

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 035287

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.05.25

(51) Int. Cl. A61K 31/202 (2006.01)

(21) Номер заявки
201400152

(22) Дата подачи заявки
2012.07.20

(54) МИКРООРГАНИЗМЫ, ПРОДУЦИРУЮЩИЕ ЭЙКОЗАПЕНТАЕНОВУЮ КИСЛОТУ, КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ, И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 61/510,441

(56) US-A1-20090182050
US-A1-20110009357

(32) 2011.07.21

(33) US

(43) 2014.05.30

(86) PCT/US2012/047731

(87) WO 2013/013211 2013.01.24

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

(72) Изобретатель:
Эпт Кирк Е., Беренс Пол Уоррен,
Хансен Джон Милтон, Пфайфер III
Джозеф У., Шталь Трейси Линн,
Зиркл Росс (US)

(74) Представитель:
Саломатина И.С., Фелицына С.Б.
(RU)

(57) Изобретение имеет отношение к микробным маслам, содержащим омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты, включающие докозагексаеновую кислоту, эйкозапентаеновую кислоту и необязательно докозапентаеновую кислоту, и лекарственным формам, содержащим такие масла.

035287

B1

035287

B1

Содержание представленного в электронном виде списка последовательностей ("sequence listing.txt", 5136 байт, создан 20 июля 2011 г.), поданного с данной заявкой, полностью включается в описание путем отсылки.

Настоящее изобретение имеет отношение к изолированным микроорганизмам, а также их штаммам и мутантам, биомассам, микробным маслам, композициям и культурам; способам получения микробных масел, биомасс и мутантов; и способам применения изолированных микроорганизмов, биомасс и микробных масел.

Жирные кислоты классифицируются на основе длины и характеристик насыщения углеродной цепи. Жирные кислоты определяются как жирные кислоты с короткой цепью, средней длиной цепи или с длинной цепью, исходя из числа углеродов, присутствующих в цепи, и, кроме того, определяются как насыщенные жирные кислоты, когда между атомами углерода не имеется двойных связей, и определяются как ненасыщенные жирные кислоты, когда между атомами углерода имеются двойные связи. Ненасыщенные жирные кислоты с длинной цепью являются мононенасыщенными в том случае, когда присутствует только одна двойная связь, и являются полиненасыщенными в том случае, когда присутствует более чем одна двойная связь.

Полиненасыщенные жирные кислоты (PUFA) классифицируют, исходя из положения первой двойной связи с метильного конца жирной кислоты: омега-3 (n-3) жирные кислоты содержат первую двойную связь на третьем углероде, тогда как омега-6 (n-6) жирные кислоты содержат первую двойную связь на шестом углероде. Например, докозагексаеновая кислота ("DHA") представляет собой омега-3 полиненасыщенную жирную кислоту с длинной цепью (LC-PUFA), при этом цепь содержит 22 углерода и 6 двойных связей и часто обозначается как "22:6 n-3." Другие омега-3 LC-PUFA 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 называются "незаменимыми" жирными кислотами. Омега-6 LC-PUFA 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 являются биологически важными молекулами, которые влияют на физиологию клетки, вследствие их присутствия в клеточных мембранах, регулируют продуцирование и экспрессию генов биологически активных соединений и служат в качестве биосинтетических субстратов. Roche H. M., Proc. Nutr. Soc. 58: 397-401 (1999). DHA, например, составляют приблизительно 15-20% липидов в коре головного мозга человека, 30-60% липидов в сетчатке, концентрируются в яичках и семенной жидкости, и является важным компонентом грудного молока. Berge, J.P., and Barnathan, G. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. 96:49-125 (2005). DHA составляют до 97% омега-3 жирных кислот в мозге и до 93% омега-3 жирных кислот в сетчатке. Кроме того, DHA имеют большое значение для развития плода и младенца, а также поддержания когнитивных функций у взрослых (там же). Так как омега-3 жирные кислоты не синтезируются *de novo* в организме человека, эти жирные кислоты должны поступать из источников питания.

Льняное масло и рыбий жир считаются хорошими диетическими источниками омега-3 жирных кислот. Льняное масло не содержит EPA, DHA, DPA или ARA, однако содержит линоленовую кислоту (C18:3 n-3), структурный элемент, дающий возможность организму производить EPA. Имеются данные, однако, указывающие на то, что скорость обмена веществ может быть медленной и может изменяться, в частности при нарушении здоровья. Рыбий жир значительно изменяется по типу и уровню состава жирных кислот в зависимости от конкретного вида и его диеты. Например, рыба, выросшая в условиях аквакультуры, проявляет тенденцию к более низкому уровню омега-3 жирных кислот, чем выросшая в естественных условиях. Кроме того, имеется риск содержания в жирных маслах веществ, загрязняющих окружающую среду, а также имеются проблемы, связанные со стабильностью, рыбным запахом или вкусом.

Траустохитридиевые (Thraustochytrids) являются микроорганизмами порядка Thraustochytriales (траустохитриеые). Траустохитридиевые включают членов родов *Schizochytrium* и *Thraustochytrium* и считаются альтернативным источником омега-3 жирных кислот, включая DHA и EPA. См. патент США № 5130242. Масла, полученные от этих морских гетеротрофных микроорганизмов, часто имеют более простые профили полиненасыщенных жирных кислот, чем подобные масла микроводорослей или рыбий жир. Lewis, T.E., Mar. Biotechnol. 1: 580-587 (1999). Сообщалось, что штаммы вида Траустохитридиевых продуцируют значительную долю омега-3 жирных кислот от всех жирных кислот, вырабатываемых организмами. Патент США № 5 130242; 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 Траустохитридиевые продуцируют разный состав и количества LC-PUFA, вследствие чего некоторые ранее описанные штаммы могут иметь неподходящие уровни омега-6 жирных кислот и/или могут демонстрировать низкую продуктивность в культуре. В связи с этим, существует постоянная необходимость выделения микроорганизмов, демонстрирующих высокую продуктивность и желательные LC-PUFA профили.

Настоящее изобретение имеет отношение к изолированному микроорганизму вида, депонированного под учетным номером ATCC PTA-10212.

Настоящее изобретение имеет отношение к изолированному микроорганизму, имеющему характер-

ные черты вида, депонированного под учетным номером ATCC PTA-10212.

Настоящее изобретение имеет отношение к изолированному микроорганизму, содержащему 18s rRNA, включающую последовательность полинуклеотида SEQ ID NO:1 или последовательность полинуклеотида, имеющую по меньшей мере 94% идентичность с SEQ ID NO:1.

Настоящее изобретение имеет отношение к изолированному микроорганизму, содержащему 18s rRNA последовательность полинуклеотида, которая имеет по меньшей мере 94% идентичность с 18s rRNA последовательностью полинуклеотида микроорганизма, депонированного под учетным номером ATCC PTA-10212.

Настоящее изобретение имеет отношение к изолированному микроорганизму вида, депонированного под учетным номером ATCC PTA-10208, отличающемуся тем, что суммарные жирные кислоты, продуцируемые микроорганизмом, содержат более чем примерно 10 вес.% эйкозапентаеновой кислоты.

Настоящее изобретение имеет отношение к изолированному микроорганизму, имеющему характерные черты вида, депонированного под учетным номером ATCC PTA-10208, отличающемуся тем, что суммарные жирные кислоты, продуцируемые микроорганизмом, содержат более чем примерно 10 вес.% эйкозапентаеновой кислоты.

Настоящее изобретение имеет отношение к изолированному микроорганизму, который продуцирует фракцию триглицеридов, причем содержание эйкозапентаеновой кислоты во фракции триглицеридов составляет по меньшей мере около 12 вес.%.

В некоторых вариантах осуществления изолированный микроорганизм изобретения является мутантным штаммом.

Настоящее изобретение имеет отношение к изолированному микроорганизму, депонированному под учетным номером ATCC PTA-10212, PTA-10213, PTA-10214, PTA-10215, PTA-10208, PTA-10209, PTA-10210 или PTA-10211.

Настоящее изобретение имеет отношение к биомассе, содержащей какой-либо из микроорганизмов изобретения или их смеси.

Настоящее изобретение имеет отношение к изолированной биомассе, в которой по меньшей мере около 20 вес.% от сухого веса клеток биомассы составляют жирные кислоты, в которой более чем около 10 вес.% от сухого веса клеток биомассы составляет эйкозапентаеновая кислота и в которой жирные кислоты содержат менее чем около 5 вес.% каждой из арахидоновой кислоты и докозапентаеновой кислоты n-6. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 25 вес.% жирных кислот составляет докозагексаеновая кислота.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение имеет отношение к изолированной биомассе, содержащей триглицерид, в которой по меньшей мере около 12 вес.% триглицерида составляет эйкозапентаеновая кислота.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение имеет отношение к какой-либо изолированной биомассе изобретения, в которой жирные кислоты также включают менее чем около 5 вес.% каждой из олеиновой кислоты, линолевой кислоты, эйкозеновой кислоты и эруковой кислоты.

Настоящее изобретение имеет отношение к изолированной культуре, содержащей какой-либо из микроорганизмов изобретения или их смеси.

Настоящее изобретение имеет отношение к пищевому продукту, косметической или фармацевтической композиции, предназначенной для животного, не являющегося человеком, или для человека, содержащей какой-либо из микроорганизмов или какую-либо из биомасс изобретения или их смеси.

Настоящее изобретение имеет отношение к микробному маслу, содержащему по меньшей мере около 20 вес.% эйкозапентаеновой кислоты и менее чем около 5 вес.% каждой из арахидоновой кислоты, докозапентаеновой кислоты n-6, олеиновой кислоты, линолевой кислоты, линоленовой кислоты, эйкозеновой кислоты, эруковой кислоты и стеарионовой кислоты. В некоторых вариантах осуществления микробное масло дополнительно содержит по меньшей мере около 25 вес.% докозагексаеновой кислоты.

Настоящее изобретение имеет отношение к микробному маслу, содержащему фракцию триглицеридов по меньшей мере около 10 вес.%, в которой по меньшей мере около 12 вес.% жирных кислот во фракции триглицеридов составляет эйкозапентаеновая кислота, в которой по меньшей мере около 25 вес.% жирных кислот во фракции триглицеридов составляет докозагексаеновая кислота и в которой менее чем около 5 вес.% жирных кислот во фракции триглицеридов составляет арахидоновая кислота.

Настоящее изобретение имеет отношение к пищевому продукту, косметической или фармацевтической композиции, предназначенной для животного, не являющегося человеком, или для человека, содержащей любое из микробных масел изобретения. В некоторых вариантах осуществления пищевой продукт является детской смесью. В некоторых вариантах осуществления детская смесь является пригодной для недоношенных детей. В некоторых вариантах осуществления пищевой продукт является молоком, напитком, лечебным напитком, питательным напитком или их комбинацией. В некоторых вариантах осуществления пищевой продукт является добавкой к пище животного, не являющегося человеком, или человека. В некоторых вариантах осуществления пищевой продукт является питательной добавкой. В некоторых вариантах осуществления пищевой продукт является кормом для животных. В некоторых вариантах осуществления корм для животных является кормом для аквакультуры. В некоторых

вариантах осуществления корм для животных является кормом для домашних животных, кормом для зоологических животных, кормом для рабочих животных, кормом для скота или их комбинаций.

Настоящее изобретение имеет отношение к способу получения микробного масла, содержащего омега-3 жирные кислоты, данный способ включает: выращивание какого-либо из изолированных микроорганизмов изобретения или их смесей в культуре с целью получения масла, содержащего омега-3 жирные кислоты. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает экстрагирование масла.

Настоящее изобретение имеет отношение к способу получения микробного масла, содержащего омега-3 жирные кислоты, причем данный способ включает экстрагирование омега-3 жирных кислот из какой-либо из биомасс изобретения. В некоторых вариантах осуществления микробное масло экстрагируется путем проведения экстракции органическими растворителями, например экстракции гексаном. В некоторых вариантах осуществления микробное масло экстрагируется с помощью процесса экстракции без растворителя.

Настоящее изобретение имеет отношение к микробному маслу, полученному способом данного изобретения.

Настоящее изобретение имеет отношение к способу получения биомассы изобретения, включающему выращивание каких-либо изолированных микроорганизмов изобретения или их смесей в культуре с целью получения биомассы.

Настоящее изобретение имеет отношение к биомассе, полученной способом данного изобретения.

Настоящее изобретение имеет отношение к способу получения мутантного штамма изобретения, включающему мутагенез какого-либо из микроорганизмов изобретения и изолирование мутантного штамма.

Настоящее изобретение имеет отношение к применению какого-либо из изолированных микроорганизмов, биомасс или микробных масел изобретения или их смесей, для производства медикамента для лечения воспаления или связанного с ним состояния.

Настоящее изобретение имеет отношение к применению какого-либо из изолированных микроорганизмов, биомасс или микробных масел изобретения или их смесей для лечения воспаления или связанного с ним состояния.

Настоящее изобретение имеет отношение к любому из изолированных микроорганизмов, биомасс или микробных масел изобретения или их смесям, используемым при лечении воспаления или связанного с ним состояния.

Настоящее изобретение имеет отношение к способу лечения воспаления или связанного с ним состояния у субъекта, нуждающегося в этом, включающему введение субъекту какого-либо из изолированных микроорганизмов, биомасс или микробных масел изобретения или их смесей и фармацевтически приемлемого носителя.

Настоящее изобретение имеет отношение к изолированным микроорганизмам, а также их штаммам и мутантам, а также биомассам, микробным маслам, композициям и их культурам. Настоящее изобретение имеет отношение к способам получения микробных масел, биомасс и мутантов микроорганизмов изобретения и способам применения микроорганизмов, биомасс и микробных масел. Микроорганизмы, описанные здесь, являются высокопродуктивными и вырабатывают уникальный профиль жирных кислот, характеризующийся отчасти высокими уровнями омега-3 жирных кислот, в частности, высокими уровнями EPA.

Изобретение имеет отношение к изолированным микроорганизмам и штаммам, происходящим от них. Штамм, "происходящий" от изолированного микроорганизма изобретения, может быть природным или полученным искусственно, таким как, например, мутантный, вариантный или рекомбинантный штамм. Используемый в описании термин "изолированный" не обязательно отражает степень, до которой изолят очищен, а означает изолирование или отделение от нативной формы или нативной окружающей среды. Изолят может включать, но не ограничивается этим, изолированный микроорганизм, изолированную биомассу, изолированную культуру, изолированное микробное масло и изолированную последовательность (такую как изолированная полинуклеотидная последовательность, описанная здесь). Используемый в описании термин "микроорганизм" включает, но не ограничивается этим, термины "микроводоросли," "Траустохитридиевые," и таксономическую классификацию, связанную с любым из депонированных микроорганизмов, описанных здесь. Термины "Траустохитриевые," "Траустохитридиевые," "Schizochytrium" и "Thraustochytrium", использованные в отношении какого-либо из микроорганизмов изобретения, включая описанные здесь депонированные микроорганизмы, основываются на современных таксономических классификациях, включающих доступную филогенетическую информацию, и не предназначены для ограничения в том случае, когда таксономические классификации пересматриваются после даты подачи настоящей заявки.

В некоторых вариантах осуществления изобретение имеет отношение к изолированному микроорганизму вида, депонированного под учетным номером ATCC PTA-10212. Изолированный микроорганизм, имеющий отношение к учетному номеру ATCC PTA-10212, также известен как *Thraustochytrium* sp. ATCC PTA-10212. Изолированный микроорганизм, имеющий отношение к учетному номеру ATCC

РТА-10212, был депонирован в соответствии с Будапештским договором 14 июля 2009 г. в Американскую коллекцию типовых культур, Patent Depository, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209. В некоторых вариантах осуществления изобретение имеет отношение к изолированному штамму, депонированному под учетным номером ATCC РТА-10212.

В некоторых вариантах осуществления изобретение имеет отношение к изолированному микроорганизму, имеющему характеристики вида, депонированного под учетным номером ATCC РТА-10212, или штамма, полученного от него. Характеристики вида, депонированного под учетным номером ATCC РТА-10212, могут включать его ростовые и фенотипические свойства (примеры фенотипических свойств включают морфологические и репродуктивные свойства), его физические и химические свойства (такие как сухой вес и липидный профиль), последовательности его генов и их комбинации, при этом характеристики отличаются от характеристик ранее идентифицированных видов. В некоторых вариантах осуществления изобретение имеет отношение к изолированному микроорганизму, имеющему характеристики вида, депонированного под учетным номером ATCC РТА-10212, при этом характеристики включают 18s rRNA, содержащую последовательность полинуклеотида SEQ ID NO:1 или последовательность полинуклеотида, имеющего по меньшей мере 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичность с SEQ ID NO:1, морфологические и репродуктивные свойства вида, депонированного под учетным номером ATCC РТА-10212, и профили жирных кислот вида, депонированного под учетным номером ATCC РТА-10212. В некоторых вариантах осуществления изолированные микроорганизмы изобретения имеют фенотипические свойства, по существу, идентичные свойствам микроорганизма, депонированного под учетным номером ATCC РТА-10212. В некоторых вариантах осуществления изолированные микроорганизмы изобретения имеют характеристики роста, по существу, идентичные свойствам микроорганизма, депонированного под учетным номером ATCC РТА-10212. В некоторых вариантах осуществления изобретение имеет отношение к изолированному микроорганизму, содержащему 18s rRNA, содержащую последовательность полинуклеотида SEQ ID NO:1 или последовательность полинуклеотида, имеющего по меньшей мере 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичность с SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления изобретение имеет отношение к изолированному микроорганизму, содержащему 18s rRNA последовательность полинуклеотида, которая имеет по меньшей мере 94% идентичность с 18s rRNA последовательностью полинуклеотида микроорганизма, депонированного под учетным номером ATCC РТА-10212.

В некоторых вариантах осуществления изобретение имеет отношение к мутантному штамму микроорганизма, депонированного под учетным номером ATCC РТА-10212. В дополнительных вариантах осуществления мутантный штамм является штаммом, депонированным под учетным номером ATCC РТА-10213, РТА-10214 или РТА-10215. Микроорганизмы, имеющие отношение к учетным номерам ATCC РТА-10213, РТА-10214 и РТА-10215, были депонированы в соответствии с Будапештским договором 14 июля 2009 года в Американскую коллекцию типовых культур, Patent Depository, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209.

В некоторых вариантах осуществления изобретение имеет отношение к изолированному микроорганизму вида, депонированного под учетным номером ATCC РТА-10208. Изолированный микроорганизм, имеющий учетный номер ATCC РТА-10208, также известен как *Schizochytrium* sp. ATCC РТА-10208. Микроорганизм, имеющий отношение к учетному номеру ATCC РТА-10208, был депонирован в соответствии с Будапештским договором 14 июля 2009 г. в Американскую коллекцию типовых культур, Patent Depository, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209. В некоторых вариантах осуществления изобретение имеет отношение к. изолированному штамму, депонированному под учетным номером ATCC РТА-10208.

В некоторых вариантах осуществления изобретение имеет отношение к изолированному микроорганизму вида, депонированного под учетным номером ATCC РТА-10208, при этом общие жирные кислоты, продуцируемые данным микроорганизмом, содержат более чем около 10%, более чем около 11%, более чем около 12%, более чем около 13%, более чем около 14%, более чем около 15%, более чем около 16%, более чем около 17%, более чем около 18%, более чем около 19%, или более чем около 20 вес.% ЕРА. В некоторых вариантах осуществления изобретение имеет отношение к изолированному микроорганизму вида, депонированному под учетным номером ATCC РТА-10208, при этом общие жирные кислоты, продуцируемые данным микроорганизмом, содержат примерно от 10 до 55%, примерно от 10 до 50%, примерно от 10 до 45%, примерно от 10 до 40%, примерно от 10 до 35%, примерно от 10 до 30%, примерно от 15 до 55%, примерно от 15 до 50%, примерно от 15 до 45%, примерно от 15 до 40%, примерно от 15 до 35%, примерно от 15 до 30%, примерно от 20 до 55%, примерно от 20 до 50%, примерно от 20 до 45%, примерно от 20 до 40%, примерно от 20 до 35% или примерно от 20 до 30 вес.% ЕРА.

В некоторых вариантах осуществления изобретение имеет отношение к изолированному микроорганизму, имеющему характеристики вида, депонированного под учетным номером ATCC РТА-10208, при этом общие жирные кислоты, продуцируемые данным микроорганизмом, содержат более чем около 10 вес.% эйкозапентаеновой кислоты. Характеристики микроорганизма, депонированного под учетным номером ATCC РТА-10208, включают его ростовые и фенотипические свойства (примеры фенотипических характеристик включают морфологические и репродуктивные свойства), его физические и химические свойства (такие как сухой вес и липидные профили), последовательности его генов и их комбинации.

ции, при этом характеристики отличаются от характеристик ранее идентифицированных видов. В некоторых вариантах осуществления изобретение имеет отношение к изолированному микроорганизму, имеющему характеристики вида, депонированного под учетным номером ATCC PTA-10212, при этом характеристики включают 18s rRNA, содержащую последовательность полинуклеотида SEQ ID NO:2, морфологические и репродуктивные свойства вида, депонированного под учетным номером ATCC PTA-10208, и профили жирных кислот вида, депонированного под учетным номером ATCC PTA-10208. В некоторых вариантах осуществления изолированные микроорганизмы изобретения имеют физические и химические свойства, по существу, идентичные свойствам микроорганизма, депонированного под учетным номером ATCC PTA-10208.

В некоторых вариантах осуществления изобретение имеет отношение к мутантному штамму микроорганизма, депонированного под учетным номером ATCC PTA-10208. В дополнительных вариантах осуществления мутантный штамм является штаммом, депонированным под учетным номером ATCC PTA-10209, PTA-10210 или PTA-10211. Микроорганизмы, имеющие отношение к учетным номерам ATCC PTA-10209, PTA-10210 и PTA-10211, были депонированы в соответствии с Будапештским договором 25 сентября 2009 г. в Американскую коллекцию типовых культур, Patent Depository, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209.

В некоторых вариантах осуществления изобретение имеет отношение к изолированному микроорганизму изобретения, который продуцирует фракцию триглицеридов, при этом содержание EPA во фракции триглицеридов составляет по меньшей мере около 12%, по меньшей мере около 13%, по меньшей мере около 14%, по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 16%, по меньшей мере около 17%, по меньшей мере около 18%, по меньшей мере около 19% или по меньшей мере около 20 вес.%. В некоторых вариантах осуществления изобретение имеет отношение к изолированному микроорганизму, который продуцирует фракцию триглицеридов, при этом содержание EPA во фракции триглицеридов составляет примерно от 12 до 55%, примерно от 12 до 50%, примерно от 12 до 45%, примерно от 12 до 40%, примерно от 12 до 35%, примерно от 12 до 30%, примерно от 15 до 45%, примерно от 15 до 40%, примерно от 15 до 35%, примерно от 15 до 30%, или примерно от 20 до 30 вес.%.

В некоторых вариантах осуществления изобретение имеет отношение к мутантной, вариантной или рекомбинантной форме изолированного микроорганизма изобретения, который продуцирует фракцию триглицеридов, при этом содержание EPA во фракции триглицеридов составляет по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 11%, по меньшей мере около 12%, по меньшей мере около 13%, по меньшей мере около 14%, по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 16%, по меньшей мере около 17%, по меньшей мере около 18%, по меньшей мере около 19% или по меньшей мере около 20 вес.%. В некоторых вариантах осуществления изобретение имеет отношение к мутантной, вариантной или рекомбинантной форме изолированного микроорганизма изобретения, который продуцирует фракцию триглицеридов, при этом содержание EPA во фракции триглицеридов составляет примерно от 12 до 55%, от 12 до 50%, от 12 до 45%, от 12 до 40%, от 12 до 35%, от 12 до 30%, от 15 до 55%, от 15 до 50%, от 15 до 45%, от 15 до 40%, от 15 до 35%, от 15 до 30%, от 20 до 55%, от 20 до 50%, от 20 до 45%, от 20 до 40%, от 20 до 35% или от 20 до 30 вес.%. Мутантные штаммы могут быть получены с помощью хорошо известных методов. Общеизвестные методы включают облучение, обработку при высоких температурах и обработку мутагеном. Вариантные штаммы могут быть другими природными изолятами и/или субизолатами описанного здесь вида. Рекомбинантные штаммы могут быть получены любыми хорошо известными в молекулярной биологии методами экспрессии экзогенных генов или изменения функции или экспрессии эндогенных генов. В некоторых вариантах осуществления мутантный, вариантный или рекомбинантный штамм продуцирует повышенное количество омега-3 жирных кислот, в частности EPA, по сравнению со штаммом дикого типа. В некоторых вариантах осуществления мутантный, вариантный или рекомбинантный штамм продуцируют пониженное количество одной или более жирных кислот, например, уменьшенные количества DHA, ARA, DPA n-6 или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления мутантный, вариантный или рекомбинантный штамм продуцирует больше сухого веса клеток на литр культуры, чем штамм дикого типа. Такие мутантные, вариантные или рекомбинантные штаммы являются примерами штаммов, происходящих от изолированного микроорганизма изобретения.

В некоторых вариантах осуществления изолированный микроорганизм изобретения, включая его мутантные, вариантные и рекомбинантные формы, содержит профиль жирных кислот в одной или более фракциях, выделенных из микроорганизма. Одна или более фракций, выделенных из микроорганизма, включают фракцию общих жирных кислот, фракцию сложных стероловых эфиров, фракцию триглицеридов, фракцию свободных жирных кислот, стерольную фракцию, фракцию диацилглицерина, полярную фракцию (включая фракцию фосфолипидов), и их комбинации. Профиль жирных кислот в конкретной фракции может включать какой-либо профиль жирных кислот, связанных с конкретной фракцией, как раскрывается в описании.

Изобретение имеет отношение к способу получения мутанта, включающему мутагенез какого-либо из микроорганизмов изобретения и изоляцию мутантного штамма.

Изобретение имеет отношение к культуре, содержащей один или более изолированных микроорганизмов изобретения. В данной области техники известны различные параметры ферментации для иноку-

лирования, выращивания и восстановления микрофлоры, такой как микроводоросли и траустохитридиевые. См., например, патент США № 5130242, полностью включенный в описание путем отсылки. Жидкая или твердая среда может содержать природную или искусственную морскую воду. Источники углерода для роста гетеротрофных микроорганизмов включают, но не ограничиваются этим, глюкозу, фруктозу, ксилозу, сахарозу, мальтозу, растворимый крахмал, мелассу, фукозу, глюкозамин, декстран, жиры, масла, глицерин, ацетат натрия и маннитол. Источники азота включают, но не ограничиваются этим, пептон, дрожжевой экстракт, полипептон, экстракт солода, мясной экстракт, казаминовую кислоту, жидкий кукурузный экстракт, источники органического азота, глутамат натрия, мочевины, источники неорганического азота, ацетат аммония, сульфат аммония, хлорид аммония и нитрат аммония.

Типичная среда для роста микроорганизма, депонированного под учетным номером ATCC PTA-10212, показана в табл. 1.

Таблица 1. Среда для роста PTA-10212

<u>Ингредиент</u>	<u>концентрация</u>	<u>пределы</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

После автоклавирования (металлы)

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

После автоклавирования (Витамины)

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:

<u>Ингредиент</u>	<u>Концентрация</u>
MSG·1H ₂ O	г/л 17 0-150, 10-100 или 15-50

Типичные условия культивирования могут включать следующие:

pH: примерно от 6,5 до 9,5; примерно от 6,5 до 8,0 или примерно от 6,5 до 7,8;
 температура: примерно от 15 до 30°C, примерно от 18 до 28°C или примерно от 21 до 23°C;
 растворенный кислород: примерно от 0,1 до 100% насыщения, примерно от 5 до 50% насыщения или примерно от 10 до 30% насыщения; и/или
 глицерин контролируемый @: примерно от 5 до 50 г/л, примерно от 10 до 40 г/л, или примерно от 15 до 35 г/л.

В некоторых вариантах осуществления микроорганизм, депонированный под учетным номером АТСС РТА-10212, или его мутантная, вариантная или рекомбинантная форма, растет гетеротрофно на глицерине в качестве источника углерода, но не растет на глюкозе в качестве источника углерода.

