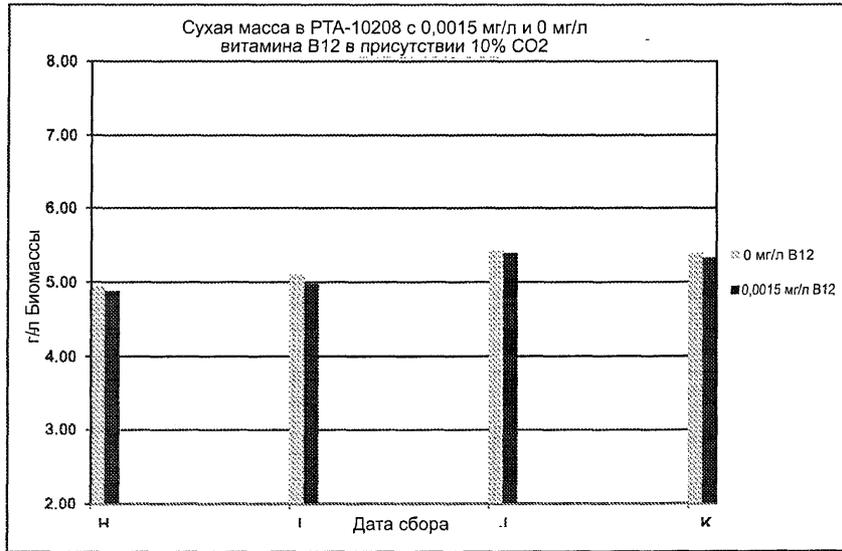
Фиг. 35



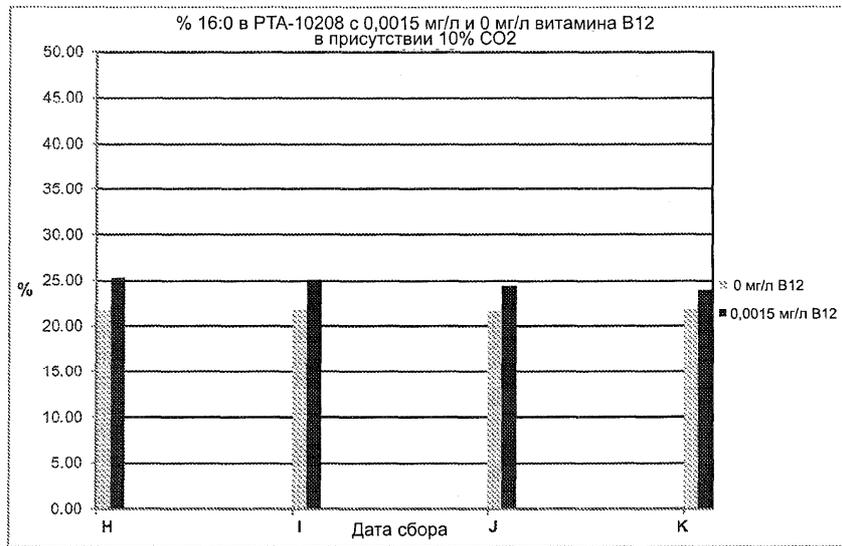
Фиг. 36



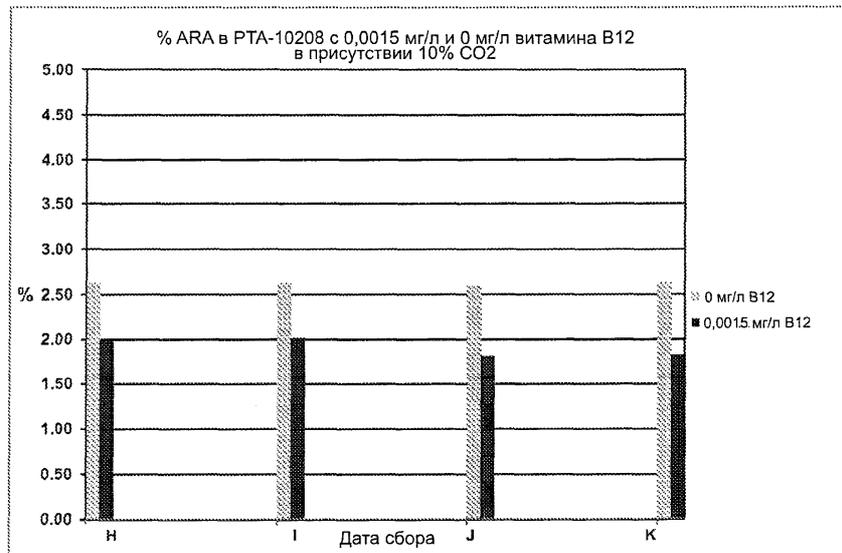
Фиг. 37



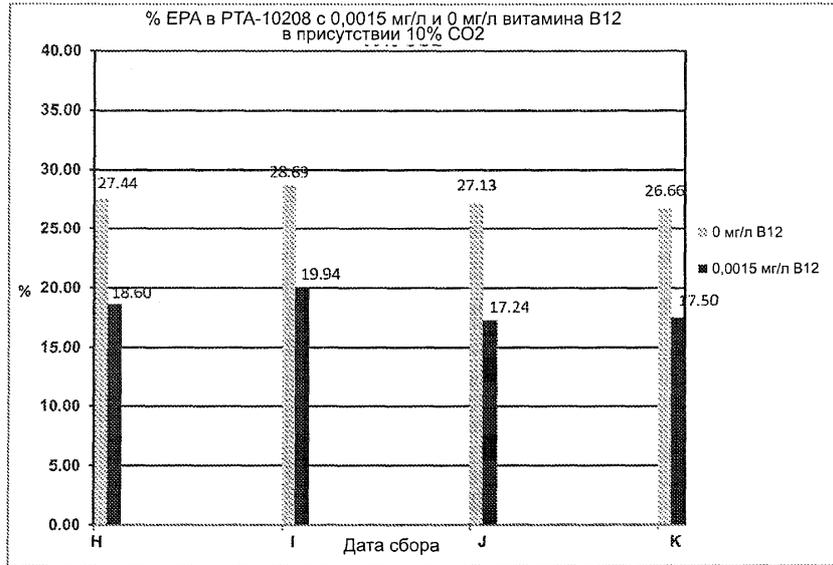
Фиг. 38



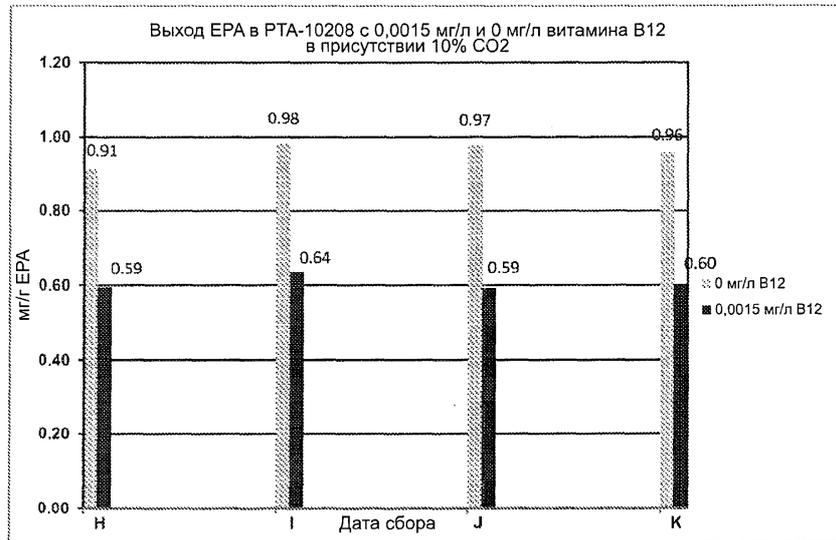
Фиг. 39