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

Таблица 2. Среда для роста РТА-10208

<u>Ингредиент</u>	<u>концентрация</u>	<u>пределы</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
Т 154 (дрожжевой экстракт)	г/л 1,0	0-20, 0,1-10 или 0,5-5
KN ₂ PO ₄	г/л 1,765	0,1-10, 0,5-5 или 1-3
<u>После автоклавирования (металлы)</u>		
Лимонная кислота	мг/л 46,82	0,1-5000, 10-3000 или 40-2500
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 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
<u>После автоклавирования (Витамины)</u>		
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
<u>После автоклавирования (Углерод)</u>		
Глюкоза	г/л 30,0	5-150, 10-100 или 20-50
<u>Азотистое питание:</u>		
<u>Ингредиент</u>	<u>Концентрация</u>	
NH ₄ OH	мл/л 23,6	0-150, 10-100 или 15-50

Типичные условия культивирования могут включать следующие:

pH примерно от 6,5 до 8,5, примерно от 6,5 до 8,0 или примерно от 7,0 до 8,0;

температура: примерно от 17 до 30°C, примерно от 20 до 28°C или примерно от 22 до 24°C;

растворенный кислород: примерно от 2 до 100% насыщения, примерно от 5 до 50% насыщения или примерно от 7 до 20% насыщения; и/или

глюкоза контролируемая @: примерно от 5 до 50 г/л, примерно от 10 до 40 г/л или примерно от 20 до 35 г/л.

В некоторых вариантах осуществления культуральная среда содержит по меньшей мере около 0,1%, по меньшей мере около 0,5%, по меньшей мере около 1%, по меньшей мере около 1,5%, по меньшей мере около 2%, по меньшей мере около 5%, по меньшей мере около 7%, по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80% или по меньшей мере около 90% растворенного кислорода в процентах от уровня насыщения. В некоторых вариантах осуществления культуральная среда содержит примерно от 0,1 до 2%, примерно от 0,1 до 5%, примерно от 0,1 до 10%, примерно от 0,1 до 20%, примерно от 0,1 до 30%, примерно от 0,1 до 50%, примерно от 0,1 до 100%, примерно от 5 до 10%, примерно от 5 до 20%, примерно от 5 до 30%, примерно от 5 до 50%, примерно от 5 до 100%, примерно от 7 до 10%, примерно от 7 до 20%, примерно

от 7 до 30%, примерно от 7 до 50%, примерно от 7 до 100%, примерно от 10 до 20%, примерно от 10 до 30%, примерно от 10 до 50%, примерно от 10 до 100%, примерно от 20 до 30%, примерно от 20 до 50% или примерно от 20 до 100% растворенного кислорода в процентах от уровня насыщения.

Изобретение имеет отношение к изолированной биомассе микроорганизма изобретения. Изолированная биомасса изобретения представляет собой собранную клеточную биомассу, полученную с помощью любого общепринятого метода отделения биомассы, такого как описанный в США патенте № 5130242 и в опубликованной заявке США № 2002/0001833, которые полностью включаются в описание путем отсылки.

В некоторых вариантах осуществления сухой вес клеток биомассы, выделенной из каждого литра культуры составляет по меньшей мере около 10 г, по меньшей мере около 15 г, по меньшей мере около 20 г, по меньшей мере около 25 г, по меньшей мере около 30 г, по меньшей мере около 50 г, по меньшей мере около 60 г, по меньшей мере около 70 г, по меньшей мере около 80 г, по меньшей мере около 100 г, по меньшей мере около 120 г, по меньшей мере около 140 г, по меньшей мере около 160 г, по меньшей мере около 180 г или по меньшей мере около 200 г после выращивания в течение примерно от 6 дней до 8 дней, при температуре примерно от 15 до 30°C, в культуральной среде со значением pH примерно от 6,5 до 9,5, содержащей источники углерода, азота и питательных веществ, и примерно от 950 ppm (миллионных долей) до 8500 ppm ионов хлора. В некоторых вариантах осуществления сухой вес клеток биомассы, выделенной из каждого литра культуры, составляет по меньшей мере около 10 г, по меньшей мере около 15 г, по меньшей мере около 20 г, по меньшей мере около 25 г, по меньшей мере около 30 г, по меньшей мере около 50 г, по меньшей мере около 60 г, по меньшей мере около 70 г, по меньшей мере около 80 г, по меньшей мере около 100 г, по меньшей мере около 120 г, по меньшей мере около 140 г, по меньшей мере около 160 г, по меньшей мере около 180 г или по меньшей мере около 200 г после выращивания в течение примерно 6 дней, примерно 7 дней или примерно 8 дней примерно при 15°C, примерно при 16°C, примерно при 17°C, примерно при 18°C, примерно при 19°C, примерно при 20°C, примерно при 21°C, примерно при 22°C, примерно при 23°C, примерно при 24°C, примерно при 25°C, примерно при 26°C, примерно при 27°C, примерно при 28°C, примерно при 29°C или примерно при 30°C в культуральной среде при значении pH около 6,5, около pH 7, около pH 7,5, около pH 8,0, около pH 8,5, около pH 9 или около pH 9,5, содержащей источники углерода, азота и питательных веществ, и примерно от 950 ppm до 8500 ppm ионов хлора. В некоторых вариантах осуществления сухой вес клеток биомассы, выделенной из каждого литра культуры, составляет примерно от 10 г до 200 г после выращивания в течение примерно от 6 до 8 дней при температуре примерно от 15 до 30°C в культуральной среде при значении pH примерно от 6,5 до pH 9,5, содержащей источники углерода, азота и питательных веществ, и примерно от 950 до 8500 ppm ионов хлора. В некоторых вариантах осуществления сухой вес клеток биомассы, выделенной из каждого литра культуры, составляет примерно от 10 до 200 г, примерно от 10 до 100 г, примерно от 10 до 50 г, примерно от 15 до 200 г, примерно от 15 до 100 г, примерно от 15 до 50 г, примерно от 20 до 200 г, примерно от 20 до 100 г, примерно от 20 до 50 г, примерно от 50 до 200 г или примерно от 50 до 100 г после выращивания в течение около 6, около 7 или около 8 дней при температуре около 15, около 16, около 17, около 18, около 19, около 20, около 21, около 22, около 23, около 24, около 25, около 26, около 27, около 28, около 29 или около 30°C в культуральной среде при значении pH около 6,5, около pH 7, около pH 7,5, около pH 8,0, около pH 8,5, около pH 9, или около pH 9,5, содержащей источники углерода, азота и питательных веществ, и примерно от 950 до 8500 ppm ионов хлора. В некоторых вариантах осуществления изолированная культура не содержит поливинилпирролидон.

В некоторых вариантах осуществления изолированная культура имеет продуктивность омега-3 жирной кислоты по меньшей мере около 0,2 г/л/день, по меньшей мере около 0,3 г/л/день, по меньшей мере около 0,4 г/л/день, по меньшей мере около 0,5 г/л/день, по меньшей мере около 1 г/л/день, по меньшей мере около 1,2 г/л/день, по меньшей мере около 1,5 г/л/день, по меньшей мере около 1,7 г/л/день, по меньшей мере около 2 г/л/день, по меньшей мере около 3 г/л/день, по меньшей мере около 3,5 г/л/день, по меньшей мере около 4 г/л/день, по меньшей мере около 4,5 г/л/день, по меньшей мере около 5 г/л/день, по меньшей мере около 6 г/л/день или по меньшей мере около 8 г/л/день после выращивания в течение примерно 6, примерно 7 или примерно 8 дней при температуре примерно от 15 до 30°C в культуральной среде при значении примерно от pH 6,5 до pH 8,5 или примерно от pH 6,5 до pH 9,5, содержащей источники углерода, азота и питательные вещества, и примерно от 950 до 8500 ppm ионов хлора. В некоторых вариантах осуществления изолированная культура имеет продуктивность омега-3 жирной кислоты примерно от 0,2 до 20 г/л/день, примерно от 0,4 до 20 г/л/день, примерно от 0,4 до 2 г/л/день, примерно от 1 до 2 г/л/день, примерно от 1 до 20 г/л/день, примерно от 2 до 15 г/л/день, примерно от 2 до 10 г/л/день, примерно от 3 до 10 г/л/день, примерно от 4 до 9 г/л/день, примерно от 4 до 8 г/л/день, примерно от 4 до 7 г/л/день или примерно от 4 до 6 г/л/день после выращивания в течение примерно 6, примерно 7 или примерно 8 дней при температуре примерно от 15 до 30°C в культуральной среде со значением pH примерно от pH 6,5 до pH 9,5, содержащей источники углерода, азота и питательные вещества, и примерно от 950 до 8500 ppm ионов хлора.

В некоторых вариантах осуществления ЕРА-продуктивность изолированной культуры составляет по меньшей мере около 0,2 г/л/день, по меньшей мере около 0,3 г/л/день, по меньшей мере около 0,4

г/л/день, по меньшей мере около 0,5 г/л/день, по меньшей мере около 0,6 г/л/день, по меньшей мере около 0,7 г/л/день, по меньшей мере около 0,8 г/л/день, по меньшей мере около 0,9 г/л/день по меньшей мере около 1 г/л/день, по меньшей мере около 1,2 г/л/день, по меньшей мере около 1,5 г/л/день, по меньшей мере около 1,7 г/л/день, по меньшей мере около 2 г/л/день, по меньшей мере около 3 г/л/день, по меньшей мере около 4 г/л/день или по меньшей мере около 5 г/л/день после выращивания в течение примерно 6, примерно 7 или примерно 8 дней при температуре примерно от 15 до 30°C в культуральной среде со значением pH примерно от pH 6,5 до pH 8,5 или примерно от pH 6,5 до pH 9,5, содержащей источники углерода, азота и питательные вещества, и примерно от 950 до 8500 ppm ионов хлора. В некоторых вариантах осуществления ЕРА-продуктивность составляет примерно от 0,2 до 5 г/л/день, от 0,2 до 4 г/л/день, от 0,2 до 3 г/л/день, от 0,2 до 2 г/л/день, от 0,2 до 1 г/л/день, от 0,2 до 0,8 г/л/день, от 0,2 до 0,7 г/л/день, от 1 до 5 г/л/день, от 1 до 4 г/л/день, от 1 до 3 г/л/день или от 1 до 2 г/л/день после выращивания в течение примерно 6, примерно 7 или примерно 8 дней при температуре примерно от 15 до 30°C в культуральной среде со значением pH примерно от pH 6,5 до pH 8,5 или примерно от pH 6,5 до pH 9,5, содержащей источники углерода, азота и питательные вещества, и примерно от 950 до 8500 ppm ионов хлора. В некоторых вариантах осуществления любая вышеупомянутая ЕРА-продуктивность связана с продуктивностью какой-либо из вышеупомянутых омега-3 жирных кислот. В некоторых вариантах осуществления культура дополнительно имеет ДНА-продуктивность примерно от 0 до 5 г/л/день, от 0 до 4 г/л/день, от 0 до 3 г/л/день, от 0 до 2 г/л/день, от 0 до 1 г/л/день, от 0,2 до 5 г/л/день, от 0,2 до 4 г/л/день, от 0,2 до 3 г/л/день, от 0,2 до 2 г/л/день, от 0,2 до 1 г/л/день, от 1 до 5 г/л/день, от 2 до 5 г/л/день, от 2 до 4 г/л/день или примерно от 2 до 3 г/л/день. В некоторых вариантах осуществления ДНА-продуктивность составляет менее чем примерно 5 г/л/день, менее чем около 4 г/л/день, менее чем около 3 г/л/день, менее чем около 2 г/л/день, менее чем около 1 г/л/день, менее чем около 0,5 г/л/день, менее чем около 0,2 г/л/день или около 0 г/л/день.

В некоторых вариантах осуществления объем ферментации (выращивания) (объем культуры) составляет по меньшей мере около 2 л, по меньшей мере около 10 л, по меньшей мере около 50 л, по меньшей мере около 100 л, по меньшей мере около 200 л, по меньшей мере около 500 л, по меньшей мере, около 1000 л, по меньшей мере около 10,000 л, по меньшей мере около 20,000 л, по меньшей мере около 50,000 л, по меньшей мере около 100,000 л, по меньшей мере около 150,000 л, по меньшей мере около 200,000 л или по меньшей мере около 250,000 л. В некоторых вариантах осуществления объем ферментации составляет примерно от 2 до 300,000 л, около 2 л, около 10 л, около 50 л, около 100 л, около 200 л, около 500 л, около 1000 л, около 10,000 л, около 20,000 л, около 50,000 л, около 100,000 л, около 150,000 л, около 200,000 л, около 250,000 или около 300,000 л.

В некоторых вариантах осуществления изобретение имеет отношение к изолированной биомассе, содержащей профиль жирных кислот изобретения. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 25%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 55%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75% или по меньшей мере около 80% сухого веса клеток биомассы составляют жирные кислоты. В некоторых вариантах осуществления более чем около 20%, более чем около 25%, более чем около 30%, более чем около 35%, более чем около 40%, более чем около 45%, более чем около 50%, более чем около 55% или более чем около 60% сухого веса клеток биомассы составляют жирные кислоты. В некоторых вариантах осуществления примерно от 20 до 55%, примерно от 20 до 60%, примерно от 20 до 70%, примерно от 20 до 80%, примерно от 30 до 55%, примерно от 30 до 70%, примерно от 30 до 80%, примерно от 40 до 60%, примерно от 40 до 70%, примерно от 40 до 80%, примерно от 50 до 60%, примерно от 50 до 70%, примерно от 50 до 80%, примерно от 55 до 70%, примерно от 55 до 80%, примерно от 60 до 70% или примерно от 60 до 80 вес.% сухого веса клеток биомассы составляют жирные кислоты. В некоторых вариантах осуществления биомасса содержит более чем около 10%, по меньшей мере около 12%, по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 25%, по меньшей мере, около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере, около 40% или по меньшей мере около 45 вес.% жирных кислот, таких как ЕРА. В некоторых вариантах осуществления биомасса содержит примерно от 10 до 55%, от 12 до 55%, от 15 до 55%, от 20 до 55%, от 20 до 40% или от 20 до 30 вес.% жирных кислот, таких как ЕРА. В некоторых вариантах осуществления биомасса содержит фракцию триглицеридов, в которой по меньшей мере около 12%, по меньшей мере около 13%, по меньшей мере около 14%, по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 16%, по меньшей мере около 17%, по меньшей мере около 18%, по меньшей мере около 19% или по меньшей мере около 20 вес.% фракции триглицеридов составляет ЕРА. В некоторых вариантах осуществления биомасса содержит фракцию триглицеридов, при этом содержание ЕРА во фракции триглицеридов составляет по меньшей мере примерно от 12 до 55%, примерно от 12 до 50%, примерно от 12 до 45%, по меньшей мере примерно от 12 до 40%, по меньшей мере примерно от 12 до 35% или по меньшей мере примерно от 12 до 30%, примерно от 15 до 55%, примерно от 15 до 50%, примерно от 15 до 45%, примерно от 15 до 40%, примерно от 15 до 35%, примерно от 15 до 30%, примерно от 20 до 55%, примерно от 20 до 50%, примерно от 20 до 45%, по меньшей мере примерно от 20 до 40%, по меньшей мере примерно от 20 до 35% или примерно от 20 до

30 вес.%. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 25%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50% или по меньшей мере около 60 вес.% сухого веса клеток биомассы составляет ДНА. В некоторых вариантах осуществления примерно от 20 до 60%, от 25 до 60%, от 25 до 50%, от 25 до 45%, от 30 до 50%, или от 35 до 50 вес.% сухого веса клеток биомассы составляет НА. В некоторых вариантах осуществления биомасса составляет около 10% или менее, около 9% или менее, около 8% или менее, около 7% или менее, около 6% или менее, около 5% или менее, около 4% или менее, около 3% или менее, около 2% или менее или около 1% или менее по весу жирных кислот, таких как ДНА. В некоторых вариантах осуществления биомасса содержит примерно от 1 до 10%, от 1 до 5%, от 2 до 5%, от 3 до 5% или от 3 до 10% по весу жирных кислот, таких как ДНА. В некоторых вариантах осуществления биомасса фактически не содержит ДНА. В некоторых вариантах осуществления биомасса содержит примерно от 0,1% до менее, чем около 5%, примерно от 0,1 до 4%, примерно от 0,1 до 3%, примерно от 0,1 до 2%, примерно от 0,2 до менее, чем около 5%, примерно от 0,2 до 4%, примерно от 0,2 до 3%, примерно от 0,2 до 2%, примерно от 0,3 до 2%, примерно от 0,1 до 0,5%, примерно от 0,2 до 0,5%, примерно от 0,1 до 0,4%, примерно от 0,2 до 0,4%, примерно от 0,5 до 2%, примерно от 1 до 2%, примерно от 0,5 до 1,5%, или примерно от 1 до 1,5% по весу жирных кислот, таких как АРА. В некоторых вариантах осуществления биомасса содержит менее, чем около 5%, около 4% или менее, около 3% или менее, около 2% или менее, около 1,5% или менее, около 1% или менее, около 0,5% или менее, около 0,4% или менее, около 0,3% или менее, около 0,2% или менее, или около 0,1% или менее по весу жирных кислот, таких как АРА. В некоторых вариантах осуществления биомасса фактически не содержит АРА. В некоторых вариантах осуществления биомасса содержит примерно от 0,4 до 2%, примерно от 0,4 до 3%, примерно от 0,4 до 4%, примерно от 0,4 до 5%, примерно от 0,4 до менее чем около 5%, примерно от 0,5 до 1%, примерно от 0,5 до 2%, примерно от 0,5 до 3%, примерно от 0,5 до 4%, примерно от 0,5 до 5%, примерно от 0,5 до менее чем около 5%, примерно от 1 до 2%, примерно от 1 до 3%, примерно от 1 до 4%, примерно от 1 до 5% или примерно от 1 до менее чем около 5% по весу жирных кислот, таких как ДРА n-6. В некоторых вариантах осуществления биомасса содержит около 5% или менее, менее чем около 5%, около 4% или менее, около 3% или менее, около 2% или менее, около 1% или менее, около 0,75% или менее, около 0,6% или менее или около 0,5% или менее по весу жирных кислот, таких как ДРА n-6. В некоторых вариантах осуществления биомасса фактически не содержит ДРА n-6. В некоторых вариантах осуществления биомасса содержит жирные кислоты, причем около 5% или менее, менее чем около 5%, около 4% или менее, около 3% или менее или около 2% или менее по весу 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 с эндогенными или нативными свойствами выделенной биомассы, а не с веществами, введенными экзогенно. В некоторых вариантах осуществления выделенная биомасса не содержит поливинилпирролидон или не выделяется из культуры, содержащей поливинилпирролидон.

Настоящее изобретение имеет отношение к способу получения биомассы. В некоторых вариантах осуществления способ получения биомассы изобретения включает выращивание какого-либо из изолированных микроорганизмов изобретения или их смесей в культуре с целью получения биомассы. Настоящее изобретение имеет отношение к биомассе, полученной таким способом.

Изобретение имеет отношение к микробному маслу, содержащему профиль жирных кислот изобретения. Микробное масло изобретения является "сырым (неочищенным) маслом" или "рафинированным маслом", содержащим фракцию триглицеридов, составляющую по меньшей мере около 35 вес.%. "Сырое масло" является маслом, извлеченным из биомассы микроорганизма без дополнительной обработки. "Рафинированное масло" представляет собой масло, полученное после стандартной обработки неочищенного масла путем очищения, осветления и/или дезодорирования. См., например, патент США № 5130242, полностью включенный в данное описание путем отсылки. Описанное здесь микробное масло также включает "готовое (конечное) масло", которое является рафинированным маслом, разбавленным растительным маслом. В некоторых вариантах осуществления конечное масло является рафинированным маслом, разбавленным подсолнечным маслом с высоким содержанием олеиновой кислоты. Используемый в описании термин "микробный" включает, но не ограничивается этим, термины "микроводоросли," "траустохитридиевые" и таксономические классификации, имеющие отношение к любому из депонированных микроорганизмов, описанных здесь. Термины "траустохитриевые," "траустохитридиевые," "Schizochytrium" и "Thraustochytrium", использованные в отношении какого-либо из микроорганизмов изобретения, включая описанные здесь депонированные микроорганизмы, основываются на современных таксономических классификациях, включающих доступную филогенетическую информацию, и не предназначены для ограничения в том случае, когда таксономические классификации пересматриваются после даты подачи настоящей заявки.

В некоторых вариантах осуществления описанные жирные кислоты могут быть сложными эфирами жирных кислот. В некоторых вариантах осуществления сложные эфиры жирных кислот включают сложный эфир омега-3 жирной кислоты, омега-6 жирной кислоты и их комбинации. В некоторых вариантах

осуществления сложный эфир жирной кислоты является сложным эфиром ДНА, сложным эфиром ЕРА или их комбинацией. В некоторых вариантах осуществления масло или его фракцию, описанную здесь, этерифицируют для получения масла или его фракции, содержащей сложные эфиры жирных кислот. Термин "сложный эфир" имеет отношение к замещению водорода в карбоксильной группе молекулы жирной кислоты другим заместителем. Типичные сложные эфиры известны в данной области техники, обсуждение предоставляется в работе Higuchi, T. and V. Stella in *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, and *Protective Groups in Organic Chemistry*, McOmie ed., Plenum Press, New York, 1973. Примеры сложных эфиров включают метиловый, этиловый, пропиловый, бутиловый, пентиловый, третбутиловый, бензиловый, нитробензиловый, метоксибензиловый, бензгидриловый эфир и трихлорэтиловый эфир. В некоторых вариантах осуществления сложный эфир представляет собой защитную сложноэфирную группу карбоновой кислоты, сложные эфиры с алкилом (например, бензил, фенол), сложные эфиры с низшим алкилом (например, аллил, 2-бутенил), сложные эфиры с низшей алкоксигруппой и низшим алкилом (например, метоксиметил, 2-метоксиэтил, 2-этоксиэтил), сложные эфиры с низшей алканоилоксигруппой и низшим алкилом (например, ацетоксиметил, пивалоилоксиметил, 1-пивалоилоксиэтил), сложные эфиры с низшим алкоксикарбонилем и низшим алкилом (например, метоксикарбонилметил, изопропоксикарбонилметил), сложные эфиры с карбокси-низшим алкилом (например, карбоксиметил), сложные эфиры с низшей алкоксикарбонилоксигруппой и низшим алкилом (например, 1-(этоксикарбонилокси)этил, 1-(циклогексикарбонилокси)этил), сложные эфиры с карбамоилокси-низшим алкилом (например, карбамоилоксиметил) и т.п. В некоторых вариантах осуществления включенный заместитель является линейной или циклической углеводородной группой, например, C₁-C₆ алкилом, C₁-C₆ циклоалкилом, C₁-C₆ алкенилом или C₁-C₆ ариловым эфиром. В некоторых вариантах осуществления сложный эфир является сложным алкиловым эфиром, например, сложным метиловым эфиром, сложным этиловым эфиром или сложным пропиловым эфиром. В некоторых вариантах осуществления сложноэфирный заместитель добавляется к молекуле свободной жирной кислоты, когда жирная кислота находится в очищенном или полуочищенном состоянии. Альтернативно, сложный эфир жирной кислоты образуется после преобразования триглицерида в сложный эфир.

Настоящее изобретение имеет отношение к способам получения микробных масел. В некоторых вариантах осуществления данный способ включает выращивание любого из изолированных микроорганизмов изобретения или их смесей в культуре с целью получения микробного масла, содержащего омега-3 жирные кислоты. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает экстрагирование микробного масла. В некоторых вариантах осуществления способ включает экстрагирование микробного масла, содержащего омега-3 жирные кислоты, из какой-либо биомассы изобретения или их смесей. В некоторых вариантах осуществления способ включает гетеротрофное выращивание изолированного микроорганизма, при этом культура содержит источник углерода, как описано здесь. Микробное масло может извлекаться из свежесобранной биомассы или может извлекаться из ранее собранной биомассы, которая хранится в условиях, предотвращающих порчу. Для культивирования микроорганизма изобретения, для отделения биомассы от культуры, для извлечения микробного масла из биомассы и для исследования профиля жирных кислот в маслах, извлеченных из биомассы, могут использоваться известные методы. См. например, патент США № 5130242, полностью включенной в описание путем отсылки. Изобретение имеет отношение к микробному маслу, полученному с помощью любого из способов изобретения.

В некоторых вариантах осуществления микробное масло извлекается с помощью метода ферментной экстракции. В некоторых вариантах осуществления микробное масло извлекается методом механической экстракции. В некоторых вариантах осуществления метод механической экстракции включает одно или более из следующего: (1) обработка пастеризованного ферментативного бульона в гомогенизаторе для оказания содействия лизису клеток и высвобождению масла из клеток; (2) добавление к ферментативному бульону изопропилового спирта с последующей гомогенизацией с целью расслоения масляной и водной эмульсии; (3) центрифугирование смеси для восстановления масляной фазы и (4) высушивание в вакууме с добавлением антиоксидантов. В некоторых вариантах осуществления сырое масло является очищенным. В некоторых вариантах осуществления очистка сырого масла включает одно или более из следующего: (1) перекачку сырого масла в рафинировочный котел и нагревание масла, с последующим добавлением кислого раствора при перемешивании; (2) добавление раствора каустика к маслу после кислотной обработки; (3) повторный нагрев сырого масла, а затем центрифугирование для отделения тяжелой фазы от рафинированного масла; (4) удаление оставшихся полярных соединений, следовых металлов и продуктов окисления из рафинированного масла, например, с использованием кислоты, Tri-Syl®, глины и/или фильтрования; (5) холодное фильтрование отбеленного масла для дополнительного удаления из масла компонентов с высокой температурой плавления для достижения желательного уровня очистки; (6) нагревание масла, после чего масло охлаждают и выдерживают в течение периода времени, в течение которого происходит кристаллизация триглицеридов с высокой точкой плавления и восков; (7) добавление вспомогательного фильтровального вещества к охлажденному маслу, а затем удаление кристаллических твердых веществ фильтрованием; (8) использование дезодоратора после холодного

фильтрации, действующего при высокой температуре и в вакууме, для удаления, например, перекисей и оставшихся соединений с низким молекулярным весом, которые могут вызывать посторонний запах и вкус; (9) перенесение масла в дезодорационный питательный резервуар, деаэрирование и дезодорирование, например, в дезодораторе с наполненной колонкой; и (10) охлаждение, например, в атмосфере азота в конце цикла дезодорирования и добавление подходящих антиоксидантов к дезодорированному маслу для обеспечения устойчивости к окислению.

В некоторых вариантах осуществления микробное масло содержит фракцию сложных стероловых эфиров около 0%, по меньшей мере около 0,1%, по меньшей мере около 0,2%, по меньшей мере около 0,5%, по меньшей мере около 1%, по меньшей мере около 1,5%, по меньшей мере около 2% или по меньшей мере около 5 вес.%. В некоторых вариантах осуществления микробное масло содержит фракцию сложных стероловых эфиров примерно от 0 до 1,5%, от 0 до 2%, от 0 до 5%, от 1 до 1,5, от 0,2 до 1,5%, от 0,2 до 2% или примерно от 0,2 до 5%. В некоторых вариантах осуществления микробное масло содержит фракцию сложных стероловых эфиров примерно около 5% или менее, около 4% или менее, около 3% или менее, около 2% или менее, около 1% или менее, около 0,5% или менее, около 0,3% или менее, около 0,2% или менее, около 0,5% или менее, около 0,4% или менее, около 0,3% или менее или около 0,2% или менее по весу.

В некоторых вариантах осуществления микробное масло содержит фракцию триглицеридов, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 55%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85% или по меньшей мере около 90 вес.%. В некоторых вариантах осуществления микробное масло содержит фракцию триглицеридов примерно от 35 до 98%, примерно от 35 до 90%, примерно от 35 до 80%, примерно от 35 до 70%, примерно от 35 до 70%, примерно от 35 до 65%, примерно от 40 до 70%, примерно от 40 до 65%, примерно от 40 до 55%, примерно от 40 до 50%, примерно от 65 до 95%, примерно от 75 до 95%, примерно от 75 до 98%, примерно от 80 до 95%, примерно от 80 до 98%, примерно от 90 до 96%, примерно от 90 до 97%, примерно от 90 до 98%, около 90, около 95, около 97 или около 98 вес.%. В некоторых вариантах осуществления микробное масло содержит фракцию диацилглицерина, по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 11%, по меньшей мере около 12%, по меньшей мере около 13%, по меньшей мере около 14%, по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 16%, по меньшей мере около 17%, по меньшей мере около 18%, по меньшей мере около 19% или по меньшей мере около 20 вес.%. В некоторых вариантах осуществления микробное масло содержит фракцию диацилглицерина примерно от 10 до 45%, примерно от 10 до 40%, примерно от 10 до 35%, примерно от 10 до 30%, примерно от 15 до 40%, примерно от 15 до 35% или от 15 до 30 вес.%. В некоторых вариантах осуществления микробное масло содержит фракцию 1,2-диацилглицерина, по меньшей мере около 0,2%, по меньшей мере около 0,3%, по меньшей мере около 0,4%, по меньшей мере около 0,5%, по меньшей мере около 1%, по меньшей мере около 5%, по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 11%, по меньшей мере около 12%, по меньшей мере около 13%, по меньшей мере около 14%, по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 16%, по меньшей мере около 17%, по меньшей мере около 18%, по меньшей мере около 19% или по меньшей мере около 20 вес.%. В некоторых вариантах осуществления микробное масло содержит фракцию диацилглицерина примерно от 0,2 до 45%, от 0,2 до 30%, от 0,2 до 20%, от 0,2 до 10%, от 0,2 до 5%, от 0,2 до 1%, от 0,2 до 0,8%, от 0,4 до 45%, от 0,4 до 30%, от 0,4 до 20%, от 0,4 до 10%, от 0,4 до 5%, от 0,4 до 1%, от 0,4 до 0,8%, от 0,5 до 1%, от 0,5 до 0,8%, от 10 до 45%, от 10 до 40%, от 10 до 35%, от 10 до 30%, от 15 до 40%, от 15 до 35%, от 15 до 30% или примерно от 15 до 25 вес.%. В некоторых вариантах осуществления микробное масло содержит фракцию 1,3-диацилглицерина по меньшей мере около 0,1%, по меньшей мере около 0,2%, по меньшей мере около 0,5%, по меньшей мере около 1%, по меньшей мере около 2%, по меньшей мере около 2,5% или по меньшей мере около 3 вес.%. В некоторых вариантах осуществления микробное масло содержит стерольную фракцию по меньшей мере около 0,3%, по меньшей мере около 0,4%, по меньшей мере около 0,5%, по меньшей мере около 1%, по меньшей мере около 1,5%, по меньшей мере около 2% или по меньшей мере около 5 вес.%. В некоторых вариантах осуществления микробное масло содержит стерольную фракцию примерно от 0,3 до 5%, от 0,3 до 2%, от 0,3 до 1,5%, от 0,5 до 1,5%, от 1 до 1,5%, от 0,5 до 2%, от 0,5 до 5%, от 1 до 2% или от 1 до 5 вес.%. В некоторых вариантах осуществления микробное масло содержит стерольную фракцию около 5% или менее, около 4% или менее, около 3% или менее, около 2% или менее, около 1,5% или менее, или около 1% или менее по весу.

В некоторых вариантах осуществления микробное масло содержит фракцию фосфолипидов по меньшей мере около 2%, по меньшей мере около 5% или по меньшей мере около 8 вес.%. В некоторых вариантах осуществления микробное масло содержит фракцию фосфолипидов примерно от 2 до 25%, от 2 до 20%, от 2 до 15%, от 2 до 10%, от 5 до 25%, от 5 до 20%, от 5 до 10% или от 7 до 9% по весу. В некоторых вариантах осуществления микробное масло содержит фракцию фосфолипидов менее чем около 20%, менее чем около 15%, менее чем около 10%, менее чем около 9% или менее чем около 8

вес.%. В некоторых вариантах осуществления микробное масло практически не содержит фосфолипидов. В некоторых вариантах осуществления микробное масло содержит неомыляемые вещества менее чем около 2%, менее чем около 1,5%, менее чем около 1%, или менее чем около 0,5% от веса масла. Классы липидов, присутствующих в микробном масле, такие как фракция триглицеридов, могут быть отделены с помощью флэш-хроматографии и исследованы с помощью тонкослойной хроматографии (TLC), или отделены и исследованы с помощью других методов, известных в данной области техники.

В некоторых вариантах осуществления микробное масло и/или одна или более его фракций, выбранных из фракции триглицеридов, фракции свободных жирных кислот, стерольной фракции, фракции диацилглицерина и их комбинаций, содержит по меньшей мере около 5%, по меньшей мере около 10%, более чем около 10%, по меньшей мере около 12%, по меньшей мере около 13%, по меньшей мере около 14%, по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 16%, по меньшей мере около 17%, по меньшей мере около 18%, по меньшей мере около 19%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 25%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40% или по меньшей мере около 45 вес.% EPA. В некоторых вариантах осуществления микробное масло и/или одна или более его фракций, выбранных из фракции триглицерида, фракции свободных жирных кислот, стерольной фракции, фракции диацилглицерина и их комбинаций, содержит примерно от 5 до 55%, от 5 до 50%, от 5 до 45%, от 5 до 40%, от 5 до 35%, от 5 до 30%, от 10 до 55%, от 10 до 50%, от 10 до 45%, от 10 до 40%, от 10 до 35%, от 10 до 30%, по меньшей мере от 12 до 55%, по меньшей мере от 12 до 50%, по меньшей мере от 12 до 45%, по меньшей мере от 12 до 40%, по меньшей мере от 12 до 35% или по меньшей мере от 12 до 30%, от 15 до 55%, от 15 до 50%, от 15 до 45%, от 15 до 40%, от 15 до 35%, от 15 до 30%, от 15 до 25%, от 15 до 20%, от 20 до 55%, от 20 до 50%, от 20 до 45%, от 20 до 40% или от 20 до 30% по весу EPA. В некоторых вариантах осуществления микробное масло и/или одна или более его фракций, выбранных из фракции триглицеридов, фракции диацилглицерина, стерольной фракции, фракции сложных стероловых эфиров, фракции свободных жирных кислот, фракции фосфолипидов и их комбинаций, содержат по меньшей мере около 5%, по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 25%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50% или по меньшей мере около 60% по весу DHA. В некоторых вариантах осуществления микробное масло и/или одна или более его фракций, выбранных из фракции триглицеридов, фракции диацилглицерина, стерольной фракции, фракции сложных стероловых эфиров, фракции свободных жирных кислот, фракции фосфолипидов и их комбинаций содержит примерно от 5 до 60%, от 5 до 55%, от 5 до 50%, от 5 до 40%, от 10 до 60%, от 10 до 50%, от 10 до 40%, от 20 до 60%, от 25 до 60%, от 25 до 50%, от 25 до 45%, от 30 до 50%, от 35 до 50% или от 30 до 40% по весу DHA. В некоторых вариантах осуществления микробное масло и/или одна или более его фракций, выбранных из фракции триглицеридов, фракции диацилглицерина, стерольной фракции, фракции сложных стероловых эфиров, фракции свободных жирных кислот, фракции фосфолипидов и их комбинаций, содержит около 10% или менее, около 9% или менее, около 8% или менее, около 7% или менее, около 6% или менее, около 5% или менее, около 4% или менее, около 3% или менее, около 2% или менее, или около 1% или менее по весу DHA. В некоторых вариантах осуществления микробное масло и/или одна или более его фракций, выбранных из фракции триглицеридов, фракции диацилглицерина, стерольной фракции, фракции сложных стероловых эфиров, фракции свободных жирных кислот, фракции фосфолипидов и их комбинаций, содержит примерно от 1 до 10%, от 1 до 5%, от 2 до 5%, от 3 до 5% или от 3 до 10% по весу жирных кислот, таких как DHA. В некоторых вариантах осуществления микробное масло и/или одна или более его фракций, выбранных из фракции триглицеридов, фракции диацилглицерина, стерольной фракции, фракции сложных стероловых эфиров, фракции свободных жирных кислот, фракции фосфолипидов и их комбинаций, практически не содержит DHA. В некоторых вариантах осуществления микробное масло и/или одна или более его фракций, выбранных из фракции триглицеридов, фракции диацилглицерина, стерольной фракции, фракции сложных стероловых эфиров, фракции свободных жирных кислот, фракции фосфолипидов и их комбинаций, содержит примерно от 0,1 до 5%, примерно от 0,1 до менее чем около 5%, от 0,1 до 4%, от 0,1 до 3%, от 0,1 до 2%, от 0,2 до 5%, от 0,2 до менее чем около 5%, от 0,2 до 4%, от 0,2 до 3%, от 0,2 до 2%, от 0,3 до 2%, от 0,1 до 0,5%, от 0,2 до 0,5%, от 0,1 до 0,4%, от 0,2 до 0,4%, от 0,5 до 2%, от 1 до 2%, от 0,5 до 1,5% или от 1 до 1,5% по весу ARA. В некоторых вариантах осуществления микробное масло и/или одна или более его фракций, выбранных из фракции триглицеридов, фракции диацилглицерина, стерольной фракции, фракции сложных стероловых эфиров, фракции свободных жирных кислот, фракции фосфолипидов и их комбинаций, содержит около 5% или менее, менее чем около 5%, около 4% или менее, около 3% или менее, около 2% или менее, около 1,5% или менее, около 1% или менее, около 0,5% или менее, около 0,4% или менее, около 0,3% или менее, около 0,2% или менее или около 0,1% или менее по весу ARA. В некоторых вариантах осуществления микробное масло и/или одна или более его фракций, выбранных из фракции триглицеридов, фракции диацилглицерина, стерольной фракции, фракции сложных стероловых эфиров, фракции свободных жирных кислот, фракции фосфолипидов и их комбинаций практически не содержит ARA. В некоторых вариантах осуществления микробное масло и/или одна или более его фракций, выбранных из фракции триглицеридов, фракции диацилглицерина, стерольной фракции, фракции сложных

стероловых эфиров, фракции свободных жирных кислот, фракции фосфолипидов и их комбинаций, содержит примерно от 0,4 до 2%, от 0,4 до 3%, от 0,4 до 4%, от 0,4 до 5%, от 0,4 до менее чем около 5%, от 0,5 до 1%, от 0,5 до 2%, от 0,5 до 3%, от 0,5 до 4%, от 0,5 до 5%, от 0,5 до менее чем около 5%, от 1 до 2%, от 1 до 3%, от 1 до 4%, от 1 до 5% или от 1 до менее чем около 5% по весу DPA n-6. В некоторых вариантах осуществления микробное масло и/или одна или более его фракций, выбранных из фракции триглицеридов, фракции диацилглицерина, стерольной фракции, фракции сложных стероловых эфиров, фракции свободных жирных кислот, фракции фосфолипидов и их комбинаций, содержит около 5%, менее чем около 5%, около 4% или менее, около 3% или менее, около 2% или менее, около 1% или менее, около 0,75% или менее, около 0,6% или менее, или около 0,5% или менее по весу DPA n-6. В некоторых вариантах осуществления микробное масло и/или одна или более его фракций, выбранных из фракции триглицеридов, фракции диацилглицерина, стерольной фракции, фракции сложных стероловых эфиров, фракции свободных жирных кислот, фракции фосфолипидов и их комбинаций, практически не содержит свободной DPA n-6. В некоторых вариантах осуществления микробное масло и/или одна или более его фракций, выбранных из фракции триглицеридов, фракции диацилглицерина, стерольной фракции, фракции сложных стероловых эфиров, фракции свободных жирных кислот, фракции фосфолипидов и их комбинаций, содержит жирные кислоты, причем около 5% или менее, менее, чем около 5%, около 4% или менее, около 3% или менее, или около 2% или менее по весу 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), стеарионовой кислоты (18:4 n-3) или их комбинации.

Молекула триглицерида содержит 3 центральных атома углерода ($C(sn-1)H_2R1-(sn-2)H_2R2-C(sn-3)H_2R3$), создающих возможность образования различных позиционных изомеров. В некоторых вариантах осуществления микробное масло содержит фракцию триглицеридов, в которой по меньшей мере около 2%, по меньшей мере около 3%, по меньшей мере около 5%, по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35% или по меньшей мере около 40% триглицеридов во фракции триглицеридов содержит DHA в двух положениях в триглицериде (двузамещенная DHA), выбранных из любых двух sn-1, sn-2 и sn-3 положений, исходя из процента относительной площади пиков на HPLC-хроматограмме. В некоторых вариантах осуществления микробное масло содержит фракцию триглицеридов, при этом примерно от 2 до 55%, от 2 до 50%, от 2 до 45%, от 2 до 40%, от 2 до 35%, от 2 до 30%, от 2 до 25%, от 5 до 55%, от 5 до 50%, от 5 до 45%, от 5 до 40%, от 5 до 35%, от 5 до 30%, от 5 до 25%, от 10 до 55%, от 10 до 50%, от 10 до 45%, от 10 до 40%, от 10 до 35%, от 10 до 30%, от 10 до 25%, от 10 до 20%, от 20 до 40%, от 20 до 35%, или примерно от 20 до 25% триглицеридов во фракции триглицеридов содержит EPA в двух положениях в триглицериде, выбранных из любых двух sn-1, sn-2 и sn-3 положений, исходя из процента относительной площади пиков на HPLC-хроматограмме. В некоторых вариантах осуществления микробное масло содержит фракцию триглицеридов, в которой по меньшей мере около 0,5%, по меньшей мере около 1%, по меньшей мере около 1,5% или по меньшей мере около 2% триглицеридов во фракции триглицеридов содержит DHA во всех sn-1, sn-2 и sn-3 положениях (тризамещенная DHA), исходя из процента относительной площади пиков на HPLC-хроматограмме. В некоторых вариантах осуществления микробное масло содержит фракцию триглицеридов, в которой примерно от 0,5 до 5%, от 0,5 до 3%, от 0,5 до 2,5%, от 0,5 до 2%, от 1 до 5%, от 1 до 3%, или от 1 до 2% триглицеридов во фракции триглицеридов содержит DHA во всех sn-1, sn-2 и sn-3 положениях, исходя из процента относительной площади пиков на HPLC-хроматограмме. В некоторых вариантах осуществления микробное масло содержит фракцию триглицеридов, в которой по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 25%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 55% или по меньшей мере около 60% триглицеридов во фракции триглицеридов содержат DHA в одном положении в триглицериде, выбранном из любого sn-1, sn-2 или sn-3 положений, исходя из процента относительной площади пиков на HPLC-хроматограмме. В некоторых вариантах осуществления микробное масло содержит фракцию триглицеридов, в которой примерно от 10 до 80%, от 10 до 70%, от 10 до 60%, от 15 до 80%, от 15 до 75%, от 15 до 70%, от 15 до 65%, от 15 до 60%, от 35 до 80%, от 35 до 75%, от 35 до 65%, от 35 до 60%, от 40 до 80%, от 40 до 75%, от 40 до 70%, от 40 до 65%, от 40 до 60% или от 40 до 55% триглицеридов во фракции триглицеридов содержит DHA в одном положении в триглицериде, выбранном из любого sn-1, sn-2 и sn-3 положений, исходя из процента относительной площади пиков на HPLC-хроматограмме.

В некоторых вариантах осуществления микробное масло содержит жирные кислоты, при этом жирные кислоты дополнительно содержат омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты, при этом омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты содержат DHA и EPA в количестве около ≥ 90 вес.% от общего количества омега-3 полиненасыщенных жирных кислот, причем количество EPA, по весу, составляет примерно от 28 до 36% от общего количества DHA и EPA, и количество DHA, по весу, составляет примерно от 54 до 62% от общего количества DHA и EPA.

В другом варианте осуществления микробное масло содержит омега-3 полиненасыщенные жирные

В некоторых вариантах осуществления микробное масло содержит примерно от 120 до 220 мг EPA на один грамм масла и примерно от 240 до 450 мг DHA на один грамм масла.

В некоторых вариантах осуществления микробное масло содержит примерно от 120 до 220 мг EPA на один грамм масла и примерно от 240 до 450 мг DHA на один грамм масла.

В других вариантах осуществления микробное масло содержит примерно от 130 до 195 мг EPA на один грамм масла и примерно от 320 до 480 мг DHA на один грамм масла.

В дополнительном варианте осуществления микробное масло содержит примерно от 150 до 300 мг EPA на один грамм масла; примерно от 200 до 400 мг DHA на один грамм масла и примерно от 0 до 55 мг DPA n-3 на один грамм масла.

В еще одном варианте осуществления микробное масло содержит примерно от 50 до 150 мг EPA на один грамм масла; примерно от 410 до 540 мг DHA на один грамм масла и примерно от 0 до 12 мг DPA n-3 на один грамм масла.

В некоторых вариантах осуществления микробное масло содержит соотношение EPA:DHA от 1:1 до 1:30 или от 1:1 до 1:3 по весу общих омега-3 полиненасыщенных жирных кислот.

В некоторых вариантах осуществления микробное масло содержит соотношение EPA:DHA от 1:1 до 1:2,5 по весу общих омега-3 полиненасыщенных жирных кислот.

В другом варианте осуществления микробное масло содержит соотношение EPA:DHA от 1:4 до 1:7 по весу общих омега-3 полиненасыщенных жирных кислот.

В некоторых вариантах осуществления микробное масло содержит соотношение EPA:DHA по меньшей мере 1:1, по меньшей мере 1:1,5, по меньшей мере, 1:2, по меньшей мере 1:2,5, по меньшей мере 1:3 или по меньшей мере 1:4 по весу общих омега-3 полиненасыщенных жирных кислот. Подходящие пределы могут быть выбраны между любыми из этих значений, например соотношение EPA:DHA от 1:1 до 1:1,5, от 1:1 до 1:2, от 1:1,5 до 1:2, от 1:1 до 1:2,5, от 1:2 до 1:2,5 и от 1:4 до 1:7,4 по весу общих омега-3 полиненасыщенных жирных кислот.

В следующем варианте осуществления микробное масло производится *Schizochytrium* sp.

Изобретение имеет отношение к композициям, содержащим микроорганизм изобретения, выделенную биомассу изобретения, микробное масло изобретения или их комбинации.

Микроорганизм, биомасса или микробное масло изобретения может быть дополнительно химически или физически модифицировано или обработано, исходя из требований к композиции, с помощью любого известного метода.

Клетки микроорганизма или биомасса может быть высушена до использования в композиции с помощью различных методов, включая, но не ограничиваясь этим, сушку замораживанием, сушку на воздухе, сушку распылением, туннельную сушку, вакуумную сушку (лиофилизацию) и подобный процесс. Альтернативно, собранная и промытая биомасса может непосредственно использоваться в композиции без высушивания. См., например, патенты США № 5130242 и 6812009, каждый из которых полностью включается в описание путем отсылки.

Микробные масла изобретения могут использоваться в качестве исходного материала для более эффективного производства продукта, обогащенного жирной кислотой, такой как EPA. Например, микробные масла изобретения могут быть подвергнуты различным способам очистки, известным в данной области, таким как перегонка или аддукция мочевины, для получения высокоэффективного продукта с более высокими концентрациями EPA или другой жирной кислоты. Микробные масла изобретения также могут использоваться в химических реакциях для получения в маслах производных соединений от жирных кислот, таких как сложные эфиры или соли EPA или другой жирной кислоты.

Композиция изобретения может включать один или более эксципиентов. Используемый в описании термин "эксципиент" относится к компоненту или смеси компонентов, используемых в композиции настоящего изобретения для придания желательных характеристик композиции, включая продукты питания, а также фармацевтические, косметические и промышленные композиции. Эксципиент настоящего изобретения может быть описан как "фармацевтически приемлемый" эксципиент при добавлении к фармацевтической композиции, то есть эксципиент является соединением, веществом, композицией, солью и/или лекарственной формой, которая, в рамках медицинской точки зрения, является пригодной для контакта с тканями людей и животных, не являющихся человеком, без избыточной токсичности, раздражения, аллергического ответа или других проблематичных осложнений в течение желательной продолжительности контакта соразмерно с приемлемым соотношением польза/риск. В некоторых вариантах осуществления термин "фармацевтически приемлемый" означает одобренный контрольным органом Федерального правительства или правительства штата или перечисленный в Фармакопее США или других общепризнанных фармакопеех для применения на животных и, в частности, на людях. Могут использоваться различные эксципиенты. В некоторых вариантах осуществления эксципиент может быть, но без ограничения, щелочным агентом, стабилизирующим веществом, антиоксидантом, связывающим веществом, разделительным веществом, покровным веществом, компонентом внешней фазы, компонентом, контролирующим высвобождение, растворителем, поверхностно-активным веществом, смачивающим веществом, буферным веществом, наполнителем, смягчающим веществом или их комбинациями. Эксципиенты, в дополнение к обсужденным в описании, могут включать эксципиенты, перечисленные, без

ограничения, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st ed. (2005). Включение эксципиента в определенную классификацию в описании (например, "растворитель") имеет целью иллюстрировать, а не ограничивать, роль эксципиента. Отдельный эксципиент может попадать в пределы нескольких классификаций.

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

В некоторых вариантах осуществления композиция является пищевым продуктом. Пищевой продукт является продуктом, предназначенным для потребления человеком или животным, не являющимся человеком, и включает и твердые и жидкие композиции. Пищевой продукт может быть добавкой к пище животного или человека. Продукты питания включают, но не ограничиваясь этим, обычную пищу; жидкие продукты, включая молоко, напитки, лечебные напитки и питательные напитки; функциональные продукты питания; добавки; нутрицевтики; детские смеси, включая смеси для недоношенных детей; продукты питания для беременных или кормящих женщин; продукты для взрослых людей; продукты для пожилых людей и корма для животных.

В некоторых вариантах осуществления микроорганизм, биомасса или микробное масло изобретения могут использоваться непосредственно или могут включаться в качестве добавки в одно или более из следующего: масло, шортенинг, спред, другой жирный ингредиент, напиток, соус, продукты на основе молока или сои (такие как молоко, йогурт, сыр или мороженое), хлебобулочные изделия, питательный продукт, например, как питательная добавка (в виде капсул или таблеток), витаминная добавка, пищевая добавка, напиток в порошке и готовый или полуобработанный порошкообразный пищевой продукт. В некоторых вариантах осуществления питательная добавка имеет форму вегетарианской капсулы, т.е. не создана из и не содержит компонентов животного происхождения.

Неполный перечень пищевых композиций, которые могут содержать микробное масло изобретения, включает, но не ограничивается этим, продукты на основе сои (молочные напитки, мороженое, йогурты, кремы, паштеты, забеливатели); супы и суповые смеси; тесто, блинное тесто и термообработанные пищевые продукты, включая, например, хлебобулочные изделия, готовые завтраки, торты, пудинги, пироги, кексы, булочки, батончики, хлеб, рулеты, бисквиты, сдобу, пирожные, лепешки, гренки, крекеры, кондитерские изделия, легкие закуски, пирожки, мюсли/легкие закуски, тосты и печенье; конфеты; твердые кондитерские изделия; шоколад и другие кондитерские изделия; жевательная резинка; жидкие пищевые продукты, например молоко, энергетические напитки, детские смеси, газированные напитки, чай, жидкие смеси, фруктовые соки, напитки на основе соков, напитки на основе овощей; мультивитаминные сиропы, заменители муки, лечебные продукты питания и сиропы; порошкообразные смеси для приготовления напитков, макароны; обработанные рыбные продукты; обработанные мясные продукты; обработанные птицепродукты; подливки и соусы; заправки (кетчуп, майонез и т.д.); спреды на основе растительного масла; молочные продукты; йогурт; масло; замороженные молочные продукты; мороженое, замороженные десерты; замороженные йогурты; полутвердые продукты питания, такие как детское питание; пудинги и сладкое желе; обработанный и необработанный сыр; блинные смеси; пищевые батончики, включая энергетические батончики; сухие смеси для вафельного теста; заправки для салатов; смеси, заменяющие яйца; орехи и пасты на основе орехов; соленые закуски, такие как картофельные чипсы и другие чипсы или крипы, кукурузная соломка, кукурузные чипсы, экструдированные снеки, попкорн, сушки, хрустящий картофель и орехи; и специальные легкие закуски, такие как подливы, высушенные фруктовые закуски, мясные легкие закуски, шкварки, диетические батончики и рисовые/кукурузные лепешки.

В некоторых вариантах осуществления микробное масло изобретения может использоваться для добавления в детскую смесь. Детская смесь может быть дополнена микробным маслом изобретения отдельно или в комбинации с физически очищенным маслом, полученным от микроорганизма, продуцирующего арахидоновую кислоту (ARA). Микроорганизмом, продуцирующим ARA, является, например, *Mortierella alpina* или *Mortierella sect. schmuckeri*. Альтернативно, в детские смеси микробное масло изобретения может добавляться в комбинации с маслом с высоким содержанием ARA, включая ARASCO® (Martek Biosciences, Columbia, MD).

В некоторых вариантах осуществления композиция является кормом для животных. "Животное" включает организмы, не являющиеся человеком, относящиеся к царству Животных, и включают, без ограничения, водных животных и наземных животных. Термин "пища для животных" или "корм для животных" относится к любой пище, предназначенной для животных, не являющихся человеком, или для рыб; промысловых рыб, декоративных рыб, личинок рыб; двусторчатых моллюсков, мягкотелых моллюсков, ракообразных; креветок, мелких креветок; артемий, коловраток, солоноводных креветок, фильтраторов; амфибий, рептилий, млекопитающих, домашних животных, сельскохозяйственных животных; зоологических животных; спортивных животных; племенных животных, гоночных животных; животных, используемых для показа; старинных животных, редких или исчезающих животных; животных-компаньонов; домашних питомцев, таких как собаки, кошки, морские свинки, кролики, крысы, мыши или лошади; приматов, таких как обезьяны (например, капуцины, резусы, африканская зеленая мартышка, мартышка-гусар, яванский макак и род мартышек (*ceropithecus*)), человекообразных обезьян, орангу-

тангов, павианов, гиббонов и шимпанзе; собачьих, таких как собаки и волки; кошачьих, таких как кошки, львы и тигры; непарнокопытных, таких как лошади, ослы и зебры; мясомолочного скота, такого как коровы, крупный рогатый скот, свиньи и овцы; копытных животных, таких как олени и жирафы; грызунов, таких как мыши, крысы, хомяки и морские свинки и так далее. Корм для животных включает, но не ограничивается этим, корм для аквакультуры, корм для домашних животных, включая корм для домашних питомцев, корм для зоологических животных, корм для рабочих животных, корм для скота и их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления композиция является кормом или добавкой к корму животного, мясо которого или продукты из его мяса потребляются людьми, такого как животное, от которого получают мясо, яйца или молоко для потребления человеком. При кормлении животных такие нутриенты, как LC-PUFA, могут быть введены в мясо, молоко, яйца или другие продукты от таких животных для увеличения содержания в них этих нутриентов.

В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой высушенный распылением материал, который может быть измельчен до образования частиц подходящего размера для потребления зоопланктоном, артемией, коловратками и фильтраторами. В некоторых вариантах осуществления зоопланктоном, артемиями или коловратками, которых кормили композицией, в свою очередь кормят личинок рыб, рыб, креветок, двусторчатых моллюсков или ракообразных.

В некоторых вариантах осуществления композиция является фармацевтической композицией. Подходящие фармацевтические композиции включают, но не ограничиваются этим, противовоспалительную композицию, лекарственное средство для лечения ишемической болезни сердца, лекарственное средство для лечения атеросклероза, химиотерапевтическое средство, активное вспомогательное средство, лекарственное средство от остеопороза, антидепрессант, противосудорожное средство, лекарственное средство против *Helicobacter pylori*, лекарственное средство для лечения нейродегенеративной болезни, лекарственное средство для лечения дегенеративной болезни печени, антибиотик, композицию, понижающую холестерин, и композицию, понижающую триацилглицерин. В некоторых вариантах осуществления композиция является лечебным питанием. Лечебное питание включает продукт, в состав которого вводится композиция, который потребляется или вводится под наблюдением врача и предназначен для конкретной диетотерапии состояния, для которого на основе общепризнанных научных принципов медицинской экспертизы устанавливается особая потребность в питании.