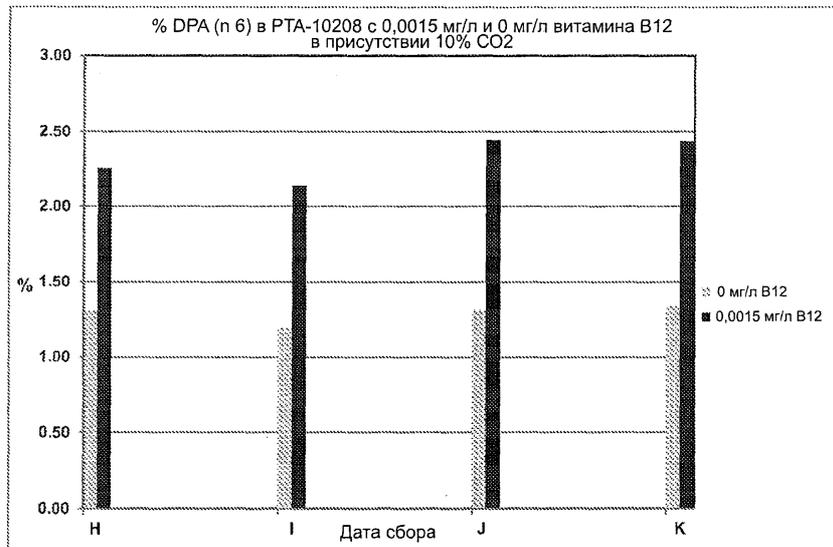
Фиг. 40



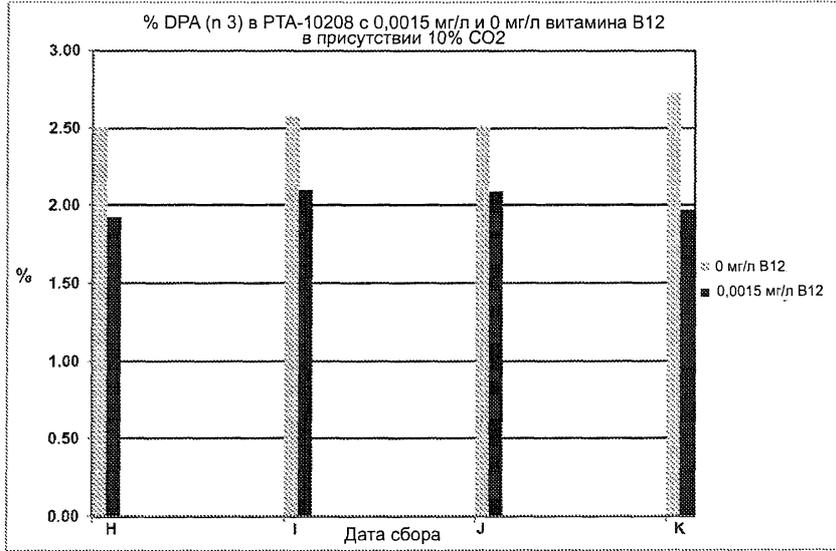
Фиг. 41



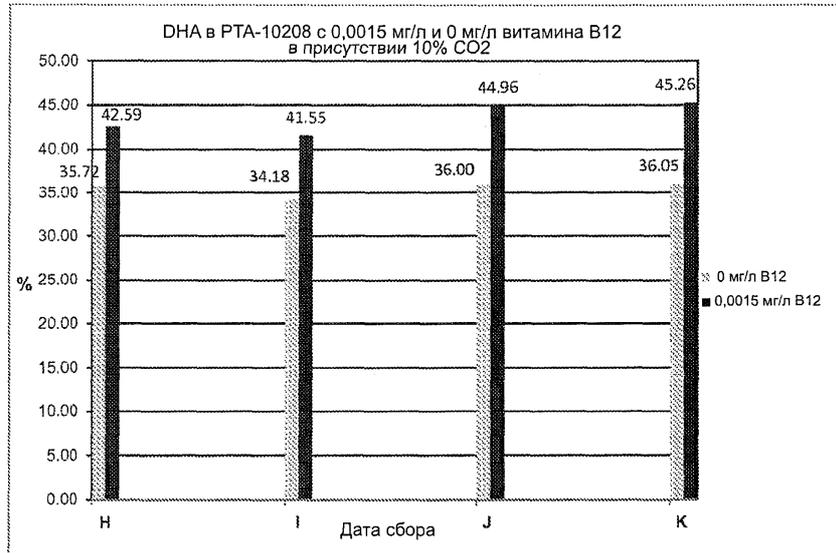