В некоторых вариантах осуществления микробное масло может быть заключено в состав лекарственной формы. Лекарственные формы могут включать, но не ограничиваются этим, таблетки, капсулы, облатки, шарики, пилюли, порошки и гранулы и парентеральные лекарственные формы, которые включают, но не ограничиваются этим, растворы, суспензии, эмульсии и сухие порошки, содержащие эффективное количество микробного масла. Кроме того, в данной области техники известно, что такие композиции могут содержать фармацевтически приемлемые разбавители, наполнители, дезинтегрирующие вещества, связывающие вещества, смазывающие вещества, поверхностно-активные вещества, гидрофобные разбавители, водорастворимые разбавители, эмульгирующие вещества, буферы, влагоудерживающие вещества, увлажняющие вещества, солилизаторы, консерванты и тому подобное. Формы для введения включают, но не ограничиваются этим, таблетки, драже, капсулы, капсуловидные таблетки и пилюли, содержащие микробное масло и один или более подходящих фармацевтически приемлемых носителей. Для перорального применения микробное масло может быть объединено с фармацевтически приемлемыми носителями, хорошо известными в данной области. Такие носители дают возможность включения микробных масел изобретения в состав таблеток, пилюль, драже, капсул, жидкостей, гелей, сиропов, кашеи, суспензий и тому подобного для перорального приема внутрь субъектом, которого необходимо лечить. В некоторых вариантах осуществления лекарственная форма представляет собой таблетку, пилюлю или капсуловидную таблетку. Фармацевтические препараты для перорального приема могут быть получены путем добавления твердого эксципиента, необязательно толчения полученной смеси и обработки смеси гранул после добавления, при необходимости, подходящих вспомогательных веществ для получения таблеток или сердцевин драже. Подходящие эксципиенты включают, но не ограничиваются этим, наполнители, такие как сахара, включая, но не ограничиваясь этим, лактозу, сахарозу, маннитол и сорбит; препараты целлюлозы, такие как, но не ограничиваясь этим, кукурузный крахмал, пшеничный крахмал, рисовый крахмал, картофельный крахмал, желатин, трагакантовую камедь, метилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, натрий карбоксиметилцеллюлозу и поливинилпирролидон (PVP). При необходимости могут быть добавлены дезинтегрирующие вещества, такие как, но не ограничиваясь этим, поперечно-сшитый поливинилпирролидон, агар или альгиновая кислота или ее соль, такая как альгинат натрия. Фармацевтические препараты, которые можно использовать перорально, включают, но не ограничиваются этим, твердые капсулы, изготовленные из желатина, а также мягкие капсулы, изготовленные из желатина и пластификатора, такого как глицерин или сорбит. В некоторых вариантах осуществления лекарственная форма является вегетарианской лекарственной формой, которая не изготавливается и не содержит каких-либо компонентов животного происхождения. В некоторых вариантах осуществления вегетарианская лекарственная форма является вегетарианской капсулой.

В некоторых вариантах осуществления лекарственная форма для перорального применения является

ся вегетарианской желатиновой капсулой, содержащей модифицированный кукурузный крахмал, каррагенан, глицерин, сорбит, дистиллированную воду, бета-каротин и карамельный порошок.

В некоторых вариантах осуществления лекарственная форма для перорального применения заключается в состав с маслом, содержащим около 100, около 200, около 300, около 400, около 500, около 550 или около 600 мг DHA и EPA на один грамм масла.

В некоторых вариантах осуществления лекарственная форма для перорального применения заключается в состав с маслом, содержащим примерно от 300 до 700 мг DHA и EPA на один грамм масла.

В дополнительном варианте осуществления лекарственная форма для перорального применения заключается в состав с маслом, содержащий примерно от 360 до 670 мг DHA и EPA на один грамм масла.

В некоторых вариантах осуществления желатиновая капсула заключается в состав с маслом, содержащим около 100, около 200, около 300, около 400, около 500, около 550 или около 600 мг общего количества DHA и EPA на один грамм масла.

В некоторых вариантах осуществления в желатиновую капсулу может быть заключено масло, содержащее примерно от 300 до 700 мг DHA и EPA на один грамм масла.

В дополнительном варианте осуществления в желатиновую капсулу может быть заключено масло, содержащее примерно от 360 до 670 мг DHA и EPA на один грамм масла.

В следующем варианте осуществления общее количество DHA и EPA составляет по меньшей мере около 400 мг на один грамм масла.

В еще одном варианте осуществления общее количество омега-3 полиненасыщенных жирных кислот составляет по меньшей мере около 400 мг на один грамм масла.

В еще одном варианте осуществления общее количество DHA и EPA составляет около 400 мг на один грамм масла.

В дополнительном варианте осуществления общее количество DHA и EPA составляет по меньшей мере около 500 мг на один грамм масла.

В дополнительном варианте осуществления общее количество омега-3 полиненасыщенных жирных кислот составляет по меньшей мере около 500 мг на один грамм масла.

В другом варианте осуществления общее количество DHA и EPA составляет 500 мг на один грамм масла.

В некоторых вариантах осуществления композиция является косметической. Косметические средства включают, но не ограничиваются этим, эмульсии, кремы, лосьоны, маски, мыло, шампуни, жидкости для промывки, кремы для лица, кондиционеры, косметику, средства для ванны и жидкости для диспергирования. Косметические средства могут быть лечебными или нелечебными.

В некоторых вариантах осуществления композиция является промышленной композицией. В некоторых вариантах осуществления композиция является исходным материалом одного или более промышленных изделий. Промышленное изделие включает, но не ограничивается этим, полимер; фотографический фоточувствительный материал; детергент; промышленное масло; или промышленный детергент. Например, патент США № 7259006 описывает использование DHA-содержащего жира и масла для производства бегеновой кислоты и производства фотографических фоточувствительных материалов с использованием бегеновой кислоты.

В некоторых вариантах осуществления композиция может использоваться при лечении заболевания у людей и животных, не являющихся человеком. В некоторых вариантах осуществления композиция может использоваться для питания людей и животных, не являющихся человеком.

Термины "лечить" и "лечение" относятся к терапевтическому лечению и к профилактическим или превентивным мерам, при этом целью является предотвращение или уменьшение (облегчение) нежелательного физиологического состояния, болезни или нарушения, или получение полезных или желательных клинических результатов. Для целей данного изобретения полезные или желательные клинические результаты включают, но не ограничиваются этим, облегчение или устранение симптомов или признаков, связанных с состоянием, болезнью или нарушением; уменьшение степени состояния, болезни или нарушения; стабилизацию состояния, болезни или нарушения, (т.е., когда состояние, болезнь или нарушение не ухудшается); задержку начала или прогрессирования состояния, болезни или нарушения; улучшение состояния, болезни или нарушения; ремиссию (частичную или полную, обнаружимую или неподдающуюся обнаружению) состояния, болезни или нарушения; или улучшение состояния, болезни или нарушения. Лечение включает получение клинически значимого ответа без чрезмерных побочных эффектов. Лечение также включает продление выживания по сравнению с ожидаемым выживанием без получения лечения.

В некоторых вариантах осуществления композиция используется для лечения состояния, болезни или нарушения, такого как акне, острое воспаление, возрастная макулопатия, аллергия, болезнь Альцгеймера, артрит, астма, атеросклероз, аутоиммунная болезнь, нарушение липидного состава крови, кисты молочной железы, кахексия, рак, рестеноз сердца, сердечно-сосудистые заболевания, хроническое воспаление, коронарная болезнь сердца, кистозный фиброз, дегенеративное нарушение печени, диабет, экзема, гастроинтестинальное нарушение, сердечная недостаточность, высокие уровни триглицеридов, гипертензия, гиперактивность, иммунологические болезни, ингибирование опухолевого роста, воспалитель-

ные состояния, кишечные расстройства, дисфункция почек, лейкемия, большая депрессия, рассеянный склероз, нейродегенеративное нарушение, остеоартрит, остеопороз, пероксисомное нарушение, токсикоз беременности, ранние роды, псориаз, легочное нарушение, ревматоидный артрит, риск развития сердечной недостаточности и тромбоз.

В некоторых вариантах осуществления композиция используется для увеличения продолжительности периода беременности в третьем триместре.

В некоторых вариантах осуществления композиция используется для контроля кровяного давления.

В некоторых вариантах осуществления композиция используется для улучшения или сохранения когнитивной функции.

В некоторых вариантах осуществления композиция используется для улучшения или сохранения памяти.

В некоторых вариантах осуществления композиция используется для сохранения здорового сердца.

Композиция или лекарственная форма может быть введена в организм субъекта любым путем, подходящим для композиции или лекарственной формы. Вещество считается "введенным", если вещество вводится в организм субъекта субъектом, или если другой человек, аппарат или устройство вводит вещество в организм субъекта. Следовательно, "введение" включает, например, самовведение, введение с помощью других людей и не прямое введение. Используемый в описании термин "непрерывное" или "последовательное" в отношении "введения" означает, что частота введения составляет, по меньшей мере, один раз в день. Следует отметить, однако, что кратность введения может быть больше, чем один раз в день и будет все еще "непрерывным" или "последовательным," например, два или три раза в день, при условии, что уровни дозирования, указанные в описании, не превышаются. Средства и способы введения известны в данной области техники, а для ознакомления специалист может обратиться к различным фармакологическим работам. Например, можно посоветовать "Modern Pharmaceutics," Banker & Rhodes, Informa Healthcare, USA, 4th ed. (2002); and "Goodman & Gilman's The Pharmaceutical Basis of Therapeutics," McGraw-Hill Companies, Inc., New York, 10th ed. (2001).

Под термином "субъект", "индивидуум" или "пациент" подразумевается субъект, человек или животное, не являющееся человеком, для которого является необходимой постановка диагноза, прогноз, лечение или введение композиции или лекарственной формы. Млекопитающие включают, но не ограничиваются этим, людей; домашних животных; сельскохозяйственных животных, животных в зоопарке; спортивных животных; комнатных животных, таких как собаки, кошки, морские свинки, кролики, крысы, мыши или лошади; приматов, таких как обезьяны (например, капуцины, резусы, африканская зеленая мартышка, мартышка-гусар, яванский макак и род мартышек (*cercopithecus*)), человекообразных обезьян, орангутангов, павианов, гиббонов и шимпанзе; собачьих, таких как собаки и волки; кошачьих, таких как кошки, львы и тигры; непарнокопытных, таких как лошади, ослы и зебры; мясомолочный скот, такой как коровы, крупный рогатый скот, свиньи и овцы; копытных животных, таких как олени и жирафы; грызунов, таких как мыши, крысы, хомяки и морские свинки и так далее. Термин субъект также включает животные модели, например животные модели болезней. В некоторых вариантах осуществления термин включает ценных животных, в экономическом или ином смысле, например экономически важный племенной скот, гонимых животных; животных, используемых для показа, семейных животных, редких или исчезающих животных или животных-компаньонов. В некоторых вариантах осуществления субъект является человеком. В некоторых вариантах осуществления субъект является субъектом, не являющимся человеком.

Композиция может вводиться в качестве "питательного количества", "терапевтически эффективного количества", "профилактически эффективного количества", "терапевтической дозы" или "профилактической дозы." "Питательное количество" относится к количеству, эффективному (при введении в необходимых дозировках и в течение необходимых периодов времени) для достижения желательного, вызванного питанием результата. Результатом, вызванным питанием, могут быть, например, повышенные уровни желательного жирнокислотного компонента у субъекта. "Терапевтически эффективное количество" или "терапевтическая доза" относится к количеству, эффективному (при введении в необходимых дозировках и в течение необходимых периодов времени) для достижения желательного терапевтического результата. Терапевтическим результатом может быть, например, облегчение симптомов, пролонгированное выживание, улучшенная подвижность и т.п. Терапевтический результат может и не быть "излечением". "Профилактически эффективное количество" или "профилактическая доза" относится к количеству, эффективному (при введении в необходимых дозировках и в течение необходимых периодов времени) для достижения желательного профилактического результата. Как правило, так как профилактическая доза используется субъектом до начала болезни или на ранней стадии болезни, профилактически эффективное количество должно быть меньше, чем терапевтически эффективное количество для лечения поздней стадии болезни.

Субъекту могут быть введены различные размеры дозирования композиции, лекарственной формы или фармацевтической композиции, исходя из количества ЕРА или другого жирнокислотного компонента микроорганизма, биомассы или микробного масла, которое должно вводиться субъекту. Термины

"ежедневная дозировка", "уровень ежедневной дозировки" и "ежедневная величина дозы" относятся к общему количеству ЕРА или другого жирнокислотного компонента, вводимого в день (в течение 24-часового периода времени). Таким образом, например, введение ЕРА субъекту в ежедневной дозировке 2 мг означает, что субъект получает всего 2 мг ЕРА ежедневно, вводится ли ЕРА в одной лекарственной форме, содержащей 2 мг ЕРА, или альтернативно, в четырех лекарственных формах, содержащих 0,5 мг ЕРА каждая (всего 2 мг ЕРА). В некоторых вариантах осуществления ежедневное количество ЕРА вводится в одной лекарственной форме или в двух лекарственных формах. Лекарственные формы настоящего изобретения могут приниматься внутрь однократно или за несколько приемов. Например, если ежедневно должны приниматься четыре таблетки, при этом каждая таблетка содержит 0,5 мг ЕРА, тогда все четыре таблетки могут быть приняты за один раз в день, или 2 таблетки можно принимать два раза в день, или 1 таблетку следует принимать каждые 6 ч. В некоторых вариантах осуществления ежедневная дозировка составляет примерно от 100 мг до 15 г ЕРА. В некоторых вариантах осуществления ежедневная дозировка составляет примерно от 0,5 до 250 мг, от 100 до 250 мг, от 100 до 500 мг, от 100 мг до 1 г, от 1 до 2,5 г, от 1 до 5 г, от 1 до 10 г, от 1 до 15 г, от 5 до 10 г, от 5 до 15 г, от 10 г до 15 г, от 100 мг до 10 г, от 100 мг до 5 г или от 100 мг до 2,5 г ЕРА, ДНА или их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой лекарственную форму, содержащую примерно от 0,5 до 250 мг, от 100 до 250 мг, от 0,5 до 500 мг, от 100 до 500 мг, от 0,5 мг до 1 г или от 100 мг до 1 г ЕРА, ДНА или их комбинации в одной лекарственной форме.

Введение композиций или лекарственных форм настоящего изобретения может осуществляться в различных режимах. Например, в некоторых вариантах осуществления введение происходит ежедневно в течение последовательных дней, или альтернативно, происходит через день (дважды в день). Введение может происходить в течение одного или более дней.

Введение композиций и лекарственных форм может быть объединено с другими режимами, используемыми для лечения определенного состояния. Например, способ настоящего изобретения может быть объединен с некоторыми режимами питания (например, низкоуглеводными диетами, высокобелковыми диетами, диетами, обогащенными клетчаткой, и т.д.), режимами физической нагрузки, режимами потери веса, режимами отказа от курения или их комбинациями. Способ настоящего изобретения также может использоваться в комбинации с другими фармацевтическими средствами при лечении заболевания. Композиции или лекарственные формы настоящего изобретения могут быть введены до или после других режимов или фармацевтических продуктов.

Изобретение имеет отношение к наборам или упаковкам, содержащим одну или более единиц композиции изобретения. Наборы или упаковки могут включать единицы пищевого продукта, фармацевтической композиции, косметической или промышленной композиции, содержащей микроорганизм, биомассу или микробное масло изобретения или их комбинации. Наборы или упаковки также могут включать добавки, содержащие микроорганизм, биомассу или микробное масло изобретения или их комбинации для приготовления пищевой, косметической, фармацевтической композиции или промышленной композиции.

В некоторых вариантах осуществления набор или упаковка содержит одну или более единиц фармацевтической композиции для введения согласно способам настоящего изобретения. Набор или упаковка может содержать одну единицу дозирования или более чем одну единицу дозирования (т.е., несколько единиц дозирования). Если в наборе или упаковке присутствует несколько единиц дозирования, эти несколько единиц дозирования необязательно могут располагаться в порядке, необходимом для последовательного введения.

Наборы настоящего изобретения необязательно могут содержать инструкции, имеющие отношение к единицам или лекарственным формам набора. Такие инструкции могут быть в форме, предусмотренной государственным органом, регулирующим производство, применение или продажу фармацевтических продуктов, при этом информационное сообщение отражает одобрение органом производства, применения и продажи для введения человеку с целью лечения состояния или заболевания. Данные инструкции могут быть в любой форме, предоставляющей информацию по применению этих единиц или лекарственных форм из набора согласно способам изобретения. Например, инструкции могут иметь форму печатного материала или носителя с записанной на нем информацией.

В ходе осмотра пациента медицинский работник может определить, что применение одного из способов настоящего изобретения является необходимым для пациента, или врач может установить, что состояние пациента может быть улучшено при применении одного из способов настоящего изобретения. До назначения какого-либо режима врач может проконсультировать пациента, например, в отношении риска и пользы, связанной с данным режимом. Пациенту может быть предоставлена полная информация обо всех известных и предполагаемых рисках, связанных с данным режимом. Такое консультирование может проводиться в устной, а также в письменной форме. В некоторых вариантах осуществления врач может предоставить пациенту печатные материалы, имеющие отношение к данному режиму, такие как информация о продукте, учебная литература и тому подобное.

Настоящее изобретение имеет отношение к методам проведения разъяснительной работы среди потребителей о способах лечения, такой метод включает распространение лекарственных форм вместе с

информацией для потребителя в пунктах продажи. В некоторых вариантах осуществления распространение происходит в пунктах продажи, где есть фармацевт или медицинский работник.

Термин "информация для потребителей" может включать, но не ограничивается этим, текст на английском языке, текст не на английском языке, визуальное изображение, схему, телефонную запись, веб-сайт и доступ "в прямом эфире" к представителю по работе с клиентами. В некоторых вариантах осуществления информация для потребителей обеспечивает указания в отношении применения лекарственных форм в соответствии со способами настоящего изобретения, подходящий возраст для применения, показания, противопоказания, подходящие дозировки, предупреждения, номер телефона или адрес вебсайта. В некоторых вариантах осуществления данный способ дополнительно включает предоставление профессиональной информации для соответствующих лиц в форме ответов на вопросы потребителя по поводу применения раскрытых режимов в соответствии со способами настоящего изобретения. Термин "профессиональная информация" включает, но не ограничивается этим, информацию в отношении режима введения в соответствии со способами настоящего изобретения, иначе говоря, дает возможность медицинскому работнику ответить на вопросы потребителя.

"Медицинский работник" означает, например, врача, фельдшера, медицинскую сестру, младшую медицинскую сестру, фармацевта и представителя по работе с клиентами.

В целом данное изобретение описано, более глубокое понимание можно получить с учетом предоставленных в описании примеров. Эти примеры приведены только с целью иллюстрации и не являются ограничивающими.

Пример 1. Выделение микроорганизмов

Образцы были собраны в естественной среде, расположенной в приливной зоне, во время "низкой воды", включая бухты и дельты вдоль Западного побережья Северной Америки (Калифорния, Орегон и Вашингтон) и Гавайи. В стерильные пробирки объемом 50 мл помещали воду, осадок, живой растительный материал и гниющие растительные/животные остатки. Порции каждого образца вместе с водой рассеивали на чашки с твердым агаром и средой для изоляции. Среда для изоляции состоит из 500 мл искусственной морской воды, 500 мл дистиллированной воды, 1 г глюкозы, 1 г глицерина, 13 г агара, 1 г глутамата, 0,5 г дрожжевого экстракта, 0,5 г казеинового гидролизата, 1 мл раствора витаминов (100 мг/л тиамина, 0,5 мг/л биотина, 0,5 мг B₁₂), 1 мл раствора следовых металлов (PI металлы, включающие на литр: 6,0 г FeCl₃·6H₂O, 6,84 г H₃BO₃, 0,86 г MnCl₂·4H₂O, 0,06 г ZnCl₂, 0,026 г CoCl₂·6H₂O, 0,052 г NiSO₄·H₂O, 0,002 г CuSO₄·5H₂O и 0,005 г Na₂MoO₄·2H₂O), и по 500 мг пенициллина G и стрептомицина сульфата. Чашки с агаром инкубировали в темноте при 20-25°C. Через 2-4 дня агаровые чашки исследовали при увеличении, колонии клеток собирали с помощью стерильной зубочистки и вновь сеяли штрихом на чашки со свежей средой. Клетки повторно сеяли штрихом на свежую среду до тех пор, пока контаминированные организмы не были удалены. Два из изолированных микроорганизмов были депонированы под учетными номерами ATCC PTA-10212 и PTA-10208.

Таксономические характеристики изолированного микроорганизма, депонированного под учетным номером ATCC PTA-10212

Культуры изолированного микроорганизма, депонированного под учетным номером ATCC PTA-10212 ("PTA-10212"), выглядят как белые, влажные, смазанные колонии без видимых изолированных сорусов (сорус (от греч. soros, sori) - группа расположенных скученно спор или органов бесполого размножения).

PTA-10212 выращивали на твердом и жидком FFM, твердом KMV, KMV кашеце (1%), KMV бульоне и МН бульоне с целью дополнительной проверки ростовых характеристик. Было обнаружено, что PTA-10212 быстро растет на KMV и МН. См., например, Porter D., 1989. Phylum Labyrinthulomycota. In Margulis, L., Corliss, J.O., Melkonian, M., Chapman, D.J. (Eds.) Handbook of Protozoa, Jones и Bartlett, Boston, pp. 388-398 (KMV); Honda et al., Mycol. Res. 702:439-448 (1998) (МН); и патент США № 5130242 (FFM), каждый из которых полностью включается в описание путем отсылки.

После выращивания PTA-10212 в течение нескольких дней на твердых FFM средах, через 72 ч роста на KMV среде и МН бульоне были получены следующие результаты наблюдения. Спорангии не образовывали кластеры в/на какой-либо среде и были очень маленькими (5-10 мкм). PTA-10212 не демонстрировал многочисленные тетрады, присущие характеру дробления *Schizochytrium*. Амебоидные клетки появлялись примерно через 24 ч после переноса в свежую твердую среду. Эти амебоидные клетки пропадали через несколько дней и не обнаруживались в жидкой или "грязевидной" среде. В отличие от *Aurantiochytrium*, описанных Yokoyama, R. et al, Mycoscience 48(6): 329-341 (2007), как имеющие вид "небольших песчаных зерен на дне флакона" при выращивании в жидкой среде, PTA-10212 не осаждался на дне флакона, а был суспендирован в KMV и МН жидких средах. Спорангий не был таким плотным как типичный для *Schizochytrium* или *Oligochytrium*, а также имел полноценные сети эктоплазмы, которые отсутствовали у PTA-10212. В то время как большинство видов подвергается вегетативному делению небольшого спорангия или ассимилирующих клеток путем деления большего спорангия в течение нескольких часов, PTA-10212 образовывал гантелеобразные продолговатые ассимилирующие клетки, которые затем формировали тонкий "перешеек", который разрывался по мере того, как концы гантели отделялись. По-видимому, получившиеся клетки являются небольшими ассимилирующими клетками.

Прямая трансформация амебоидной клетки в гантелеобразные ассимилирующие клетки не наблюдалась. Наблюдались типичные плавающие двухжгутиковые зооспоры, однако они были относительно редкими. РТА-10212 был неплодовитым, делящимся вегетативным делением. Прямого высвобождения зооспор не наблюдалось, хотя наблюдались плавающие зооспоры. Вегетативные клетки были очень маленькими (от 2 до 5 мкм).

РТА-10212 был дополнительно исследован с помощью проточного метода, при этом были приготовлены микроскопические препараты путем суспендирования небольшой части выращенной на агаре колонии в капле морской воды с половинной концентрацией. При использовании этой методики было видно, что первичные спорангии являются сферическими и имеют диаметр приблизительно 10 мкм. Стенки были очень тонкие и остатки не наблюдались в том случае, когда были вызвано двойное деление протопласта. Повторное двойное деление давало 8-16 более мелких (4-5 мкм в диаметре) вторичных спорангиев. Вторичные спорангии оставались покоящимися в течение нескольких часов до того, как снова высвобождался аморфный протопласт. Аморфный протопласт делился путем сжимания и растягивания, вначале образуя типичные гантелеобразные промежуточные стадии, а в конце давая 4-8 небольших шаровидных телец 2,5-2,8 мкм в диаметре. Эти тельца покоились в течение от нескольких минут до 1-2 ч, затем изменяли форму (удлинялись) и превращались в двухжгутиковые зооспоры, 2,3-2,5 x 3,7-3,9 мкм. Зооспоры были многочисленными, и их можно было точно измерить, когда они приходили в состояние покоя. Затем зооспоры округлялись и начинали новый цикл развития. Зооспоры были больше, чем у *Sicyoidochytrium minutum*, и меньше, чем у *Ulkenia visurgensis*.

РТА-10212 был дополнительно охарактеризован, исходя из сходства его 18s rRNA гена с генами известных видов. Геномную ДНК получали из РТА-10212 с помощью стандартного метода. См., например, Sambrook J. и Russell D. 2001. Molecular cloning: A laboratory manual, 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. Коротко: (1) центрифугировали 500 мкл клеток из культуры на стадии середины логарифмического роста. Клетки центрифугировали повторно и все остатки жидкости были удалены из клеточного осадка с помощью наконечника с малым проходным сечением; (2) осадки ресуспендировали с помощью 200 мкл лизирующего буфера (20 mM Tris pH 8,0, 125 мкг/мл протеиназы K, 50 mM NaCl, 10 mM EDTA pH 8,0, 0,5% SDS); (3) клетки лизировали при 50°C в течение 1 ч; (4) лизированную смесь раскапывали в 2 мл пробирки с синхронизированным по фазе гелем (PLG-Eppendorf); (5) добавили равные объемы Р:С:І и дали смеси возможность смешиваться в течение 1,5 ч; (6) пробирки центрифугировали при 12,000 x g в течение 5 мин; (7) водную фазу удалили из вышеупомянутого геля в PLG пробирке, добавили равный объем хлороформа к водной фазе и перемешивали в течение 30 мин; (8) пробирки центрифугировали при 14,000 x g в течение приблизительно 5 мин; (9) верхний слой (водная фаза) был удален с помощью пипетки из хлороформа и помещен в новую пробирку; (10) 0,1 объема 3 M NaOAc добавили и перемешали (перевернув несколько раз); (11) 2 объема 100% EtOH добавили и перемешали (перевернув несколько раз) с осадком геномной ДНК, образованным на этой стадии; (12) пробирки центрифугировали при 4°C в микроцентрифуге при 14,000 x g в течение приблизительно 15 мин; (13) жидкость осторожно слили, оставив геномную ДНК на дне пробирки; (14) осадок промыли 0,5 мл 70% EtOH; (15) пробирки центрифугировали при 4°C в микроцентрифуге при 14,000 x g приблизительно в течение 5 мин; (16) EtOH осторожно слили, а осадок геномной ДНК высушили и (17) подходящий объем H₂O и РНКазу добавили непосредственно к осадку геномной ДНК. ПЦР-амплификацию 18s rRNA гена проводили с использованием ранее описанных праймеров (Honda et. al, J. Euk. Micro. 46(6): 637-647 (1999)). Условия проведения ПЦР с использованием хромосомной ДНК-матрицы были следующие: 0,2 мкМ dNTPs, 0,1 мкМ каждого праймера, 8% DMSO, 200 нг хромосомной ДНК, 2,5 U Herculase® II Fusion ДНК полимеразы (Stratagene) и Herculase® буфер (Stratagene) в общем объеме 50 мкл. Протокол ПЦР включал следующие стадии: (1) 95°C в течение 2 мин; (2) 95°C в течение 35 с; (3) 55°C в течение 35 с; (4) 72°C в течение 1 мин и 30 с; (5) повторные стадии 2-4 в течение 30 циклов; (6) 72°C в течение 5 мин и (7) хранение при 4°C.

ПЦР-амплификация давала отчетливый ДНК-продукт ожидаемого размера при использовании хромосомной матрицы, описанной выше. ПЦР-продукт клонировали в вектор pJET1.2/blunt (Fermentas) в соответствии с инструкциями производителя, и последовательность вставки определяли с использованием предоставленных в комплекте стандартных праймеров.

Филогенетический анализ расположил РТА-10212 в генеалогический ряд, который включает *Thraustochytrium pachydermum* и *Thraustochytrium aggregatum* при умеренном подтверждении. Спорангии *T. pachydermum* имеют очень тонкие клеточные стенки. *T. aggregatum* образуют явно видимые скопления сорусов, являющиеся непрозрачными. РТА-10212 не показывает ни одну из этих характеристик. Наличие множества амебоидных клеток описано у других видов, таких как *Ulkenia*, *T. gaertnerium*, *A. limiacinum* и *S. mangrovei*; однако, описания, связанные с другими видами отличаются от наблюдаемых характеристик изолята. Более того, РТА-10212 не показывает филогенетическое родство по отношению к любому из этих видов.

Табл. 3 показывает сравнение последовательности 18s rRNA микроорганизма, депонированного под учетным номером ATCC РТА-10212, с последовательностью ДНК в электронной базе данных Национального центра биотехнологической информации (NCBI). Процент идентичности определяли с исполь-

зованием двух разных расчетов. "Расчет № 1" учитывает любые "пропуски", имеющиеся в последовательности или за счет негомологичных участков или частичной последовательности (AlignX-VectorNTI стандартные настройки). "Расчет №2" не включает начисленный штраф за пропуски (AlignX-VectorNTI "IDENTITY" материнские настройки).

Таблица 3. Сравнение последовательности 18s rRNA

Thraustochytrids (Траустохитридиевые)	% Идентичности Расчет № 1	% Идентичности Расчет № 2
<i>Thraustochytrium pachydermum</i>	85%	93%
<i>Thraustochytrium aggregatum</i> (p)	83%	92%
<i>Thraustochytrium gaertnerium</i>	82%	92%
<i>Ulkenia visurgensis</i>	82%	92%
<i>Schizochytrium sp. PTA-9695</i>	80%	92%
<i>Schizochytrium mangrovei</i>	80%	91%
<i>Schizochytrium sp. ATCC 20888</i>	80%	90%
<i>Aurantiochytrium limiacinum</i>	79%	90%

(p): указывает частичную последовательность

Как показано в табл. 3, было обнаружено, что в отношении процента идентичности 18s rRNA последовательность гена (SEQ ID NO:1) микроорганизма, депонированного под учетным номером ATCC PTA-10212, является связанной, хотя не идентичной, с 18s rRNA последовательностью гена из базы данных NCBI. Общеизвестно, что организмы могут иметь близкородственные 18s rRNA генные последовательности, притом, что принадлежат к различным родам или видам.

Исходя из представленной выше характеристики, полагают, что изолированный микроорганизм, депонированный под учетным номером ATCC PTA-10212, представляет новый вид *Thraustochytrium* и потому также называется *Thraustochytrium sp. ATCC PTA-10212*.

Таксономические характеристики изолированного микроорганизма, депонированного под учетным номером PTA-10208

Микроорганизм, депонированный под учетным номером ATCC PTA-10208 ("PTA-10208"), был идентифицирован как субизолат (отдельная клетка, выделенная из культуры и сохраненная в виде новой отдельной и особой культуры) микроорганизма, депонированного под учетным номером ATCC PTA-9695 ("PTA-9695"), описанного в заявке США № 12/407687 и PCT/US2009/001720, каждый из которых полностью включается в описание путем отсылки.

PTA-10208 имеет общие таксономические характеристики с PTA-9695. Было обнаружено, что PTA-9695 имеет двухжгутиковые зооспоры, которые при выделении активно выплывают из зрелого спорангия, остатки стенки ясно видны (в фазовом контрасте) после высвобождения спор. Спорангий PTA-9695 был измерен и составлял от 12,5 до 25 мкм в диаметре, а размер зооспор составлял от 2,5 до 2,8 мкм × 4,5 мкм до 4,8 мкм. Имелось от 8 до 24 спор на отдельный спорангий PTA-9695. Осевшие PTA-9695 зооспоры увеличивались и незамедлительно претерпевали двойное деление, приводящее к тетрадам, октадам и, наконец, к кластерам спорангиев. Образование тетрады начиналось на очень ранней стадии до созревания спорангия. Эти характеристики соответствуют роду *Schizochytrium*. Относительно процента идентичности было обнаружено, что PTA-9695 18s rRNA последовательность гена (SEQ ID NO:2), которая является общей с PTA-10208, является близкородственной, хотя не идентичной, с 18s rRNA генной последовательностью *T. aggregatum*, предоставленного в Honda, D. et al., J. Euk. Micro. 46(6): 637-647 (1999). Последовательность 18s rRNA, опубликованная в отношении *Thraustochytrium aggregatum*, является частичной последовательностью, с пропуском приблизительно 71 нуклеотидов в середине последовательности ДНК. Полагают, что PTA-9695 представляет собой новый вид *Schizochytrium*. Соответственно, субизолат PTA-10208 также называется *Schizochytrium sp. ATCC PTA-10208*.

Пример 2. Ростовые характеристики изолированного микроорганизма, депонированного под учетным номером ATCC PTA-10212

Характеристики роста изолированного микроорганизма, депонированного под учетным номером ATCC PTA-10212, были исследованы в отдельных партиях культивирования, как описано ниже. Типичные среды и условия культивирования показаны в табл. 1.

В культурах с углеродной (глицерин) и азотной подпиткой с 1000 ppm Cl⁻ при 22,5°C с 20% растворенного кислорода при pH 7,3 PTA-10212 продуцировал сухой вес клеток 26,2 г/л через 138 ч культивирования в биореакторе объемом 10 л. Выход липидов составлял 7,9 г/л; выход омега-3 составлял 5,3 г/л; выход ЕРА составлял 3,3 г/л и выход ДНА составлял 1,8 г/л. Содержание жирных кислот составляло 30,3 вес.%; содержание ЕРА составляло 41,4% метиловых эфиров жирных кислот (FAME) и содержание ДНА составляло 26,2% FAME. Продуктивность липидов составляла 1,38 г/л/день, и продуктивность омега-3 составляла 0,92 г/л/день при этих условиях при ЕРА-продуктивности 0,57 г/л/день и ДНА-продуктивности 0,31 г/л/день.

В культурах с углеродной (глицерин) и азотной подпиткой с 1000 ppm Cl⁻ при 22,5°C с 20% растворенного кислорода при pH 7,3 PTA-10212 продуцировал сухой вес клеток 38,4 г/л через 189 часов культивирования в биореакторе объемом 10 л. Выход липидов составлял 18 г/л; выход омега-3 составлял 12

г/л; выход ЕРА составлял 5 г/л и выход ДНА составлял 6,8 г/л. Содержание жирных кислот составляло 45% по весу; содержание ЕРА составляло 27,8% FAME; и содержание ДНА составляло 37,9% FAME. Продуктивность липидов составляла 2,3 г/л/день, и продуктивность омега-3 составляла 1,5 г/л/день при этих условиях, при ЕРА-продуктивности 0,63 г/л/день и ДНА-продуктивности 0,86 г/л/день.

В культурах с углеродной (глицерин) и азотной подпиткой с 1000 ppm CГ при 22,5°C с 20% растворенного кислорода при pH 6,8-7,7 РТА-10212 продуцировал сухой вес клеток 13 г/л через 189 ч культивирования в биореакторе объемом 10 л. Выход липидов составлял 5,6 г/л; выход омега-3 составлял 3,5 г/л; выход ЕРА составлял 1,55 г/л и выход ДНА составлял 1,9 г/л. Содержание жирных кислот составляло 38 вес.%; содержание ЕРА составляло 29,5% FAME и содержание ДНА составляло 36% FAME. Продуктивность липидов составляла 0,67 г/л/день, и продуктивность омега-3 составляла 0,4 г/л/день при этих условиях, при ЕРА-продуктивности 0,20 г/л/день и ДНА-продуктивности 0,24 г/л/день.

В культурах с углеродной (глицерин) и азотной подпиткой с 1000 ppm CГ при 22,5-28,5°C с 20% растворенного кислорода при pH 6,6-7,2 РТА-10212 продуцировал сухой вес клеток 36,7 г/л - 48,7 г/л через 191 ч культивирования в биореакторе объемом 10 л. Выход липидов составлял 15,2 г/л - 25,3 г/л; выход омега-3 9,3 г/л - 13,8 г/л; выход ЕРА составлял 2,5 г/л - 3,3 г/л; и выход ДНА составлял 5,8 г/л - 11 г/л. Содержание жирных кислот составляло 42,4-53% по весу; содержание ЕРА составляло 36% FAME; и содержание ДНА составляло 36% FAME. Содержание ЕРА составляло 9,8% - 22% FAME; и содержание ДНА составляло 38,1-43,6% FAME. Продуктивность липидов составляла 1,9 г/л/день - 3,2 г/л/день, и продуктивность омега-3 составляла 1,2 г/л/день - 1,7 г/л/день при этих условиях, при ЕРА-продуктивности 0,31 г/л/день - 0,41 г/л/день и ДНА-продуктивности 0,72 г/л/день - 1,4 г/л/день.

Ростовые характеристики изолированного микроорганизма, депонированного под учетным номером РТА-10208

Особенности роста изолированного микроорганизма, депонированного под учетным номером АТСС РТА-10208, были изучены в отдельных партиях культивирования, как описано ниже. Типичные среды и условия культивирования показаны в табл. 2.

В культурах с углеродной (глицерин) и азотной подпиткой с 1000 ppm CГ при 22,5°C, при pH 7,0 с 20% растворенного кислорода во время питания азотом и 10% растворенного кислорода в дальнейшем, РТА-10208 продуцировал сухой вес клеток 95 г/л через 200 ч культивирования в биореакторе объемом 10 л. Выход липидов составлял 53,7 г/л; выход омега-3 составлял 37 г/л; выход ЕРА составлял 14,3 г/л и выход ДНА составлял 21 г/л. Содержание жирных кислот составляло 57% по весу; содержание ЕРА составляло 27,7% FAME и содержание ДНА составляло 39,1% FAME. Продуктивность липидов составляла 6,4 г/л/день, и продуктивность омега-3 составляла 4,4 г/л/день при этих условиях, при ЕРА-продуктивности 1,7 г/л/день и ДНА-продуктивности 2,5 г/л/день.

В культурах с углеродной (глицерин) и азотной подпиткой с 1000 ppm CГ при 22,5°C, при pH 7,5 с 20% растворенного кислорода во время питания азотом и 10% растворенного кислорода в дальнейшем, РТА-10208 продуцировал сухой вес клеток 56 г/л через 139 ч культивирования в биореакторе объемом 10 л. Выход липидов составлял 53 г/л; выход омега-3 составлял 34 г/л; выход ЕРА составлял 11,5 г/л; и выход ДНА составлял 22 г/л. Содержание жирных кислот составляло 58% по весу; содержание ЕРА составляло 21,7% FAME; и содержание ДНА составляло 41,7% FAME. Продуктивность липидов составляла 9,2 г/л/день, и продуктивность омега-3 составляла 5,9 г/л/день при этих условиях, при ЕРА-продуктивности 2 г/л/день и ДНА-продуктивности 3,8 г/л/день.

В культурах с углеродной (глицерин) и азотной подпиткой с 1000 ppm CГ при 22,5°C, при pH 7,0 с 20% растворенного кислорода во время питания азотом и 10% растворенного кислорода в дальнейшем, РТА-10208 продуцировал сухой вес клеток 93,8 г/л через 167 ч культивирования в биореакторе объемом 2000 л. Выход липидов составлял 47,2 г/л; выход омега-3 составлял 33,1 г/л; выход ЕРА составлял 10,5 г/л и выход ДНА составлял 20,4 г/л. Содержание жирных кислот составляло 50,6% по весу; содержание ЕРА составляло 23% FAME; и содержание ДНА составляло 42,6% FAME. Продуктивность липидов составляла 6,8 г/л/день, и продуктивность омега-3 составляла 4,7 г/л/день при этих условиях, при ЕРА-продуктивности 1,5 г/л/день и ДНА-продуктивности 2,9 г/л/день.

В культурах с углеродной (глицерин) и азотной подпиткой с 1000 ppm CГ при 22,5°C при pH 7,0 с 20% растворенного кислорода во время питания азотом и 10% растворенного кислорода в дальнейшем, РТА-10208 продуцировал сухой вес клеток 105 г/л через 168 ч культивирования в биореакторе объемом 2000 л. Выход липидов составлял 46,4 г/л; выход омега-3 составлял 33 г/л; выход ЕРА составлял 10,7 г/л и выход ДНА составлял 20,3 г/л. Содержание жирных кислот составляло 43,9% по весу; содержание ЕРА составляло 24% FAME; и содержание ДНА составляло 43,7% FAME. Продуктивность липидов составляла 6,6 г/л/день, и продуктивность омега-3 составляла 4,7 г/л/день при этих условиях, при ЕРА-продуктивности 1,5 г/л/день и ДНА-продуктивности 2,9 г/л/день.

В культурах с углеродной (глицерин) и азотной подпиткой с 1000 ppm CГ при 22,5°C при pH 7,0 с 20% растворенного кислорода во время питания азотом и 10% растворенного кислорода в дальнейшем, РТА-10208 продуцировал сухой вес клеток 64,8 г/л через 168 ч культивирования в биореакторе объемом 2000 л. Выход липидов составлял 38,7 г/л; выход омега-3 составлял 29,9 г/л; выход ЕРА составлял 8,5 г/л и выход ДНА составлял 16,7 г/л. Содержание жирных кислот составляло 59,6% по весу; содержание ЕРА

составляло 23% FAME; и содержание DHA составляло 42,3% FAME. Продуктивность липидов составляла 5,53 г/л/день, и продуктивность омега-3 составляла 3,8 г/л/день при этих условиях, при EPA-продуктивности 1,2 г/л/день и DHA-продуктивности 2,3 г/л/день.

Пример 3. Профили жирных кислот штаммов микроорганизмов ATCC PTA-10208 и PTA-10212

Четыре образца биомассы (PTA-10208 образец № 1; PTA-10208 образец № 2; PTA-10212 образец № 1; и PTA-10212 образец № 2) были исследованы на содержание общего сырого масла с помощью экстракции растворителем, классы липидов были определены с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии/испарительного детектора светорассеяния (HPLC/ELSD), триглицериды (TAG) были исследованы с помощью HPLC/масс-спектрометрии (HPLC/MS) и профили жирных кислот (FA) были определены с помощью газовой хроматографии с пламенно-ионизационным детектором (GC-FID). Содержание сырых липидов в каждой высушенной сублимацией биомассе определяли путем разделения растворителем с использованием гексана и сравнивали с суммой FAME (мг/г), полученных прямой перэтерификацией, и полученные в результате сложные метиловые эфиры жирных кислот (FAME) были количественно определены с помощью GC/FID анализа. Жирные кислоты в экстрагированном сыром липиде также были количественно определены перэтерификацией и количественно определены с помощью GC/FID-анализа полученных в результате FAME. Весовое процентное содержание всех нейтральных липидов (NL) и свободных жирных кислот (FFA) было определено в экстрагированном сыром липиде с использованием нормально-фазной HPLC вместе с ELSD, а идентификация была осуществлена с помощью масс-спектрометрии с химической ионизацией при атмосферном давлении (APCI-MS). С помощью данного метода можно разделить и количественно определить сложные стероловые эфиры (SE), TAG, свободные жирные кислоты (FFA), 1,3-диацилглицеролы (1,3-DAG), стеролы, 1,2-диацилглицеролы (1,2-DAG), и моноацилглицеролы (MAG). Результаты показаны в таблицах 4 и 5, ниже.

TAG и фосфолипиды (PL) были выделены из сырых масел, извлеченных из четырех образцов биомассы (PTA-10208 образец № 1; PTA-10208 образец № 2; PTA-10212 образец № 1; и PTA-10212 образец № 2). TAG выделяли с помощью флэш-хроматографии с низким давлением, а PL выделяли с помощью твердофазной экстракции (SPE). Идентичность каждой изолированной фракции была подтверждена с помощью тонкослойной хроматографии (TLC). Профили жирных кислот выделенных фракций TAG и PL были определены после прямой перэтерификации с использованием GC-FID в виде FAME. Результаты показаны в табл. 6 и 7 ниже.

Общее содержание сырого масла и жирнокислотные профили выделенных классов липидов также были определены в двух дополнительных образцах биомассы штамма микроорганизма ATCC PTA-10212 (PTA-10212 образец № 3 и PTA-10212 образец № 4). Сырое масло было получено из каждого образца экстракцией гексаном, а отдельные классы липидов были выделены с использованием флэш-хроматографии низкого давления. Профили жирных кислот биомассы, сырое масло и выделенные фракции были определены с помощью GC-FID в виде FAME. Результаты показаны в табл. 8-11, ниже.

Отдельные классы липидов были выделены из образца сырого масла, полученного от штамма микроорганизма ATCC PTA-10212 (PTA-10212 образец №5), ранее экстрагированного с помощью процесса FRIOLEX®, и жирнокислотные профили каждого класса были определены с использованием GC-FID в виде FAME. Результаты показаны в табл. 12 и 13, ниже.

Отдельные классы липидов были выделены из образца сырого масла, полученного от штамма микроорганизма ATCC PTA-10208 (PTA-10208 образец № 3) с использованием нормальной HPLC вместе с ELSD и APCI-MS-идентификации.

Методика эксперимента

Экстракция сырого масла.

Сырое масло извлекали из образцов высушенной сублимацией биомассы с использованием разделения растворителем. Например, приблизительно 3 г биомассы отвешивали в Swedish пробирку. Три шарика (ball bearings) и 30 мл гексана добавили в Swedish пробирку, которую запечатали неопреновой пробкой и поместили в шейкер на 2 ч. Полученную в результате кашу профильтровали с использованием воронки Бюхнера и фильтровальной бумаги Whatman. Профильтрованную жидкость собрали, растворитель удалили под вакуумом и гравиметрически определили количество оставшегося сырого липида.

Анализ жирных кислот.

Образцы биомассы, выделенный сырой липид и выделенные классы липидов были исследованы в отношении состава жирных кислот в виде FAME. Коротко, высушенная сублимацией биомасса и выделенные классы липидов были взвешены прямо в пробирках с навинчивающейся крышкой, в то время как образцы сырого масла были растворены в гексане для получения концентрации приблизительно 2 мг/мл. В каждую пробирку был добавлен толуол, включая внутренний стандарт, и 1,5 N HCl в метаноле. Пробирки перемешивали на вортексе, закрывали и нагревали до 100°C в течение 2 ч. Пробиркам дали возможность охладиться и добавили насыщенный раствор NaCl в воде. Пробирки вновь перемешивали на вортексе и центрифугировали, чтобы дать возможность слоям разделиться. Затем органический слой поместили в GC флакон и исследовали с помощью GC-FID. FAME количественно определяли с помощью 3-точковой калибровочной шкалы, полученной с помощью стандартного образца Nu-Check-Prep GLC (NuCheck, Elysian, MN). Присутствующие в экстракте жирные кислоты выражались в виде весового про-

цента. Содержание жира в образцах оценивали, исходя из равного ответа на внутренний стандарт при анализе с помощью GC-FID.

HPLC/ELSD/MS Метод:

Прибор - Agilent 1100 HPLC, Alltech 3300 ELSD, Agilent 1100 MSD

Колонка - Phenomenex Luna Silica, 250 × 4,6 мм, 5 мкм размер частиц вес./защитная колонка

Подвижная фаза - А - 99,5% гексаны (Omnisolv); 0,4% изопропиловый спирт (Omnisolv); 0,1% уксусная кислота; В - 99,9% этанол (Omnisolv, 95:5 Этанол:IPA), 0,1% уксусная кислота

Градиент

Время, мин.	% А	% В
0	100	0
5	100	0
15	85	10
20	0	100
25	0	100
26	100	0
35	100	0

Темп. колонки 30°C

Скорость потока 1,5 мл/мин

Объем вводимой пробы 5 мкл

ELSD обнаружение - температура 35°C, ток газа 1,2 л/мин

MSD - диапазон массы 200-1200, фрагментор 225 V;

температура сушильного газа 350°C;

температура испарителя 325°C;

капиллярное напряжение 3500 V;

ток короны 10 µA.

Твердофазная экстракция

Фракции PL отделяли от сырого липида с помощью твердофазной экстракции (SPE) с использованием 2 г амилопропиловых картриджей (Biotage, Uppsala, Швеция) помещенных в прибор Vac Elut (Varian Inc, Palo Alto, США). Картридж обрабатывали 15 мл гексана, ~60 мг каждого образца растворили в 1 мл CHCl_3 и перенесли в картридж. Колонку промыли 15 мл 2:1 CHCl_3 :изопропиловый спирт для элюирования всех нейтральных липидов, которые удалялись. Затем элюировали жирные кислоты с помощью 15 мл 2% уксусной кислоты (HOAc) в эфире, которые удалялись. Часть PL, элюированную с помощью 15 мл 6:1 метанол:хлороформ, собирали, высушивали под азотом и взвешивали.

Флэш-хроматография.

Для отделения классов липидов, присутствующих в сыром масле, использовали флэш-хроматографию. Приблизительно 200 мг сырого масла, растворенного в гексане, впрыскивали во вход колонки. Использовали хроматографическую систему Silica Gel 60 (EMD Chemical, Gibbstown, Нью-Джерси) с подвижной фазой, состоящей из петролейного эфира и этилацетата при 5 мл/мин (табл. 6-7) или 3 мл/мин (табл. 8-13). Для селективного элюирования каждого класса липидов из колонки использовали ступенчатый градиент. Градиент мобильной фазы начинался со 100% петролейного эфира и заканчивался 50% этилацетатом. Фракции собирали в 10 мл пробирки, используя коллектор фракций Gilson FC 204 large-bed (Gilson, Inc., Middleton, WI). Каждую пробирку исследовали с помощью тонкослойной хроматографии (TLC), и пробирки, содержащие отдельные классы липидов (судя по одиночным пятнам на TLC пластине с ожидаемым фактором удерживания (R_f)), объединяли, концентрировали до сухости и взвешивали. Затем общее содержание фракций определяли гравиметрически.

TLC-анализ.

Тонкослойную хроматографию проводили на пластинках силикагеля. Планшеты элюировали с использованием системы растворителей, состоящей из петролейного эфира : этилового эфира : уксусной кислоты (80:20:1), и визуализацию осуществляли с помощью паров йода. Затем R_f -значения каждого пятна сравнивали с сообщенными в литературе значениями для каждого класса липидов.

Анализ фракций TAG и PL.

Выделенные фракции TAG и PL исследовали на состав жирных кислот в виде сложных метиловых эфиров жирных кислот (FAME). Фракции TAG растворили в гексане до получения концентрации приблизительно 1-2 мг/мл. Аликвоты раствора 1 мл концентрировали до сухости под азотом. В каждую пробирку был добавлен толуол, включая внутренний стандарт, и 1,5 N HCl в метаноле. Пробирки перемешивали на вортексе, закрывали и нагревали до 100°C в течение 2 ч. Прямо в пробирки, содержащие фракцию PL, добавили внутренний стандарт и HCl метанол и нагрели. Пробиркам дали остыть и добавили насыщенный раствор NaCl в воде. Пробирки вновь перемешивали на вортексе и центрифугировали, чтобы дать возможность слоям разделиться. Затем органический слой поместили в GC флакон и исследовали с помощью GC-FID. FAME количественно определяли с помощью 3-точковой калибровочной шкалы, полученной с помощью стандартного образца Nu-Check-Prep GLC (NuCheck, Elysian, MN). Присутствующие в экстракте жирные кислоты были выражены как мг/г и как% FAME.

Результаты

РТА-10208 образец № 1.

Жирнокислотный профиль биомассы и извлеченный сырой липид в РТА-10208 образец № 1 определяли с помощью GC/FID. Жирные кислоты в биомассе были переэтерифицированы *in situ* посредством взвешивания 28,6 мг биомассы непосредственно в пробирку с FAME, тогда как образец извлеченного сырого липида подготавливали путем отвешивания 55,0 мг сырого липида в 50 мл мерную колбу и переноса 1 мл в пробирку для разделения FAME. По оценке содержание сырого липида в биомассе составляло 53,2% (в виде суммы FAME) при использовании GC вместе с FID обнаружением, тогда как 52,0% (вес./вес.) липида было извлечено из сухой биомассы, давая восстановление общего липида 97,8%. Было определено, что сырой липид составлял 91,9% жирных кислот (в виде суммы FAME) при использовании GC/FID. Основными жирными кислотами, содержащимися в сыром липиде были C16:0 (182,5 мг/г), C20:5 n-3 (186,8 мг/г), и C22:6 n-3 (423,1 мг/г).

Профиль классов липидов в экстрагированном сыром липиде был определен путем отвешивания 55,0 мг сырого липида в 50 мл мерную колбу и переноса аликвоты во флакон для HPLC с целью проведения HPLC/ELSD/MS-анализа. Согласно HPLC/ELSD/MS-анализу, сырой липид содержал 0,2% сложных стероловых эфиров (SE), 95,1% TAG, 0,4% стеролов и 0,5% 1,2-диацилглицерина (DAG). 5% фракции TAG включали пик, который был элюирован сразу после TAG пика, но не давал узнаваемого масс-спектра.

Как определено с помощью флэш-хроматографии, TAG, выделенный из этого образца, составлял приблизительно 92,4% сырого масла. PL не был обнаружен по весу или TLC после SPE выделения. Основными жирными кислотами (>50 мг/г), содержащимися в TAG, были C16:0 (189 мг/г), C20:5 n-3 (197 мг/г) и C22:6 n-3 (441 мг/г).

РТА-10208 образец № 2.

Жирнокислотный профиль биомассы и извлеченный сырой липид в РТА-10208 образец № 2 определяли с помощью GC/FID. Жирные кислоты в биомассе были переэтерифицированы *in situ* посредством взвешивания 32,0 мг биомассы непосредственно в пробирку с FAME, тогда как образец извлеченного сырого липида подготавливали путем отвешивания 60,1 мг сырого липида в 50 мл мерную колбу и переноса 1 мл в пробирку для разделения FAME. По оценке содержание сырого липида в биомассе составляло 52,4% (в виде суммы FAME) при использовании GC вместе с FID обнаружением, тогда как 48,0% (вес./вес.) липида было извлечено из сухой биомассы, давая восстановление общего липида 91,7%. Было определено, что сырой липид составлял 95,3% жирных кислот (в виде суммы FAME) при использовании GC/FID. Основными жирными кислотами, содержащимися в сыром липиде, были C16:0 (217,5 мг/г), C20:5 n-3 (169,3 мг/г) и C22:6 n-3 (444,1 мг/г).

Профиль классов липидов в экстрагированном сыром липиде был определен путем отвешивания 60,1 мг сырого липида в 50 мл мерную колбу и переноса аликвоты во флакон для HPLC с целью проведения HPLC/ELSD/MS-анализа. Согласно HPLC/ELSD/MS-анализу, сырой липид содержал 0,2% SE, 95,7% TAG, 0,3% стеролов и 0,7% 1,2-DAG. 5,1% фракции TAG включали пик, который был элюирован сразу после TAG пика, но не давал узнаваемого масс-спектра.

Как определено с помощью флэш-хроматографии, TAG, выделенный из этого образца, составлял приблизительно 93,9% сырого масла. PL не был обнаружен по весу или TLC после SPE выделения. Основными жирными кислотами (>50 мг/г), содержащимися в TAG, были C16:0 (218 мг/г), C20:5 n-3 (167 мг/г) и C22:6 n-3 (430 мг/г).

РТА-10208 образец № 3.

Образец сырого масла, полученного от микроорганизма, депонированного под учетным номером ATCC РТА-10208 (образец РТА-10208 № 3), был исследован с использованием HPLC/ELSD/MS. Всего 98,38% липидов было восстановлено, при этом фракция сложных стероловых эфиров (SE) составляла 0,32%, фракция TAG составляла 96,13%, фракция 1,3-диацилглицерина (DAG) составляла 0,22%, фракция 1,2-DAG составляла 0,78%, и стерольная фракция составляла 0,93%.

РТА-10212 образец № 1.

Жирнокислотный профиль биомассы и извлеченный сырой липид в РТА-10212 образец № 1 определяли с помощью GC/FID. Жирные кислоты в биомассе были переэтерифицированы *in situ* посредством взвешивания 27,0 мг биомассы непосредственно в пробирку с FAME, тогда как образец извлеченного сырого липида подготавливали путем отвешивания 52,5 мг сырого липида в 50 мл мерную колбу и переноса 1 мл в пробирку для разделения FAME. По оценке содержание сырого липида в биомассе составляло 38,3% (в виде суммы FAME) при использовании GC вместе с FID обнаружением, тогда как 36,3% (вес./вес.) липида было извлечено из сухой биомассы, давая восстановление общего липида 94,6%. Было определено, что сырой липид составлял 83,2% жирных кислот (в виде суммы FAME) при использовании GC/FID. Основными жирными кислотами, содержащимися в сыром липиде были C16:0 (328,5 мг/г), C20:5 n-3 (90,08 мг/г) и C22:6 n-3 (289,3 мг/г).