Фиг. 42



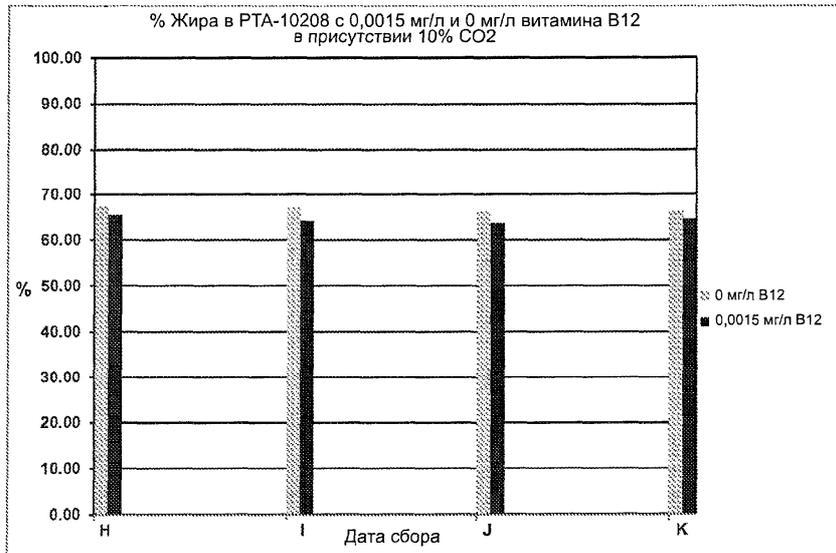
Фиг. 43



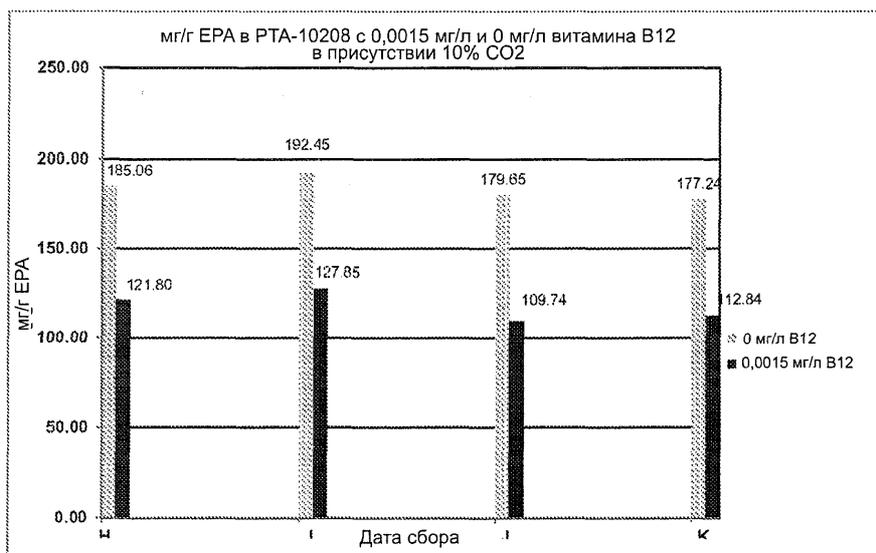
Фиг. 44