Профиль классов липидов в экстрагированном сыром липиде был определен путем отвешивания 52,5 мг сырого липида в 50 мл мерную колбу и переноса аликвоты во флакон для HPLC с целью проведения HPLC/ELSD/MS-анализа. Согласно HPLC/ELSD/MS-анализу сырой липид содержал 0,2% SE,

64,2% TAG, 1,9% FFA, 2,8% 1,3-DAG, 1,4% стеролов, 18,8% 1,2-DAG и 0,5% MAG. 5,1% фракции TAG включали пик, который был элюирован сразу после TAG пика, но не давал узнаваемого масс-спектра.

TAG, выделенный из этого образца, составлял приблизительно 49,8% сырого масла. Выделенные PL составляли приблизительно 8,1% сырого масла. Основными жирными кислотами (>50 мг/г), содержащимися в TAG фракции, являются C16:0 (400 мг/г), C20:5 n-3 (91 мг/г), и C22:6 n-3 (273 мг/г). Основными жирными кислотами (>50 мг/г), содержащимися в PL фракции, являются C16:0 (98 мг/г), C20:5 n-3 (33 мг/г), и C22:6 n-3 (227 мг/г).

РТА-10212 образец № 2.

Жирнокислотный профиль биомассы и извлеченный сырой липид в РТА- РТА-10212 образец № 2 определяли с помощью GC/FID. Жирные кислоты в биомассе были переэтерифицированы *in situ* посредством взвешивания 29,5 мг биомассы непосредственно в пробирке с FAME, тогда как образец извлеченного сырого липида подготавливали путем отвешивания 56,5 мг сырого липида в 50 мл мерную колбу и переноса 1 мл в пробирку для разделения FAME. По оценке содержание сырого липида в биомассе составляло 40,0% (в виде суммы FAME) при использовании GC вместе с FID обнаружением, тогда как 41,3% (вес./вес.) липида было извлечено из сухой биомассы, давая восстановление общего липида 106,1%. Было определено, что сырой липид составлял 82,8% жирных кислот (в виде суммы FAME) при использовании GC/FID. Основными жирными кислотами, содержащимися в сыром липиде, были C16:0 (327,3 мг/г), C20:5 n-3 (92,5 мг/г) и C22:6 n-3 (277,6 мг/г).

Профиль классов липидов в экстрагированном сыром липиде был определен путем отвешивания 56,5 мг сырого липида в 50 мл мерную колбу и переноса аликвоты во флакон для HPLC с целью проведения HPLC/ELSD/MS-анализа. HPLC/ELSD/MS-анализу, сырой липид содержал 0,2% SE, 58,2% TAG, 2,3% FFA, 3,4% 1,3-DAG, 1,7% стеролов, 23,4% 1,2-DAG и 0,6% MAG. 3,3% фракции TAG включали пик, который был элюирован сразу после TAG пика, но не давал узнаваемого масс-спектра.

TAG, выделенный из этого образца, составлял приблизительно 51,9% сырого масла. Выделенные PL составляли приблизительно 8,8% сырого масла. Основными жирными кислотами (>50 мг/г), содержащимися в TAG фракции, являются C16:0 (402 мг/г), C20:5 n-3 (92 мг/г) и C22:6 n-3 (245 мг/г). Основными жирными кислотами (>50 мг/г), содержащимися в PL фракции, являются C16:0 (121 мг/г), C20:5 n-3 (48 мг/г) и C22:6 n-3 (246 мг/г).

Таблица 4. Профили жирных кислот биомасс РТА-10208 и РТА-10212 и экстрагированные сырые липиды (мг/г)

	РТА-10208 Образец № 1	РТА-10208 Образец № 1	РТА-10208 Образец № 2	РТА-10208 Образец № 2	РТА-10212 Образец № 1	РТА-10212 Образец № 1	РТА-10212 Образец № 2	РТА-10212 Образец № 2
	Биомасса	Сырой липид	Биомасса	Сырой липид	Биомасса	Сырой липид	Биомасса	Сырой липид
Жирная кислота	FAME (мг/г)	FAME (мг/г)	FAME (мг/г)	FAME (мг/г)	FAME (мг/г)	FAME (мг/г)	FAME (мг/г)	FAME (мг/г)
C12:0	1,47	2,43	1,80	3,14	0,99	1,90	0,87	1,91
C14:0	11,62	20,12	16,72	31,03	5,51	12,91	5,97	13,69
C14:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C15:0	2,43	3,75	3,60	6,22	9,13	20,42	9,39	20,81
C16:0	105,04	182,47	117,72	217,49	145,87	328,45	147,87	327,27
C16:1	0,00	0,00	0,06	0,01	6,26	14,53	7,46	16,89
C18:0	5,37	8,96	4,77	8,37	6,77	15,39	6,77	15,15
C18:1 n-9	0,00	3,26	0,00	3,09	0,03	4,04	0,08	5,87
C18:1 n-7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C18:2 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:0	1,48	1,79	1,40	1,85	1,60	3,09	1,67	3,20
C18:3 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:1 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

C18:4 n-3	0,91	1,61	1,10	2,00	2,28	2,56	2,21	2,64
C20:2 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:3 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:0	0,10	0,00	0,08	0,00	0,30	0,12	0,35	0,24
C20:4 n-7	0,81	0,45	0,67	0,41	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:4 n-6	7,22	12,23	6,84	12,18	1,19	2,26	1,31	2,32
C22:1 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:4 n-5	0,63	0,52	0,00	0,46	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:4 n-3	3,45	5,45	3,33	5,58	0,00	2,40	0,00	2,34
C20:3 n-3	0,09	0,00	0,11	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:5 n-3	107,31	186,83	92,99	169,32	40,32	90,08	43,15	92,54
C22:4 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C24:0	0,60	0,00	0,52	0,00	2,81	6,83	2,74	6,53
C24:1 n-9	1,55	3,26	0,85	2,04	0,43	1,34	0,42	1,24
C22:5 n-6	9,66	15,84	10,27	17,98	2,42	4,68	2,32	4,21
C22:5 n-3	20,44	35,13	9,92	17,50	2,41	4,94	2,69	5,23
C22:6 n-3	246,98	423,10	245,96	444,08	139,58	289,34	137,35	277,57
Сумма FAME	527,15	907,18	518,71	942,75	367,89	805,29	372,63	799,68

Таблица 5. Профили жирных кислот в биомассах РТА-10208 и РТА-10212 и экстрагированные сырые липиды (%)

	РТА-10208 Образец № 1	РТА-10208 Образец № 1	РТА-10208 Образец № 2	РТА-10208 Образец № 2	РТА-10212 Образец № 1	РТА-10212 Образец № 1	РТА-10212 Образец № 2	РТА-10212 Образец № 2
	Биомасса	Сырой липид	Биомасса	Сырой липид	Биомасса	Сырой липид	Биомасса	Сырой липид
Жирная кислота	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME
C12:0	0,28	0,27	0,35	0,33	0,27	0,24	0,23	0,24
C14:0	2,20	2,22	3,22	3,29	1,50	1,60	1,60	1,71
C14:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C15:0	0,46	0,41	0,69	0,66	2,48	2,54	2,52	2,60

C16:0	19,93	20,11	22,70	23,07	39,65	40,79	39,68	40,93
C16:1	0,00	0,00	0,01	0,00	1,70	1,80	2,00	2,11
C18:0	1,02	0,99	0,92	0,89	1,84	1,91	1,82	1,89
C18:1 n-9	0,00	0,36	0,00	0,33	0,01	0,50	0,02	0,73
C18:1 n-7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C18:2 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:0	0,28	0,20	0,27	0,20	0,43	0,38	0,45	0,40
C18:3 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:1 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C18:4 n-3	0,17	0,18	0,21	0,21	0,62	0,32	0,59	0,33
C20:2 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:3 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:0	0,02	0,00	0,01	0,00	0,08	0,02	0,09	0,03
C20:4 n-7	0,15	0,05	0,13	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:4 n-6	1,37	1,35	1,32	1,29	0,32	0,28	0,35	0,29
C22:1 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:4 n-5	0,12	0,06	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:4 n-3	0,65	0,60	0,64	0,59	0,00	0,30	0,00	0,29
C20:3 n-3	0,02	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:5 n-3	20,36	20,59	17,93	17,96	10,96	11,19	11,58	11,57
C22:4 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C24:0	0,11	0,00	0,10	0,00	0,76	0,85	0,74	0,82
C24:1 n-9	0,29	0,36	0,16	0,22	0,12	0,17	0,11	0,16
C22:5 n-6	1,83	1,75	1,98	1,91	0,66	0,58	0,62	0,53
C22:5 n-3	3,88	3,87	1,91	1,86	0,65	0,61	0,72	0,65
C22:6 n-3	46,85	46,64	47,42	47,10	37,94	35,93	36,86	34,71
Сумма FAME %	100	100	100	100	100	100	100	100

Таблица 6. Профили жирных кислот в изолированных TAG РТА-10208 и РТА-10212

	РТА-10208 Образец № 1	РТА-10208 Образец № 1	РТА-10208 Образец № 2	РТА-10208 Образец № 2	РТА-10212 Образец № 1	РТА-10212 Образец № 1	РТА-10212 Образец № 2	РТА-10212 Образец № 2
Жирная кислота	FAME (мг/г)	% FAME	FAME (мг/г)	% FAME	FAME (мг/г)	% FAME	FAME (мг/г)	% FAME
C12:0	2,57	0,27	3,35	0,36	0,00	0,00	0,00	0,00
C14:0	21,07	2,23	31,37	3,41	14,05	1,61	14,45	1,69
C14:1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C15:0	3,89	0,41	6,17	0,67	23,27	2,66	23,14	2,71
C16:0	189,28	20,07	218,78	23,75	399,51	45,75	402,43	47,07
C16:1	0,00	0,00	0,00	0,00	15,23	1,74	17,62	2,06
C18:0	9,21	0,98	8,07	0,88	22,70	2,60	23,10	2,70
C18:1 n-9	3,35	0,36	3,64	0,40	6,12	0,70	7,48	0,87
C18:1 n-7	0,00	0,00	0,00	0,00	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
C18:2 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:0	1,86	0,20	1,55	0,17	4,76	0,55	5,32	0,62
C18:3 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:1 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C18:4 n-3	1,64	0,17	2,00	0,22	2,25	0,26	2,24	0,26
C20:2 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:3 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,55	0,06	0,89	0,10
Неизвестно	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:4 n-7	0,39	0,04	0,05	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:3 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:4 n-6	12,79	1,36	11,82	1,28	2,33	0,27	2,25	0,26
C22:1 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:4 n-5	0,39	0,04	0,07	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:4 n-3	5,52	0,59	5,09	0,55	2,87	0,33	2,98	0,35
C20:5 n-3	197,14	20,90	166,68	18,10	91,17	10,44	91,78	10,74
C24:0	0,00	0,00	0,00	0,00	6,93	0,79	7,36	0,86
C22:4 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
C24:1 n-9	1,08	0,11	<0,1	<0,1	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:5 n-6	15,88	1,68	16,57	1,80	4,01	0,46	3,39	0,40
C22:5 n-3	36,05	3,82	16,00	1,74	4,53	0,52	5,07	0,59
C22:6 n-3	440,99	46,76	429,83	46,67	273,02	31,26	245,38	28,70
Сумма FAME	943,11	-	921,03	-	873,31	-	854,89	-
Общий % FAME	-	100,00	-	100,00	-	100,00	-	100,00

Таблица 7. Профили жирных кислот в изолированной фракции PL РТА-10212

	РТА-10212 Образец № 1	РТА-10212 Образец № 1	РТА-10212 Образец № 2	РТА-10212 Образец № 2
Жирная кислота	FAME (мг/г)	% FAME	FAME (мг/г)	% FAME
C12:0	0,00	0,00	0,00	0,00
C14:0	0,93	0,22	1,89	0,39
C14:1	0,00	0,00	0,00	0,00
C15:0	3,44	0,82	5,07	1,05
C16:0	98,29	23,50	120,98	25,00
C16:1	1,15	0,27	3,07	0,63
C18:0	3,25	0,78	3,72	0,77
C18:1 n-9	1,12	0,27	0,95	0,20
C18:1 n-7	<0,1	<0,1	0,02	0,003
C18:2 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:0	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
C18:3 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:1 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00
C18:4 n-3	3,71	0,89	3,24	0,67
C20:2 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:3 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:0	0,00	0,00	0,00	0,00
Не известно	42,33	10,12	44,71	9,24
C20:4 n-7	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:3 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:4 n-6	0,84	0,20	1,54	0,32
C22:1 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:4 n-5	0,00	0,00	0,00	0,00
C20:4 n-3	<0,1	<0,1	0,27	0,06
C20:5 n-3	33,39	7,98	47,91	9,90
C24:0	<0,1	<0,1	0,01	0,001
C22:4 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00
C24:1 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00
C22:5 n-6	3,08	0,74	3,82	0,79
C22:5 n-3	<0,1	<0,1	0,66	0,14
C22:6 n-3	226,68	54,20	246,09	50,85
Сумма FAME	418,21	-	483,94	-
Общий % FAME	-	100	-	100

РТА-10212 образец № 3.

Содержание липида в биомассе РТА-10212 образец №3 по оценкам составляло 34% в виде суммы FAME, а количество сырого масла, полученного после экстракции растворителем, составляло 37% по весу, давая 109% восстановления жира, присутствующего в биомассе. После фракционирования с использованием флэш-хроматографии приблизительно 46% сырого масла было выделено в виде TAG, 28% было выделено в виде DAG. Сырое масло содержало 309 мг/г DHA и 264 мг/г EPA. Изолированные TAG содержали 341 мг/г DHA и 274 мг/г EPA. Изолированная фракция DAG содержала 262 мг/г DHA и 237 мг/г EPA. Профили общих жирных кислот биомассы, экстрагированное сырое масло и выделенные фракции показаны ниже в табл. 8 и 9 и вычислены как мг/г и % FAME соответственно.

Таблица 8. Профили жирных кислот биомассы РТА-10212 образец № 3 и экстрагированный сырой липид (мг/г)

	Биомасса	Сырое масло	TAG	DAG
Вес. %	NA	37,2%	46,0%	27,9%
Жирная кислота	FAME (мг/г)	FAME (мг/г)	FAME (мг/г)	FAME (мг/г)
C12:0	0,0	0,0	0,0	0,0
C14:0	3,6	10,3	11,5	9,4
C14:1	0,0	0,0	0,0	0,0
C15:0	4,1	10,6	9,8	6,6
C16:0	70,5	181,8	231,7	111,3
C16:1	6,7	19,1	18,7	17,1
C18:0	2,4	10,2	14,2	0,0
C18:1 n-9	0,0	6,7	0,0	0,0
C18:1 n-7	0,0	1,2	0,0	0,0
C18:2 n-6	0,0	1,8	0,0	0,0
C20:0	0,0	2,4	0,0	0,0
C18:3 n-3	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:1 n-9	0,0	0,3	0,0	1,7
C18:4 n-3	1,9	3,4	3,2	4,4
C20:2 n-6	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:3 n-6	0,0	0,0	0,0	0,0
C22:0	3,3	0,0	0,0	0,0
C20:4 n-7	0,0	2,1	1,5	0,0
C20:3 n-3	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 n-6	6,8	17,9	21,4	13,8
C22:1 n-9	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 n-5	0,0	1,3	1,3	0,0
C20:4 n-3	3,0	8,5	10,9	6,4
C20:5 n-3	102,0	263,6	274,2	237,4
C24:0	0,0	1,7	3,9	0,0
C22:4 n-9	0,0	0,0	0,0	0,0
C24:1 n-9	0,0	0,0	4,2	0,0
C22:5 n-6	3,2	8,3	10,7	6,1
C22:5 n-3	3,8	10,4	15,1	6,6
C22:6 n-3	131,2	309,4	341,1	261,9
Сумма FAME	342,4	871,1	973,2	682,6

Таблица 9. Профили жирных кислот биомассы РТА-10212 образец №3 и экстрагированный сырой липид (%)

	Биомасса	Сырое масло	TAG	DAG
Вес. %	NA	37,2%	46,0%	27,9%
Жирная кислота	FAME (мг/г)	FAME (мг/г)	FAME (мг/г)	FAME (мг/г)
C12:0	0,0	0,0	0,0	0,0
C14:0	1,1	1,2	1,2	1,4
C14:1	0,0	0,0	0,0	0,0
C15:0	1,2	1,2	1,0	1,0
C16:0	20,6	20,9	23,8	16,3
C16:1	2,0	2,2	1,9	2,5
C18:0	0,7	1,2	1,5	0,0
C18:1 n-9	0,0	0,8	0,0	0,0
C18:1 n-7	0,0	0,1	0,0	0,0
C18:2 n-6	0,0	0,2	0,0	0,0
C20:0	0,0	0,3	0,0	0,0
C18:3 n-3	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:1 n-9	0,0	0,0	0,0	0,2
C18:4 n-3	0,6	0,4	0,3	0,6
C20:2 n-6	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:3 n-6	0,0	0,0	0,0	0,0
C22:0	1,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 n-7	0,0	0,2	0,2	0,0
C20:3 n-3	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 n-6	2,0	2,1	2,2	2,0
C22:1 n-9	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 n-5	0,0	0,1	0,1	0,0
C20:4 n-3	0,9	1,0	1,1	0,9
C20:5 n-3	29,8	30,3	28,2	34,8
C24:0	0,0	0,2	0,4	0,0
C22:4 n-9	0,0	0,0	0,0	0,0
C24:1 n-9	0,0	0,0	0,4	0,0
C22:5 n-6	0,9	1,0	1,1	0,9
C22:5 n-3	1,1	1,2	1,6	1,0
C22:6 n-3	38,3	35,5	35,1	38,4
Общий % FAME	100,0	100,0	100,0	100,0

РТА-10212 образец № 4.

РТА-10212 образец № 4 содержал приблизительно 23% липида, определенного как сумма FAME, из которого 107% было восстановлено с использованием экстракции гексаном. После фракционирования с использованием флэш-хроматографии приблизительно 42% сырого масла было выделено как TAG, 18% было выделено как DAG. Сырое масло содержало 275 мг/г DHA и 209 мг/г EPA. Изолированные TAG содержали 296 мг/г DHA и 205 мг/г EPA. Изолированная фракция DAG содержала 245 мг/г DHA и 219 мг/г EPA. Профили общих жирных кислот биомассы, экстрагированное сырое масло и выделенные фракции показаны ниже в табл. 10 (мг/г) и табл. 11 (% FAME).

Таблица 10. Профили жирных кислот биомассы РТА-10212 образец №4 и экстрагированный сырой липид (мг/г)

	Биомасса	Сырое масло	TAG	DAG
Вес. %	NA	24,7%	42,2%	18,4%
Жирная кислота	FAME (мг/г)	FAME (мг/г)	FAME (мг/г)	FAME (мг/г)
C12:0	0,0	0,0	2,1	2,4
C14:0	2,0	8,3	9,8	9,6
C14:1	0,0	0,0	0,0	0,0
C15:0	4,8	16,8	0,4	0,9
C16:0	63,3	210,6	285,7	138,0
C16:1	1,6	6,7	7,4	7,5
C18:0	2,8	12,2	19,9	4,6
C18:1 n-9	0,0	3,7	0,7	1,1
C18:1 n-7	0,0	0,0	0,3	1,2
C18:2 n-6	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:0	0,0	3,3	6,0	1,5
C18:3 n-3	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:1 n-9	0,0	0,0	0,7	1,2
C18:4 n-3	1,4	3,8	3,6	5,0
C20:2 n-6	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:3 n-6	0,0	0,0	0,4	0,0
C22:0	1,5	0,0	1,9	0,0
C20:4 n-7	0,0	0,0	0,9	0,6
C20:3 n-3	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 n-6	2,5	10,1	13,0	10,3
C22:1 n-9	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 n-5	0,0	0,0	0,8	0,7
C20:4 n-3	1,4	6,3	8,6	6,0
C20:5 n-3	57,6	209,1	205,4	219,0
C24:0	0,0	2,6	0,8	0,0
C22:4 n-9	0,1	0,0	0,0	0,0
C24:1 n-9	0,0	0,0	1,1	0,5
C22:5 n-6	1,4	6,1	7,9	4,5
C22:5 n-3	4,0	15,8	20,8	12,9
C22:6 n-3	87,7	275,0	296,4	244,8
Сумма FAME	232,2	790,1	894,8	672,4

Таблица 11. Профили жирных кислот биомассы РТА-10212 образца №4 и экстрагированный сырой липид (мг/г)

	Биомасса	Сырое масло	TAG	DAG
весовой %	NA	24,7%	42,2%	18,4%
Жирная кислота	FAME (мг/г)	FAME (мг/г)	FAME (мг/г)	FAME (мг/г)
C12:0	0,0	0,0	0,2	0,4
C14:0	0,9	1,0	1,1	1,4
C14:1	0,0	0,0	0,0	0,0
C15:0	2,1	2,1	0,0	0,1
C16:0	27,3	26,7	31,9	20,5
C16:1	0,7	0,8	0,8	1,1
C18:0	1,2	1,5	2,2	0,7
C18:1 n-9	0,0	0,5	0,1	0,2
C18:1 n-7	0,0	0,0	0,0	0,2
C18:2 n-6	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:0	0,0	0,4	0,7	0,2
C18:3 n-3	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:1 n-9	0,0	0,0	0,1	0,2
C18:4 n-3	0,6	0,5	0,4	0,7
C20:2 n-6	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:3 n-6	0,0	0,0	0,0	0,0
C22:0	0,6	0,0	0,2	0,0
C20:4 n-7	0,0	0,0	0,1	0,1
C20:3 n-3	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 n-6	1,1	1,3	1,5	1,5
C22:1 n-9	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 n-5	0,0	0,0	0,1	0,1
C20:4 n-3	0,6	0,8	1,0	0,9
C20:5 n-3	24,8	26,5	23,0	32,6
C24:0	0,0	0,3	0,1	0,0
C22:4 n-9	0,0	0,0	0,0	0,0
C24:1 n-9	0,0	0,0	0,1	0,1
C22:5 n-6	0,6	0,8	0,9	0,7
C22:5 n-3	1,7	2,0	2,3	1,9
C22:6 n-3	37,8	34,8	33,1	36,4
Всего % FAME	100,0	100,0	100,0	100,0

РТА-10212 образец № 5.

Образец сырого масла был извлечен из биомассы РТА-10212 с использованием FRIOLEX® процесса (GEA Westfalia Separator UK Ltd., Milton Keynes, Англия) с получением микробного масла РТА-10212 образец № 5. Отдельные классы липидов были выделены из РТА-10212 образец № 5 с использованием флэш-хроматографии низкого давления, и было определено весовое процентное содержание каждого класса. Жирнокислотный профиль каждого класса был определен с помощью GC-FID.

Коротко, образец получали путем растворения 240 мг сырого масла в 600 мкл гексана и помещением во вход колонки. После фракционирования образца с использованием флэш-хроматографии объединенный вес всех фракций составлял 240 мг, давая 100% восстановление. Фракция сложных стерольных эфиров составляла 0,9%, фракция TAG составляла 42,6%, фракция свободных жирных кислот (FFA) составляла 1,3%, стерольная фракция составляла 2,2%, DAG фракция составляла 41,6%. Профили общих жирных кислот FRIOLEX® сырого масла и выделенные фракции показаны ниже в табл. 12 и 13, вычисленные как мг/г и % FAME соответственно.

Таблица 12. Профили жирных кислот РТА-10212 образец № 5 сырое масло (мг/г)

	Сырое масло	TAG	DAG
Вес. %	NA	42,6%	41,6%
Жирная кислота	FAME (мг/г)	FAME (мг/г)	FAME (мг/г)
C12:0	0	0,7	1,0
C14:0	7,7	7,7	8,5
C14:1	0	0,0	0,0
C15:0	10,3	11,7	9,3
C16:0	179,3	217,7	134,6
C16:1	18,1	16,3	25,9
C18:0	8,1	13,2	2,3
C18:1 n-9	4,7	8,4	0,7
C18:1 n-7	0	1,8	1,0
C18:2 n-6	1,8	3,3	0,7
C20:0	1,9	3,6	0,2
C18:3 n-3	0	0,0	0,0
C20:1 n-9	0	0,7	1,0
C18:4 n-3	3,1	2,8	3,8
C20:2 n-6	0	0,0	0,0
C20:3 n-6	0	0,6	0,4
C22:0	0	1,5	0,0
C20:4 n-7	0	1,0	0,7
C20:3 n-3	0	0,0	0,0
C20:4 n-6	12,7	16,1	13,6
C22:1 n-9	0	0,0	0,0
C20:4 n-5	0	1,5	0,8
C20:4 n-3	6,5	9,3	6,4
C20:5 n-3	213,3	223,7	252,8
C24:0	2,3	4,4	0,6
C22:4 n-9	0	1,9	0,9
C24:1 n-9	0	0,0	0,0
C22:5 n-6	7,9	9,5	8,3
C22:5 n-3	13	20,6	9,7
C22:6 n-3	305,6	327,4	353,8
Сумма FAME	796,6	905,3	837,4

Таблица 13. Профили жирных кислот РТА-10212 образец № 5 сырое масло (%)

	Сырое масло	TAG	DAG
Жирная кислота	% FAME	% FAME	% FAME
C12:0	0	0,1	0,1
C14:0	1	0,9	1,0
C14:1	0	0,0	0,0
C15:0	1,3	1,3	1,1
C16:0	22,5	24,0	16,1
C16:1	2,3	1,8	3,1
C18:0	1	1,5	0,3
C18:1 n-9	0,6	0,9	0,1
C18:1 n-7	0	0,2	0,1
C18:2 n-6	0,2	0,4	0,1
C20:0	0,2	0,4	0,0
C18:3 n-3	0	0,0	0,0
C20:1 n-9	0	0,1	0,1
C18:4 n-3	0,4	0,3	0,5
C20:2 n-6	0	0,0	0,0
C20:3 n-6	0	0,1	0,0
C22:0	0	0,2	0,0
C20:4 n-7	0	0,1	0,1
C20:3 n-3	0	0,0	0,0
C20:4 n-6	1,6	1,8	1,6
C22:1 n-9	0	0,0	0,0

C20:4 n-5	0	0,2	0,1
C20:4 n-3	0,8	1,0	0,8
C20:5 n-3	26,8	24,7	30,2
C24:0	0,3	0,5	0,1
C22:4 n-9	0	0,2	0,1
C24:1 n-9	0	0,0	0,0
C22:5 n-6	1	1,1	1,0
C22:5 n-3	1,6	2,3	1,2
C22:6 n-3	38,4	36,2	42,3
Общий % FAME	100	100	100

Пример 4.

Относительное количество и состав жирных кислот каждого TAG изомера, присутствующего в экстрагированном сыром липиде, определяли для каждого из образцов РТА-10208 образец № 1, РТА-10208 образец №2, РТА-10212 образец № 1, РТА-10212 образец №2, и РТА-10212 образец №3, РТА-10212 образец №4, и РТА-10212 образец № 5 из примера 3, с использованием безводного обратно-фазового HPLC-отделения и APCI-MS обнаружения.

TAG метод - Прибор Agilent 1100 HPLC; Agilent 1100 MSD

Колонка(и) Две Phenomenex Luna C18 (2), 150 x 4,6 мм, частицы, размером 3 мкм, соединенные в серии

Подвижная фаза А - ацетонитрил

В - IPA вес./0,1% ацетат аммония

Градиент

Время, мин	% А	% В
0	80	20
120	20	80
125	20	80
126	80	20
140	80	20

Температура колонки 20°C

Скорость потока 0,5 мл/мин

Объем вводимой пробы 5 мкл

MSD Диапазон массы 350-1150,

Фрагментор 225 V

Температура сушильного газа 350°C

Температура испарителя 325°C

Капиллярное напряжение 3500 V

Ток короны 10 µA

РТА-10208 образец № 1.

Сырой липид, изолированный из РТА-10208 образец № 1, был подготовлен для TAG-анализа посредством отвешивания 5,5 мг масла в пробирку для HPLC и разбавления 1 мл гексана.

Таблица 14. Идентификация видов TAG в РТА-10208 образец № 1

Время удерживания	CN	Идентификация	Процент площади	[M + H] ⁺	[M + NH4] ⁺	Основные (DAG) фрагменты
41,76	30	EPA/EPA/EPA	1,2	945,8	962,7	643,5
42,97	30	EPA/EPA/DHA	5,4	971,7	988,8	643,4, 669,5
44,17	30	DHA/DHA/EPA	8,8	997,7	1014,7	669,5, 695,5
45,39	30	DHA/DHA/DHA	7,4	1023,7	1040,7	695,5
46,32	32	DHA/EPA/ARA	1,1	973,8	990,8	645,4, 671,5
47,53	32	DHA/DPA/EPA	2,0	999,8	1016,8	671,5, 697,5
48,88	32	DHA/EPA/ARA DHA/DHA/DPA	2,6	973,8 1025,7	990,7 1042,8	645,4, 671,5 697,5
50,23	32	DHA/DPA/EPA	1,8	999,8	1016,8	671,5, 697,4
51,47	32	DHA/DPA/DHA	1,5	1025,7	1042,8	695,5, 697,5
54,64	34	EPA/14:0/DHA	1,8	897,7	914,7	569,5, 595,5
55,80	34	DHA/DHA/14:0	2,2	923,6	940,8	595,5, 695,5
60,73	36	EPA/EPA/16:0	3,4	899,7	916,8	597,5, 643,3
61,87	36	DHA/16:0/EPA	11,8	925,8	942,7	597,5, 623,5, 669,5
63,0	36	DHA/16:0/DHA	17,7	951,8	968,8	623,5, 695,5
65,47	38	EPA/EPA/18:0	2,3	927,7	944,8	625,5
66,58	38	DHA/DPA/16:0	2,9	953,8	970,8	623,5, 625,5, 697,6
67,31	38	EPA/ARA/16:0	1,0	901,7	918,8	597,6, 599,5, 645,4
68,39	38	DHA/16:0/ARA	2,0	927,7	944,8	625,6
69,52	38	DHA/16:0/DPA	2,3	953,8	970,8	623,5, 625,5
70,16	38	DHA/DHA/18:0	0,9	979,5	996,7	651,5
73,81	40	EPA/16:0/14:0	1,0	825,7	842,7	523,5, 569,5, 597,5
74,73	40	DHA/14:0/16:0	1,5	851,7	868,7	523,4, 623,5
80,96	42	EPA/16:0/16:0	1,8	853,6	870,8	551,5, 597,4
81,93	42	DHA/16:0/16:0	6,5	879,8	896,8	551,5, 623,5
85,50	44	DPA/16:0/16:0	0,9	881,7	898,8	551,4, 625,4
88,92	44	18:0/16:0/DHA	0,9	907,9	924,8	579,4, 651,5

РТА-10208 образец № 2.

Сырой липид, изолированный из РТА-10208 образец № 2, был подготовлен для TAG-анализа посредством отвешивания 5,3 мг масла в пробирку для HPLC и разбавления 1 мл гексана.

Таблица 15. Идентификация видов TAG в РТА-10208 образец № 2

Время удерживания	CN	Идентификация	Процент площади	[M + H] ⁺	[M + NH ₄] ⁺	Основные (DAG) фрагменты
41,70	30	EPA/EPA/EPA	1,0	945,7	962,8	643,5
42,92	30	EPA/EPA/DHA	4,3	971,7	988,8	643,5, 669,5
44,11	30	DHA/DHA/EPA	6,9	997,8	1014,8	669,5, 695,5
45,33	30	DHA/DHA/DHA	6,2	1023,8	1040,8	695,5
46,26	32	DHA/EPA/ARA	0,5	973,7	990,7	645,4, 671,5
47,47	32	DHA/DPA/EPA	1,1	999,8	1016,8	671,5, 697,5
48,86	32	DHA/EPA/ARA DHA/DHA/DPA	1,9	973,7 1025,7	990,8 1042,8	645,5, 671,5 697,5
50,16	32	DHA/DPA/EPA	1,5	999,6	1016,9	671,5, 697,4
51,37	32	DHA/DPA/DHA	1,1	1025,7	1042,8	695,5, 697,5
54,57	34	EPA/14:0/DHA	2,0	897,7	914,7	569,5, 595,4
55,78	34	DHA/DHA/14:0	2,9	923,6	940,8	595,5, 695,5
60,74	36	EPA/EPA/16:0	3,1	899,6	916,8	597,5, 643,5
61,94	36	DHA/16:0/EPA	13,00	925,7	942,8	597,5, 623,5, 669,5
63,10	36	DHA/16:0/DHA	20,0	951,8	968,8	623,5, 695,5
65,60	38	EPA/EPA/18:0	1,6	927,7	944,8	625,5
66,71	38	DHA/DPA/16:0	2,0	953,7	970,8	623,6, 625,4, 697,6
67,46	38	DHA/14:0/14:0 EPA/ARA/16:0	1,3	823,5 901,8	840,7 918,8	495,4, 595,5 597,6, 599,5, 645,4
68,60	38	DHA/16:0/ARA	2,0	927,8	944,8	599,5, 623,5, 671,5
69,69	38	DHA/16:0/DPA	2,7	953,7	970,8	623,5, 625,5
70,39	38	DHA/DHA/18:0	0,7	979,8	996,8	651,5
73,88	40	EPA/16:0/14:0	1,1	825,7	842,8	523,5, 569,3, 597,3
74,94	40	DHA/14:0/16:0	2,9	851,8	868,7	523,5, 623,5
81,17	42	EPA/16:0/16:0	1,9	853,8	870,8	551,5, 597,6
82,16	42	DHA/16:0/16:0	9,7	879,7	896,7	551,5, 623,5
85,72	44	DPA/16:0/16:0	0,6	881,7	898,8	551,4, 625,5
89,15	44	18:0/16:0/DHA	1,2	907,7	924,8	579,4, 651,5

РТА-10212 образец № 1.

Сырой липид, изолированный из РТА-10212 образец № 1, был подготовлен для TAG-анализа посредством отвешивания 5,3 мг масла в пробирку для HPLC и разбавления 1 мл гексана.

Таблица 16. Идентификация видов TAG в РТА-10212 образец № 1

Время удерживания	CN	Идентификация	Процент площади	[M + H] ⁺	[M + NH4] ⁺	(DAG) фрагменты
43,01	30	EPA/EPA/DHA	1,2	971,7	988,7	643,5, 669,5
44,24	30	DHA/DHA/EPA	2,6	997,7	1014,8	669,5, 695,4
45,41	30	DHA/DHA/DHA	2,4	1023,8	1040,8	695,5
54,78	34	DHA/EPA/14:0	0,7	897,7	914,8	569,3, 595,4
		DHA/DHA/16:1		949,7	966,7	621,3, 695,3
59,53	35	DHA/15:0/DHA	0,9	937,8	954,8	609,6, 695,5
60,88	36	EPA/16:0/EPA	1,5	899,7	916,7	597,5, 643,2
62,03	36	EPA/16:0/DHA	8,3	925,8	942,7	597,6, 623,4
63,17	36	DHA/16:0/DHA	13,1	951,7	968,8	623,5, 695,5
66,82	38	DHA/18:0/EPA	1,5	953,7	970,8	625,6
68,63	38	DHA/ARA/16:0	0,7	927,7	944,7	599,5, 623,3, 671,5
69,79	38	DHA/DPA/16:0	0,7	953,8	970,8	623,5, 625,5
70,41	38	DHA/DHA/18:0	0,7	979,7	996,7	651,5, 695,3
72,79	40	EPA/16:0/16:1	0,5	851,7	868,6	549,4
73,82	40	DHA/18:1/14:0	1,8	877,7	894,7	549,5, 621,5, 623,3
75,00	40	DHA/16:0/14:0	1,7	851,8	868,8	523,5, 623,5
77,55	41	EPA/15:0/16:0	0,8	839,7	856,7	537,5, 583,4
78,59	41	DHA/16:0/15:0	2,5	865,6	882,8	537,3, 623,5
81,32	42	EPA/16:0/16:0	5,5	853,7	870,7	551,5, 597,5
82,19	42	DHA/16:0/16:0	21,7	879,8	896,7	551,5, 623,5
85,74	43	DHA/17:0/16:0	2,0	ND	910,7	565,5, 623,5, 637,7
88,23	44	DPA/16:0/16:0	0,8	881,7	898,8	551,7, 625,5
89,19	44	DHA/16:0/18:0	3,2	907,9	924,8	579,5, 623,3, 651,5
93,18	46	16:0/16:0/16:1	1,2	ND	822,8	549,5, 551,6
94,57	46	16:0/16:0/14:0	1,1	779,7	796,7	523,4, 551,3
95,91	46	DHA/12:0/24:0	0,7	935,9	952,8	567,5, 607,6
97,88	47	16:0/16:0/15:0	1,4	ND	810,7	537,5, 551,4
101,14	48	16:0/16:0/16:0	7,5	807,6	824,7	551,5
104,26	49	16:0/16:0/17:0	0,7	ND	838,7	551,4, 565,5
107,35	50	16:0/16:0/18:0	1,7	ND	852,8	551,5, 579,5
108,58	50	DHA/16:0/24:0	0,7	991,8	1008,9	623,5, 663,7, 735,5
113,28	52	16:0/16:0/20:0	0,6	ND	880,9	551,5, 607,4
124,24	56	16:0/16:0/24:0	0,6	ND	936,8	551,5, 663,5

ND= не обнаружено

РТА-10212 образец № 2.

Сырой липид, изолированный из РТА-10212 образец №2, был подготовлен для TAG-анализа посредством отвешивания 3,6 мг масла в пробирку для HPLC и разбавления 1 мл гексана.

Таблица 17. Идентификация видов TAG в РТА-10212 образец № 2

Время удерживания	CN	Идентификация	Процент площади	[M + H] ⁺	[M + NH ₄] ⁺	(DAG) фрагменты
42,99	30	EPA/EPA/DHA	1,4	971,7	988,7	643,4, 669,5
44,22	30	DHA/DHA/EPA	3,3	997,8	1014,7	669,5, 695,5
45,4	30	DHA/DHA/DHA	2,4	1023,7	1040,8	695,5
54,80	34	DHA/EPA/14:0 DHA/DHA/16:1	0,6	897,7 ND	914,7 966,7	569,5 621,3
59,49	35	DHA/15:0/DHA	0,5	ND	954,8	609,6
60,83	36	EPA/16:0/EPA	1,6	899,7	916,6	597,5, 643,3
62,02	36	EPA/16:0/DHA	9,9	925,8	942,7	597,5, 623,5
63,16	36	DHA/16:0/DHA	13,0	951,8	968,8	623,6, 695,5
66,8	38	DHA/18:0/EPA	0,7	953,7	970,6	625,5
68,65	38	DHA/ARA/16:0	0,4	ND	944,8	599,6, 623,4
69,76	38	DHA/DPA/16:0	0,4	953,6	970,8	623,5
70,44	38	DHA/DHA/18:0	0,3	979,8	996,7	ND
72,74	40	EPA/16:0/16:1	0,4	ND	868,6	549,5
73,77	40	DHA/18:1/14:0	1,6	877,6	894,8	549,5, 621,9
74,97	40	DHA/16:0/14:0	1,4	851,8	868,7	523,5, 623,7
77,73	41	EPA/15:0/16:0	0,3	ND	856,7	537,5
78,53	41	DHA/16:0/15:0	2,2	865,8	882,7	537,5
81,32	42	EPA/16:0/16:0	6,3	853,8	870,8	551,4, 597,5
82,15	42	DHA/16:0/16:0	22,8	879,7	896,7	551,5, 623,5
85,67	43	DHA/17:0/16:0	1,6	ND	910,8	565,5
89,08	44	DPA/16:0/16:0 DHA/16:0/18:0	2,6	ND 907,8	898,8 924,8	551,5 579,5
93,09	46	16:0/16:0/16:1	0,9	ND	822,8	549,6, 551,3
94,47	46	16:0/16:0/14:0	1,1	ND	796,7	523,5, 551,5
95,78	46	DHA/12:0/24:0	0,5	ND	952,8	607,5
97,8	47	16:0/16:0/15:0	1,6	ND	810,7	537,3, 551,5
100,99	48	16:0/16:0/16:0	9,5	ND	824,7	551,4
104,11	49	16:0/16:0/17:0	0,6	ND	838,7	551,7, 565,5
107,23	50	16:0/16:0/18:0	2,1	ND	852,8	551,3, 579,5
108,45	50	DHA/16:0/24:0	0,7	ND	1009,0	663,5
113,11	52	16:0/16:0/20:0	0,5	ND	880,9	551,3, 607,7
124,07	56	16:0/16:0/24:0	0,8	ND	937,0	551,5, 663,5

ND= не обнаружено

РТА-10212 образец № 3.

Образец TAG фракции РТА-10212 образец № 3 приготовлен в гексане и исследован с помощью HPLC/APCI/MS для установления идентичности отдельных TAG изомеров.

Таблица 18. Идентификация видов TAG в РТА-10212 образец № 3

Время удерживания	Пик №	Идентификация	Процент площади	[M + H] ⁺	[M + NH ₄] ⁺	(DAG) фрагменты
20,016	1	EPA/EPA/EPA	3,7	945,5	962,7	643,5
20,471	2	EPA/EPA/DHA	8,6	971,6	988,7	643,5, 669,5
20,970	3	DHA/DHA/EPA	6,5	997,7	1014,7	695,5, 669,5
21,441	4	DHA/DHA/DHA	3,7	1023,7	1040,7	695,5
21,855	5	EPA/EPA/DPA	0,7	973,7	990,7	645,3, 671,3
22,107	6	DHA/EPA/DPA EPA/ EPA /ARA	1,9	999,5 947,5	1016,7 964,6	697,5, 671,4 643,3, 645,3
22,573	7	EPA/ARA/DHA	2,2	973,7	990,7	671,5, 645,5
23,057	8	DHA/EPA/DPA	1,4	999,6	1016,7	696,5, 671,4
23,548	9	DHA/DHA/DPA DHA/14:0/EPA	0,8	1025,7 897,7	1042,7 914,7	695,5, 697,5 569,4, 595,3
24,034	10	DHA/16:1/EPA	1,2	923,5	940,7	595,5, 621,3
24,306	11	EPA/16:1/EPA	0,7	897,6	914,7	595,3
24,509	12	DHA/16:1/DHA	0,8	949,6	966,7	621,3
24,783	13	DHA/14:0/DHA	0,5	923,7	940,8	595,5
25,571	14	EPA/15:0 /DHA	1,0	911,7	928,7	583,4, 609,4
26,026	15	DHA/15:0/DHA	0,7	937,7	954,7	609,3
26,376	16	EPA/16:0/EPA	7,2	899,7	916,7	597,5
26,832	17	EPA/16:0/DHA	14,3	925,7	942,7	597,3, 623,4
27,272	18	DHA/16:0/DHA	13,2	951,7	968,7	623,5
27,842	19	DPA/14:0/ARA	0,5	901,6	918,7	599,4, 623,4
28,048	20	EPA/18:0/EPA	1,0	927,6	944,7	623,4
28,271	21	DHA/16:0/ARA	1,0	927,7	944,7	599,5, 623,5
28,564	22	DPA/16:1/DPA ARA/16:1/ARA	2,3	953,7 901,8	970,6 918,6	623,5 597,4
29,060	23	DHA/16:0/ARA	2,6	927,7	944,7	599,3, 625,5
29,381	24	DHA/18:0/EPA	0,8	953,8	970,3	625,4, 651,5
29,512	25	DHA/16:0/DPA	1,0	953,8	970,8	623,4, 625,4
30,654	26	DHA/16:0/16:1	1,4	877,8	894,7	549,5, 623,5
31,015	27	DHA/16:0/14:0	0,6	851,7	868,7	523,3, 623,7
32,216	28	DHA/16:0/15:0	0,8	865,8	882,7	537,5, 623,3
33,063	29	EPA/16:0/16:0	4,1	853,5	870,7	551,5, 597,5
33,438	30	DHA/16:0/16:0	9,7	879,7	896,7	551,5, 623,5
35,518	31	DPA/16:0/16:0	0,9	881,7	898,7	551,5, ND
35,798	32	DHA/18:0/16:0	1,3	907,8	924,7	579,4, 651,3
39,578	33	16:0/16:0/16:0	1,3	ND	824,8	551,5

ND= не обнаружено

РТА-10212 образец № 4.

Образец TAG фракции РТА-10212 образец № 4 был приготовлен в гексане и исследован с помощью HPLC/APCI/MS для установления идентичности отдельных TAG изомеров.

Таблица 19. Идентификация видов TAG в РТА-10212 образец № 4

Время удерживания	Пик №	Идентификация	Процент площади	[M + H] ⁺	[M + NH ₄] ⁺	(DAG) фрагменты
20,1	1	EPA/ EPA / EPA	2,3	945,5	962,7	643,5
20,6	2	EPA/ EPA/DHA	4,4	971,6	988,7	643,5,669,5
21,1	3	DHA/DHA/EPA	4,7	997,7	1014,7	695,5, 669,5
21,6	4	DHA/DHA/DHA EPA/EPA/DPA	4,1	1023,7 973,7	1040,7 990,7	695,5 645,3, 671,3
22,0	5	EPA/EPA/DPA	0,2	973,7	990,7	645,3, 671,3
22,3	6	DHA/EPA/DPA EPA/ EPA /ARA	1,4	999,5 947,5	1016,7 964,6	697,5, 671,4 645,3
22,7	7	EPA/ARA/DHA	1,1	973,7	990,7	671,5, 645,5
23,2	8	DHA/EPA/DPA	0,5	999,6	1016,7	696,5, 671,4
23,7	9	DHA/DPA/DHA	0,2	1025,8	1043,8	697,7
24,6	10	DHA/16:1/ DHA	0,3	949,6	966,7	621,3
24,9	11	DHA/14:0/EPA	0,4	923,5	940,7	595,4
25,3	12	EPA/15:0/EPA	0,4	885,5	902,5	583,5
25,7	13	EPA/15:0/DHA	1,0	911,7	928,7	583,4, 609,4
26,2	14	DHA/15:0/DHA	0,6	937,7	954,7	609,3
26,6	15	EPA/16:0/EPA	4,9	899,7	916,7	597,5
27,0	16	EPA/16:0/DHA	12,8	925,7	942,7	597,3, 623,4
27,5	17	DHA/16:0/DHA	15,2	951,7	968,7	623,5
28,3	18	EPA/18:0/EPA	2,0	927,6	944,7	623,4
28,7	19	DPA/16:1/DPA ARA/16:1/ARA	2,3	953,7 901,8	970,6 918,6	623,5 597,4
29,3	20	DHA/16:0/ARA	1,4	927,7	944,7	599,3, 623,4
29,6	21	DHA/16:0/DPA	1,5	953,8	970,3	625,4, 651,5
30,0	22	DHA/18:0/DHA	0,7	979,7	996,7	651,5
30,9	23	DHA/16:0/16:1 EPA/16:0/16:1	0,7	877,8 825,6	894,7 842,6	549,5, ND 549,5, ND
31,3	24	DHA/14:0/16:0	0,6	851,7	868,7	523,3, 595,3
32,5	25	DHA/16:0/15:0	1,5	865,8	882,7	537,5, 623,4
33,4	26	EPA/16:0/16:0	4,4	853,5	870,7	551,5, 597,5
33,8	27	DHA/16:0/16:0	14,5	879,7	896,7	551,5, 623,5
35,0	28	DPA/16:0/16:0 DHA/15:0/18:0	2,3	881,6 893,8	898,7 910,7	551,5, 625,5 565,5, ND
35,8	29	DPA/16:0/16:0	1,3	881,7	898,7	551,5, ND
36,2	30	DPA/16:0/16:0 DHA/16:0/18:0	2,6	881,7 907,8	898,7 924,7	551,5, 625,5 579,4, 623,5
40,0	31	16:0/16:0/16:0	3,4	ND	824,8	551,5
42,2	32	16:0/16:0/18:0	0,7	ND	852,8	551,3, 579,5
43,0	33	DHA/16:0/24:0	0,9	991,7	1008,8	623,3, 663,5

ND= не определено

РТА-10212 образец № 5.

Образец TAG-фракции РТА-10212 образец №5 был приготовлен в гексане и исследован с помощью HPLC/APCI/MS для установления идентичности отдельных TAG изомеров.

Таблица 20. Идентификация видов TAG в РТА-10212 образец № 5

Время удерживания	Пик №	Идентификация	Процент площади	[M + H] ⁺	[M + NH4] ⁺	(DAG) фрагменты
21,0	1	EPA/EPA/EPA	1,7	945,7	962,8	643,5
21,5	2	EPA/EPA/DHA	5,5	971,6	988,7	643,5, 669,5
22,0	3	DHA/DHA/EPA	7,6	997,7	1014,7	695,5, 669,5
22,5	4	DHA/DHA/DHA	4,5	1023,8	1040,7	695,5
23,0	5	EPA/EPA/DPA	0,5	973,8	990,8	645,5, 671,5
23,3	6	DHA/EPA/DPA EPA/ EPA /ARA	1,5	999,7 947,6	1016,7 964,8	697,5, 671,5 645,5
23,7	7	EPA/ARA/DHA DHA/DPA/DHA	1,9	973,6 1025,7	990,7 1042,7	671,5, 645,4 695,5, 697,5
24,2	8	DHA/EPA/DPA	1,1	999,7	1016,7	669,5, 671,4, 696,5
24,8	9	DHA/DHA/DPA DHA/14:0/EPA	0,6	1025,7 897,7	1042,9 914,7	695,5, 697,5 595,5
25,3	10	DHA/16:1/EPA	0,7	923,8	940,8	595,5, 621,3
25,6	11	DHA/14:0/EPA	0,6	897,7	914,7	569,3, 595,4
25,8	12	DHA/16:1/ DHA	0,5	949,7	966,7	621,3, 695,5
26,0	13	DHA/16:1/EPA	0,4	923,7	940,8	595,5, 621,3
26,9	14	EPA/15:0/DHA	0,7	911,7	928,7	583,5, 609,3
27,4	15	DHA/15:0/DHA	0,7	937,6	954,8	609,3
27,8	16	EPA/16:0/EPA	4,9	899,7	916,7	597,5
28,2	17	EPA/16:0/DHA	14,3	925,7	942,8	597,5, 623,5
28,7	18	DHA/16:0/DHA	12,2	951,7	968,8	623,5
29,3	19	DPA/14:0/ARA	0,6	901,7	918,8	597,3
29,5	20	EPA/18:0/EPA	1,5	927,7	944,8	625,5
30,0	21	DHA/16:0/ARA	3,4	953,7	970,8	623,4
30,6	22	EPA/EPA/18:0	2,1	927,7	944,7	599,5, 625,5, 669,3
31,0	23	DHA/18:0/EPA	1,7	953,8	970,8	625,4, 651,5
31,3	24	DHA/18:0/DHA	0,9	979,7	996,8	651,5, 695,3
31,9	26	16:0/DHA/14:0	0,8	851,7	868,7	595,5, 623,5
32,3	27	18:1/14:0/DHA	1,7	877,7	894,7	549,5, 595,5
32,6	28	DHA/16:0/14:0	0,9	851,8	868,7	523,4, 623,5
33,5	29	EPA/15:0/16:0	0,7	839,7	856,7	537,5, 583,3
		DHA/20:0/EPA		981,7	998,8	653,5, 679,6
33,9	30	DHA/16:0/15:0	1,2	865,7	882,7	537,5, 623,5
34,8	31	EPA/16:0/16:0	3,9	853,8	870,7	551,5, 597,5
35,2	32	DHA/16:0/16:0	10,6	879,7	896,7	551,5, 623,5
36,4	33	DPA/16:0/16:0	1,5	881,7	898,7	551,5, 625,5
37,4	33	DPA/16:0/16:0	1,2	881,7	898,7	551,5, 625,5
37,7	34	DHA/16:0/18:0	1,9	907,7	924,7	579,4
38,4	35	EPA/24:0/DHA	0,5	1037,8	1054,8	709,5, 735,6
38,8	36	DHA/24:0/DHA	1,0	1064,8	1081,8	735,7

Пример 5.

Сырые масла были дополнительно обработаны путем очистки, осветления и дезодорирования для получения рафинированных масел. Рафинированные масла были разбавлены подсолнечным маслом с высоким содержанием олеиновой кислоты для получения конечных масел с содержанием DHA приблизительно 400 мг/г. Были выделены отдельные классы липидов и определены жирнокислотные профили каждого класса с использованием GC-FID в виде FAME.

Конечные масла РТА-10208

Жирнокислотные профили конечных масел РТА-10208 № 1-5 суммированы в табл. 21-22, включая профили, связанные с выделенной фракцией TAG (табл. 23-24) и выделенной фракцией стеролов/DAG (табл. 24-26).

Отдельные классы липидов в конечных маслах также были определены с использованием флэш-хроматографии (табл. 27) и нормальной HPLC вместе с ELSD и APCI-MS-подтверждением (табл. 28).