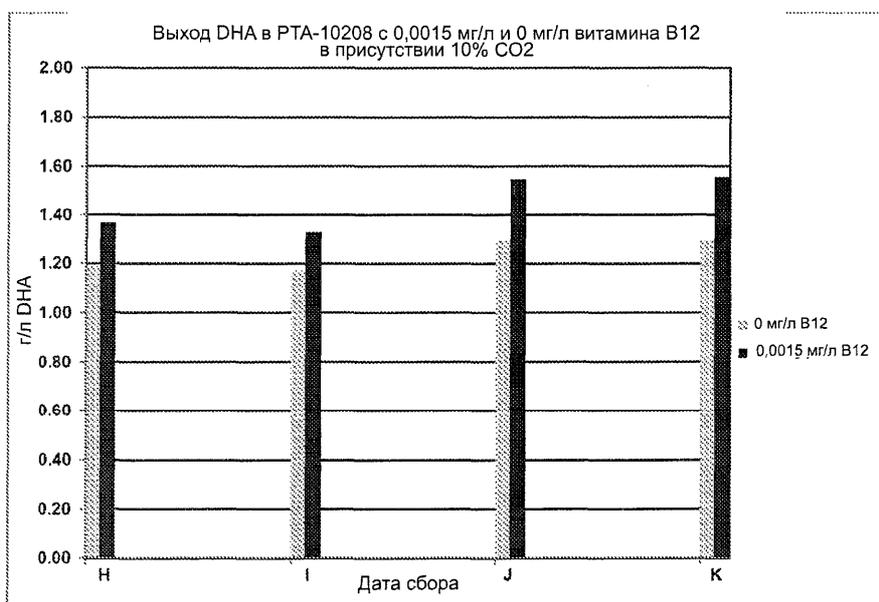
Фиг. 45



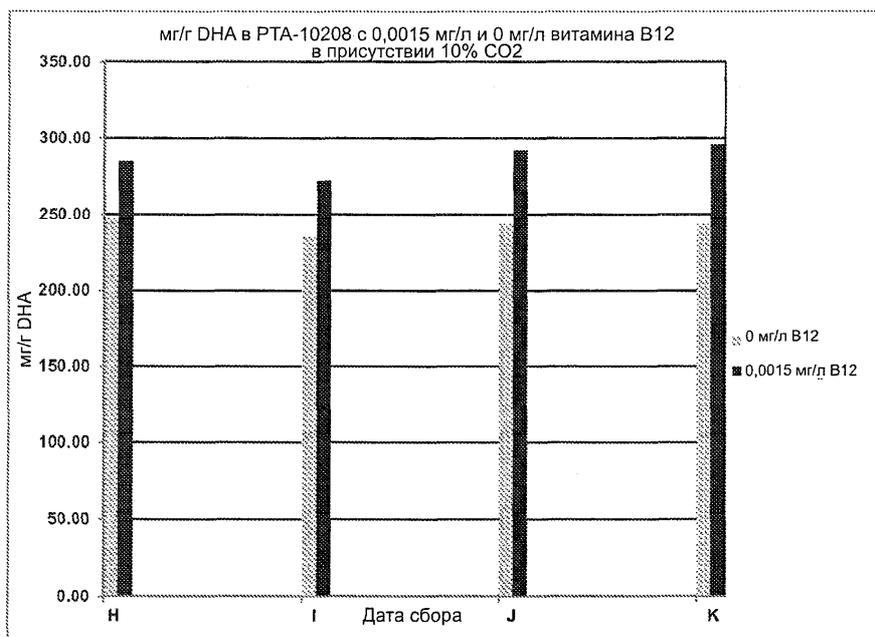
Фиг. 46



Фиг. 47



Фиг. 48



Фиг. 49