Таблица 21. Жирнокислотные профили РТА-10208 конечных масел (мг/г)

	РТА-10208 Конечное масло № 1	РТА-10208 Конечное масло № 2	РТА-10208 Конечное масло № 3	РТА- 10208 Конечное масло № 4	РТА- 10208 Конечное масло № 5
Жирная кислота	FAME (мг/г)	FAME (мг/г)	FAME (мг/г)	FAME (мг/г)	FAME (мг/г)
C12:0	2,5	2,4	2,8	2,7	2,7
C14:0	16,1	14,9	21,0	18,4	17,5
C14:1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C15:0	3,8	3,6	4,4	3,9	3,9
C16:0	192,1	179,1	193,1	184,3	194,6
C16:1	0,4	0,5	0,5	0,5	0,5
C17:0	0,6	0,5	0,9	0,8	2,1
C18:0	12,8	13,9	11,5	12,3	12,9
C18:1 n-9	23,5	82,0	25,7	26,0	29,5
C18:1 n-7	0,2	0,7	0,1	0,1	0,1
C18:2 n-6	3,7	8,1	4,0	4,1	4,3
C20:0	4,3	4,1	3,7	4,0	4,0
C18:3 n-3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:1 n-9	<0,1	0,1	<0,1	<0,1	<0,1
C18:4 n-3	2,4	2,5	2,8	2,7	2,8
C20:2 n-6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:3 n-6	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1
C22:0	1,2	1,8	1,0	1,1	1,1
C20:4 n-7	1,7	1,6	1,7	1,8	1,6
C20:3 n-3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 n-6	12,9	12,1	13,5	13,5	13,3
C22:1 n-9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 n-5	1,6	1,4	1,5	1,7	1,5
C20:4 n-3	6,0	5,7	6,0	6,0	6,1
C20:5 n-3	173,8	163,3	196,4	209,6	197,9
C24:0	1,4	1,6	1,3	1,3	1,0
C22:4 n-9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C24:1 n-9	3,4	3,2	2,3	2,6	2,3
C22:5 n-6	14,9	14,0	14,4	13,0	12,9
C22:5 n-3	43,9	41,3	32,8	40,3	36,9
C22:6 n-3	394,8	373,7	373,2	374,3	364,2
Сумма FAME	918,1	932,2	914,7	925,1	914,1

Таблица 22. Жирнокислотные профили РТА-10208 конечных масел (%)

	РТА-10208 Конечное масло № 1	РТА-10208 Конечное масло № 2	РТА-10208 Конечное масло № 3	РТА-10208 Конечное масло № 4	РТА-10208 Конечное масло № 5
Жирная кислота	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME
C12:0	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
C14:0	1,8	1,6	2,3	2,0	1,9
C14:1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C15:0	0,4	0,4	0,5	0,4	0,4
C16:0	20,9	19,2	21,1	19,9	21,3
C16:1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	0,1
C17:0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2
C18:0	1,4	1,5	1,3	1,3	1,4
C18:1 n-9	2,6	8,8	2,8	2,8	3,2
C18:1 n-7	<0,1	0,1	<0,1	<0,1	<0,1
C18:2 n-6	0,4	0,9	0,4	0,4	0,5
C20:0	0,5	0,4	0,4	0,4	0,4
C18:3 n-3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:1 n-9	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
C18:4 n-3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
C20:2 n-6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:3 n-6	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
C22:0	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1
C20:4 n-7	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
C20:3 n-3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 n-6	1,4	1,3	1,5	1,5	1,5
C22:1 n-9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 \n-5	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
C20:4 \n-3	0,7	0,6	0,7	0,7	0,7
C20:5 n-3	18,9	17,5	21,5	22,7	21,6
C24:0	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1
C22:4 n-9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C24:1 n-9	0,4	0,3	0,2	0,3	0,2
C22:5 n-6	1,6	1,5	1,6	1,4	1,4
C22:5 n-3	4,8	4,4	3,6	4,4	4,0
C22:6 n-3	43,0	40,1	40,8	40,5	39,9

Таблица 23. Профили жирных кислот выделенных TAG: РТА-10208 конечные масла (мг/г)

	РТА-10208 Конечное масло № 1	РТА-10208 Конечное масло № 2	РТА-10208 Конечное масло № 3	РТА-10208 Конечное масло № 4	РТА-10208 Конечное масло № 5
Жирная кислота	FAME (мг/г)	FAME (мг/г)	FAME (мг/г)	FAME (мг/г)	FAME (мг/г)
C12:0	2,5	2,3	2,7	2,5	2,6
C14:0	16,3	15,1	21,3	18,6	18,1
C14:1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C15:0	3,9	3,6	4,4	4,0	4,0
C16:0	194,2	181,9	196,1	186,1	199,8
C16:1	0,4	0,4	0,6	0,5	0,7
C17:0	0,6	0,5	0,9	0,8	0,8
C18:0	12,9	14,2	11,7	12,5	13,2
C18:1 n-9	24,3	84,0	26,8	26,1	34,0
C18:1 n-7	0,1	0,7	0,1	0,1	0,3
C18:2 n-6	3,2	7,7	3,4	3,5	4,0
C20:0	4,4	4,2	3,8	4,0	4,2
C18:3 n-3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:1 n-9	<0,1	0,2	<0,1	<0,1	0,1
C18:4 n-3	2,5	2,4	2,8	2,6	2,7
C20:2 n-6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:3 n-6	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1
C22:0	1,2	1,9	1,0	1,1	1,1
C20:4 n-7	1,7	1,6	1,8	1,8	1,7
C20:3 n-3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 n-6	13,2	12,3	13,8	13,7	13,8
C22:1 n-9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 n-5	1,6	1,5	1,6	1,7	1,5
C20:4 n-3	6,1	5,7	6,1	5,9	6,2
C20:5 n-3	176,0	166,1	199,0	211,2	204,2
C24:0	1,2	1,3	1,0	1,1	1,2
C22:4 n-9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C24:1 n-9	3,3	3,2	2,2	2,5	2,4
C22:5 n-6	15,0	14,2	14,7	13,2	13,5
C22:5 n-3	44,4	42,0	33,3	40,5	38,3
C22:6 n-3	397,9	378,4	376,4	375,5	375,5
Сумма FAME	926,9	945,7	925,5	929,6	944,1

Таблица 24. Профили жирных кислот выделенных TAG: РТА-10208 конечные масла (%)

	РТА-10208 Конечное масло № 1	РТА-10208 Конечное масло № 2	РТА-10208 Конечное масло № 3	РТА-10208 Конечное масло № 4	РТА-10208 Конечное масло № 5
Жирная кислота	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME
C12:0	0,3	0,2	0,3	0,3	0,3
C14:0	1,8	1,6	0,3	0,3	0,3
C14:1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C15:0	0,4	0,4	0,5	0,4	0,4
C16:0	20,9	19,2	21,2	20,0	21,2
C16:1	<0,1	<0,1	0,1	0,1	0,1
C17:0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
C18:0	1,4	1,5	1,3	1,3	1,4
C18:1 n-9	2,6	8,9	2,9	2,8	3,6
C18:1 n-7	<0,1	0,1	<0,1	<0,1	<0,1
C18:2 n-6	0,3	0,8	0,4	0,4	0,4
C20:0	0,5	0,4	0,4	0,4	0,4
C18:3 n-3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:1 n-9	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
C18:4 n-3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
C20:2 n-6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:3 n-6	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
C22:0	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1
C20:4 n-7	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
C20:3 n-3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 n-6	1,4	1,3	1,5	1,5	1,5
C22:1 n-9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 n-5	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
C20:4 n-3	0,7	0,6	0,7	0,6	0,7
C20:5 n-3	19,0	17,6	21,5	22,7	21,6
C24:0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
C22:4 n-9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C24:1 n-9	0,4	0,3	0,2	0,3	0,3
C22:5 n-6	1,6	1,5	1,6	1,4	1,4
C22:5 n-3	4,8	4,4	3,6	4,4	4,1
C22:6 n-3	42,9	40,0	40,7	40,4	39,8

Таблица 25. Жирнокислотные профили выделенных стеролов/DAG: РТА-10208
конечные масла (мг/г)

	РТА-10208 Конечное масло № 1	РТА-10208 Конечное масло № 2	РТА-10208 Конечное масло № 3	РТА-10208 Конечное масло № 4	РТА-10208 Конечное масло № 5
Жирная кислота	FAME (мг/г)	FAME (мг/г)	FAME (мг/г)	FAME (мг/г)	FAME (мг/г)
C12:0	1,9	2,1	2,9	2,1	1,9
C14:0	9,9	9,5	9,7	10,3	8,0
C14:1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C15:0	2,4	2,3	2,2	2,3	2,0
C16:0	132,6	128,6	110,1	116,8	106,4
C16:1	0,2	0,3	<0,1	0,3	0,4
C17:0	0,3	0,2	0,3	0,3	0,3
C18:0	7,3	8,1	6,4	6,8	6,1
C18:1 n-9	15,0	55,1	47,4	19,0	30,1
C18:1 n-7	0,4	0,7	0,1	<0,1	0,2
C18:2 n-6	13,1	16,7	21,6	13,5	18,4
C20:0	2,0	2,1	1,2	1,8	1,4
C18:3 n-3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:1 n-9	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
C18:4 n-3	2,3	2,4	2,4	2,4	2,0
C20:2 n-6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:3 n-6	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
C22:0	0,6	1,0	0,5	0,6	0,5
C20:4 n-7	0,8	0,9	2,1	0,9	0,7
C20:3 n-3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 n-6	5,7	5,8	4,8	6,1	4,5
C22:1 n-9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 n-5	<0,1	<0,1	<0,1	0,6	<0,1
C20:4 n-3	2,7	2,7	2,1	2,7	2,0
C20:5 n-3	92,9	94,5	91,9	111,6	84,8
C24:0	1,2	1,3	1,1	1,1	1,3
C22:4 n-9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C24:1 n-9	1,9	2,0	1,2	1,5	1,2
C22:5 n-6	7,8	8,0	6,7	7,0	5,5
C22:5 n-3	22,2	22,9	13,9	20,7	14,2
C22:6 n-3	246,3	252,7	223,5	240,3	196,3
Сумма FAME	569,3	619,8	552,1	568,7	488,2

Таблица 26. Выделенные стеролы /DAG жирнокислотные профили: РТА-10208 конечные масла (%)

	РТА-10208 Конечное масло № 1	РТА-10208 Конечное масло № 2	РТА-10208 Конечное масло № 3	РТА-10208 Конечное масло № 4	РТА-10208 Конечное масло № 5
Жирная кислота	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME
C12:0	0,3	0,3	0,5	0,4	0,4
C14:0	1,7	1,5	1,8	1,8	1,6
C14:1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C15:0	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
C16:0	23,3	20,8	19,9	20,5	21,8
C16:1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	0,1
C17:0	0,0	0,0	0,1	0,1	0,1
C18:0	1,3	1,3	1,2	1,2	1,2
C18:1 n-9	2,6	8,9	8,6	3,3	6,2
C18:1 n-7	0,1	0,1	<0,1	<0,1	<0,1
C18:2 n-6	2,3	2,7	3,9	2,4	3,8
C20:0	0,4	0,3	0,2	0,3	0,3
C18:3 n-3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:1 n-9	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
C18:4 n-3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
C20:2 n-6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:3 n-6	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
C22:0	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1
C20:4 n-7	0,1	0,1	0,4	0,2	0,1
C20:3 n-3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 n-6	1,0	0,9	0,9	1,1	0,9
C22:1 n-9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C20:4 n-5	<0,1	<0,1	<0,1	0,1	<0,1
C20:4 n-3	0,5	0,4	0,4	0,5	0,4
C20:5 n-3	16,3	15,2	16,6	19,6	17,4
C24:0	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3
C22:4 n-9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C24:1 n-9	0,3	0,3	0,2	0,3	0,2
C22:5 n-6	1,4	1,3	1,2	1,2	1,1
C22:5 n-3	3,9	3,7	2,5	3,6	2,9
C22:6 n-3	43,3	40,8	40,5	42,3	40,2

Таблица 27. Отделение классов липидов помощью флэш-хроматографии (вес.%)

Отделение классов липидов	РТА-10208 Конечное масло № 1	РТА-10208 Конечное масло № 2	РТА-10208 Конечное масло № 3	РТА-10208 Конечное масло № 4	РТА-10208 Конечное масло № 5
TAG	93,4	95,4	94,0	95,7	95,1
Стероиды/DAG	3,1	2,9	2,6	3,0	2,9
Восстановление (%)	96,5	98,3	96,6	98,7	98,0

Таблица 28. Разделение классов липидов с помощью HPLC-ELSD (вес.%)

	Сложные стероловые эфиры	TA G	FFA	Стеро лы	1,3- DAG	1,2- DAG	MAG	Всего
РТА-10208 Конечное масло № 1	0,4	90,8	ND	0,8	0,5	0,5	N.D.	93,0
РТА-10208 Конечное масло № 2	0,4	88,5	ND	0,6	0,6	0,6	N.D.	90,7
РТА-10208 Конечное масло № 3	0,3	89,4	ND	0,8	0,6	0,5	N.D.	91,6
РТА-10208 Конечное масло № 4	0,3	88,0	ND	0,8	0,5	0,5	N.D.	90,1
РТА-10208 Конечное масло № 5	0,3	86,3	ND	0,7	0,8	0,5	N.D.	88,6
РТА-10208 Конечное масло № 6	0,36	100, 76	ND	0,84	0,54	0,61	N.D.	103,11

ND= не определено

РТА-10212 Конечное масло

DHA присутствовала в РТА-10212 конечном масле в количестве 41,63% и 366,9 мг/г, тогда как ЕРА присутствовала в количестве 16,52%. Были определены индивидуальные профили жирных кислот, которые представлены в табл. 29.

Таблица 29. Профили жирных кислот РТА-10212 конечное масло (% FAME)

Жирная кислота	% FAME
C6:0	ND
C7:0	ND
C8:0	ND
C9:0	ND
C10:0	ND
C11:0	ND
C12:0	ND
C13:0	ND
C14:0	0,84
C14:1	ND
C15:0	1,33
C16:0	27,09
C16:1	1,03
C17:0	0,34
C17:1	ND
C18:0	1,26
C18:1 n-9	2,14
C18:1 n-7	0,18
C19:0	ND
C18:2 n-6	0,58
C20:0	0,32
C18:3 n-3	ND
C20:1 n-9	ND
C18:3 n-6	ND
C20:2 n-6	0,26
C20:3 n-6	ND
C22:0	0,14
C20:3 n-3	ND
C20:4 n-6	1,34
C22:1 n-9	ND
C23:0	ND
C20:5 n-3	16,53
C24:0	0,53
C24:1 n-9	ND
C22:5 n-6	1,50
C22:5 n-3	1,30
C22:6 n-3	41,63
Неизвестно	0,87

ND= не определено

Пример 6.

Анализ триацилглицеридов (TAG) РТА-10208 конечных масел, описанных в примере 5, проводили с использованием методов, описанных в примере 4. Была проведена идентификация каждой молекулы жирной кислоты, что суммировано в табл. 30, ниже.

Таблица 30. Идентификация видов TAG в РТА-10208 конечном масле

Идентификация	РТА-10208 Конечное масло № 1 площадь %	РТА-10208 Конечное масло № 2 площадь %	РТА-10208 Конечное масло № 3 площадь %	РТА-10208 Конечное масло № 4 площадь %	РТА-10208 Конечное масло № 5 площадь %
ЕРА/ЕРА/ЕРА	1,3	1,0	1,9	1,7	1,4
ЕРА/ЕРА/ДНА	8,2	6,0	7,3	6,8	6,4
ДНА/ДНА/ЕРА	14,2	11,1	10,6	9,5	8,7
ДНА/ДНА/ДНА	10,2	8,3	7,6	6,1	5,7
ДРА/ЕРА/ЕРА	1,2	0,9	1,0	1,1	1,1
ДНА/ДРА/ЕРА	3,0	2,4	2,5	2,3	2,9
ДНА/ЕРА/АРА	3,8	3,0	3,0	3,0	2,3
ДНА/ДРА/ДНА					
ДНА/ДРА/ЕРА	2,3	1,9	1,5	1,6	1,7
ДНА/ДРА/ДНА	1,7	1,2	1,1	1,2	1,2
ЕРА/14:0/ДНА	1,1	1,0	1,8	1,8	1,5
ДНА/ДНА/14:0	1,1	1,0	1,4	1,3	1,3
ЕРА/ЕРА/16:0	2,3	2,3	3,4	3,9	3,3
ДНА/16:0/ЕРА	12,1	12,5	12,9	14,0	13,4
ДНА/16:0/ДНА	16,1	16,8	17,5	14,8	17,2
ЕРА/ЕРА/18:0	2,1	2,0	1,7	2,1	2,7
ДНА/ДРА/16:0	3,0	3,3	2,3	2,9	2,7
ДНА/16:0/АРА	1,6	1,6	1,8	2,0	2,2
ДНА/16:0/ДРА	1,3	2,1	1,4	1,5	2,5
ДНА/18:0/ДНА	0,8	0,8	0,7	0,8	1,0
ДНА/14:0/16:0	0,6	1,0	1,3	1,4	1,3
ЕРА/16:0/16:0	0,9	1,1	1,5	1,7	2,0
ДНА/16:0/16:0	3,6	4,8	5,5	5,7	6,5
18:0/16:0/ДНА	0,4	0,8	0,7	0,8	1,2
18:1/18:1/18:1	0,6	4,0	1,0	1,4	1,6

Пример 7 Был приготовлен флакон с двухдневным инокулумом культур изолированных микроорганизмов, депонированных под учетными номерами ATCC РТА-10208 и 10212, выращенных в средах с подкормкой углеродом и азотом в соответствии с табл. 1 и 2.

Мутагенез проводили в соответствии со следующей процедурой:

Содержимое Т=2-дневного стерильного флакона, приблизительно 50 мл, вылили в стерильный 40 мл стеклянный гомогенизатор. Культуру гомогенизировали 50 раз, вертикально перемещая поршень гомогенизатора. Культуру извлекли пипеткой и профильтровали через стерильный фильтр с размером ячейки 50 мкм, который был помещен в 50 мл стерильную пробирку (ячейку использовали как средство удержания больших скоплений колоний, при этом более мелкие скопления и отдельные клетки проходили через ячейки 50 мкм). Весь концентрированный мацерат был собран в стерильные пробирки 50 мл. Мацерированную культуру перемешали на вортексе и сделали разведения вплоть до уровней 1:100. Разбавленные образцы мацерата перемешали на вортексе до добавления 200 мкл инокулума к среде агаровых чашек, 100 × 15 мм, содержащих 4-5 стеклянных шариков (стеклянные шарики 3 мм). Каждую чашку осторожно трясли, стремясь, чтобы шарики распространили инокулум равномерно по всей чашке. Шарики удалили из чашек, а чашки оставили стоять с крышками в течение приблизительно 5 мин, чтобы высохнуть. Свет и в стерильном ламинаре и прилегающих помещениях был выключен, так как процедуру проводили в тусклом свете. Имелось минимальное освещение, чтобы можно было осуществить процедуру, но только не прямое и тусклое.

Чашки в пяти повторностях были помещены на дно XL-кросслинкера (Spectronics Corporation, Нью-Йорк), где образцы подвергались облучению. Кросслинкер обеспечивал поставляемую мощность в микроджоулях, при этом добивались уровня, когда 90-95% клеток было убито. Чашки в пяти повторностях инокулировали немутировавшими клетками, используя тот же самый протокол. Подсчет этих клеток использовали для вычисления процента гибели. Как только облучение завершалось, планшеты извлекали, крышки возвращали обратно, а чашки обертывали парафильмом с последующим обертыванием алюминиевой фольгой. Было необходимо, чтобы чашки "росли" в течение первой недели в темноте, для того чтобы они не могли репарировать поврежденные гены.

Чашки помещали в комнату с температурой 22,5°C примерно за 10 дней до подсчета колоний. Когда были сделаны окончательные подсчеты, отдельные колонии собирали стерильной инокуляционной петлей и вновь сеяли штрихом на чашки с новой средой. Каждую колонию помещали в отдельную чашку. Когда чашки плотно зарастали, при помощи инокуляционной петли был взят образец и инокулирован в стерильную 250 мл встряхиваемую колбу, содержащую 50 мл среды. Эту колбу помещали в шейкер при 200 об./мин при температуре 22,5°C. На Т=7 день культуру из встряхиваемой колбы собирали в 50 мл стерильную пробирку. Снимали показание рН и образец центрифугировали, чтобы собрать осадок биомассы. Каждый образец ополаскивали и ресуспендировали в 50:50 смеси изопропилового спирта и дистиллированной воды до начала повторного центрифугирования. Собранный осадок был высушен

сублимацией, взвешен, а потом был проведен FAME анализ. Данные в табл. 31 и 32 представляют мутантов, полученных с помощью описанного выше процесса из штаммов РТА-10208 и РТА-10212 соответственно.

Таблица 31. Мутанты РТА-10208

Жирные кислоты	Контроль РТА-10208	Мутант 1 РТА-10209	Мутант 2 РТА-10210	Мутант 3 РТА-10211
% 08:0	0,00	0,00	0,00	0,00
% 09:0	0,00	0,00	0,00	0,00
% 10:0	0,00	0,00	0,00	0,00
% 11:0	0,00	0,00	0,00	0,00
% 11:1	0,00	0,00	0,00	0,00
% 12:0	0,11	0,10	0,22	0,19
% 12:1	0,00	0,00	0,00	0,00
% 13:0	0,19	0,19	0,15	0,16
% 13:1	0,00	0,00	0,00	0,00
% 14:0	1,94	1,82	2,98	2,59
% 14:1	0,00	0,00	0,00	0,00
% 15:1	2,66	2,22	1,76	1,66
% 16:0	24,87	24,97	23,71	25,01
% 16:1	0,20	0,25	0,07	0,07
% 16:2	0,00	0,00	0,00	0,00
% 16:3	0,00	0,00	0,00	0,00
% 17:0	1,49	1,21	0,62	0,66
% 18:0	1,13	1,14	0,91	1,01
% 18:1 n-9	0,07	0,07	0,06	0,06
% 18:1 n-7	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:2	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:3 n-6	0,00	0,00	0,05	0,04
% 18:3 n-3	0,09	0,08	0,17	0,14
% 18:4 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:0	0,31	0,33	0,24	0,30
% 20:1 n-9	0,00	0,04	0,00	0,00
% 20:2	0,00	0,00	0,05	0,00
% 20:3 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:3 n-6	0,12	0,13	0,08	0,04
% 20:3 n-3	0,42	0,42	0,08	0,06
% 20:4 ARA	0,68	0,67	1,44	1,11
% 20:5 n-3 EPA	6,56	6,47	11,99	9,87
% 22:0	0,07	0,07	0,06	0,07
% 22:1	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:2	0,11	0,09	0,10	0,08
% 22:3	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:4 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:5 n-6	2,32	2,36	2,36	2,36
% 22:5 n-3	0,48	0,66	0,66	0,52
% 22:6 n-3 DHA	51,58	52,27	48,17	49,35
% 24:0	0,00	0,00	0,00	0,00
% 24:1	0,00	0,00	0,00	0,00
% Жира	47,87	49,41	66,00	63,12
% Не известно	4,61	4,45	4,07	4,64

Таблица 32. Мутанты РТА-10212

Жирные кислоты	Контроль РТА-10212	Мутант 1 РТА-10213	Мутант 2 РТА-10214	Мутант 3 РТА-10215
% 08:0	0,00	0,00	0,00	0,00
% 09:0	0,00	0,00	0,00	0,00
% 10:0	0,00	0,00	0,00	0,00
% 11:0	0,00	0,00	0,00	0,00
% 11:1	0,00	0,00	0,00	0,00
% 12:0	0,00	0,00	0,00	0,00
% 12:1	0,00	0,00	0,00	0,00
% 13:0	0,00	0,00	0,21	0,20
% 13:1	0,00	0,00	0,00	0,00
% 14:0	0,68	0,77	0,62	0,97
% 14:1	0,00	0,00	0,00	0,00
% 15:1	0,00	0,00	0,00	0,00
% 16:0	17,36	19,94	15,27	23,61
% 16:1	1,45	2,33	1,40	2,57
% 16:2	0,00	0,00	0,00	0,00
% 16:3	0,00	0,00	0,00	0,00
% 17:0	0,20	0,21	0,18	0,27
% 18:0	0,78	0,82	0,79	0,81
% 18:1 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:1 n-7	0,18	0,27	0,20	0,19
% 18:2	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:3 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:3 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00
% 18:4 n-3	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:0	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:1 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:2	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:3 n-9	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:3 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00
% 20:3 n-3	0,90	0,77	0,99	0,66
% 20:4 ARA	1,43	1,32	1,65	0,72
% 20:5 n-3 EPA	13,33	14,93	14,14	8,54
% 22:0	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:1	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:2	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:3	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:4 n-6	0,00	0,00	0,00	0,00
% 22:5 n-6	2,39	1,95	2,59	2,18
% 22:5 n-3	0,73	0,79	0,80	0,68
% 22:6 n-3 DHA	59,18	54,31	59,89	56,39
% 24:0	0,00	0,00	0,00	0,00
% 24:1	0,00	0,00	0,00	0,00
% Жира	45,69	38,08	42,88	48,48
% Не известно	1,38	1,58	1,27	2,19

Пример 8.

Масло было приготовлено в соответствии с описанным в примере 5 методом, при этом масло было разбавлено подсолнечным маслом с высоким содержанием олеиновой кислоты для достижения совместного содержания DHA + EPA по меньшей мере около 500 мг/г масла. Типичный анализ и характеристики масла, изготовленного в соответствии с этим примером, представлены в табл. 33.

Таблица 33

Химические характеристики	Технические характеристики	Результат
DHA содержание мг/г масла	Min. 320	382
EPA содержание мг/г масла	Min. 130	179
DHA + EPA содержание мг/г масла	Min. 500	561
Перекисное число мг-экв./кг	Max. 5,0	0,1
Анизидиновое число	Max. 20	4,8
Свободные жирные кислоты %	Max. 0,25	0,1
Влагосодержание и летучие компоненты %	Max. 0,02	<0,01
Неомыляемое вещество %	Max. 4,5	1,1
Трансжирные кислоты %	Max. 1	<1
Элементарный состав		
Мышьяк ppm	MAX 0,1	<0,1
Кадмий ppm	MAX 0,1	<0,1
Медь ppm	MAX 0,05	<0,02
Железо ppm	MAX 0,2	<0,02
Свинец ppm	MAX 0,1	<0,1
Ртуть ppm	MAX 0,04	<0,01

Другие ингредиенты, содержащиеся в масле, включают менее чем 2% лецитина подсолнечного масла, экстракта розмарина, токоферолов и аскорбил пальмитата (в качестве антиоксидантов).

Пример 9.

Масло было приготовлено в соответствии с описанным в примере 5 методом, при этом масло было разбавлено подсолнечным маслом с высоким содержанием олеиновой кислоты для достижения совместного содержания DHA + EPA по меньшей мере около 400 мг/г масла. Типичный анализ и характеристики масла, изготовленного в соответствии с этим примером, представлены в табл. 34.

Таблица 34

Химические характеристики	Технические характеристики	Результат
DHA содержание мг/г масла	Min. 240	255
EPA содержание мг/г масла	Min. 120	155
DHA + EPA содержание мг/г масла	Min. 400	411
Перекисное число мг-экв./кг	Max. 5,0	0,4
Анизидиновое число	Max. 20	<1
Свободные жирные кислоты %	Max. 0,25	0,1
Влагосодержание и летучие компоненты %	Max. 0,02	<0,01
Неомыляемое вещество %	Max. 4,5	0,9
Трансжирные кислоты %	Max. 1	<1
Элементарный состав		
Мышьяк ppm	MAX 0,1	<0,1
Кадмий ppm	MAX 0,1	<0,1
Медь ppm	MAX 0,05	<0,02
Железо ppm	MAX 0,2	0,0
Свинец ppm	MAX 0,1	<0,1
Ртуть ppm	MAX 0,04	<0,01

Другие ингредиенты, содержащиеся в масле, включают менее чем 2% лецитина подсолнечного масла, экстракта розмарина, токоферолов и аскорбил пальмитата (в качестве антиоксидантов).

В некоторых вариантах осуществления приведенные выше примеры 8 или 9 предоставляются в виде 20 вегетарианских желатиновых капсул с массой содержимого примерно от 999 до 1105 мг масла, с массой-брутто примерно от 1463 до 1789 мг, при этом капсула имеет время разрыва не более чем 15 мин и срок хранения около 24 месяцев.

Все описанные здесь различные аспекты, варианты осуществления и опции могут быть объединены в любые возможные разновидности.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Микробное масло, содержащее фракцию триглицеридов (TAG) в количестве по меньшей мере около 35% по весу, содержащее омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты, включающие докозагексаеновую кислоту и эйкозапентаеновую кислоту в количестве около $\geq 90\%$, по весу, от общего количества омега-3 полиненасыщенных жирных кислот, где количество эйкозапентаеновой кислоты, по весу, составляет примерно от 10 до 25% от общего количества докозагексаеновой кислоты и эйкозапентаеновой кислоты, и количество докозагексаеновой кислоты, по весу, составляет примерно от 75 до 90% от общего количества докозагексаеновой кислоты и эйкозапентаеновой кислоты.

2. Масло по п.1, которое содержит примерно от 55 до 150 мг эйкозапентаеновой кислоты на один грамм масла и примерно от 410 до 540 мг докозагексаеновой кислоты на один грамм масла и вплоть до 12 мг докозапентаеновой кислоты на грамм масла.

3. Масло по любому из пп.1, 2, в котором омега-3 полиненасыщенные жирные кислоты включают докозапентаеновую кислоту в количестве до 10%, по весу, от общего количества омега-3 полиненасыщенных жирных кислот.

4. Масло по любому из пп.1, 2, которое продуцируется *Schizochytrium* sp.

5. Масло по любому из пп.1, 2, которое содержит вплоть до 5% по весу каждой из арахидоновой кислоты, докозапентаеновой кислоты n-6, олеиновой кислоты, линолевой кислоты, линоленовой кислоты, эйкозеновой кислоты, эруковой кислоты и стеарионовой кислоты.

6. Масло по п.1, в котором общее количество омега-3 полиненасыщенных жирных кислот составляет по меньшей мере около 400 мг на один грамм масла.

7. Масло по п.6, в котором общее количество докозагексаеновой кислоты и эйкозапентаеновой кислоты составляет примерно 400 мг на один грамм масла.

8. Масло по п.1, в котором общее количество омега-3 полиненасыщенных жирных кислот составляет примерно от 400 до 750 мг на один грамм масла.

9. Масло по п.1, в котором общее количество омега-3 полиненасыщенных жирных кислот составляет по меньшей мере около 500 мг на один грамм масла.

10. Масло по п.1, в котором общее количество докозагексаеновой кислоты и эйкозапентаеновой кислоты составляет около 500 мг на один грамм масла.

11. Масло по п.1, в котором соотношение эйкозапентаеновая кислота:докозагексаеновая кислота (EPA:DHA) составляет от 1:4 до 1:7.

12. Пищевой продукт, содержащий микробное масло по любому из пп.1-11.

13. Пищевой продукт по п.12, представляющий собой детскую смесь.

14. Косметическая композиция, содержащая микробное масло по любому из пп.1-11.

15. Фармацевтическая композиция, содержащая микробное масло по любому из пп.1-11, предназначенная для лечения заболеваний, включающих воспаление, ишемическую болезнь сердца, атеросклероз, остеопороз, депрессию, судороги, *Helicobacter Pylori*, нейродегенеративные заболевания, дегенеративные заболевания печени, высокий уровень холестерина и высокий уровень триглицеридов.

16. Пероральная лекарственная форма, содержащая фармацевтическую композицию по п.15.

17. Корм для животных, содержащий микробное масло по любому из пп.1-11.

18. Корм для животных по п.17, представляющий собой корм для домашних животных, корм для животных в зоопарке, корм для скота или их комбинации.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2
