

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 380 052**

51 Int. Cl.:

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

C12N 15/82 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06841262 .6**

96 Fecha de presentación: **10.10.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1937805**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.07.2008**

54 Título: **Proceso para la producción de ácido araquidónico y/o ácido eicosapentanoico**

30 Prioridad:
13.10.2005 GB 0520843

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.05.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.05.2012

73 Titular/es:
**BASF Plant Science GmbH
67056 Ludwigshafen , DE**

72 Inventor/es:
**NAPIER, Johnathan A. y
SAYANOVA, Olga**

74 Agente/Representante:
Carvajal y Urquijo, Isabel

ES 2 380 052 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Proceso Para la Producción de Ácido Araquidónico y/o Ácido Eicosapentanoico.

La presente invención se relaciona con un nuevo proceso para la producción de ácido araquidónico y/o ácido eicosapentanoico en plantas a través de la coexpresión de una A-12-/A-15-desaturasa, A-9-elongasa, A-8-desaturasa y una A-5-desaturasa y un proceso para la producción de lípidos o aceites que tienen un contenido aumentado de ácidos grasos insaturados, en particular ácidos grasos ω -3 y ω -6 que tienen por lo menos dos enlaces dobles y una longitud de cadena de 18 a 20 átomos de carbono. Preferiblemente el ácido araquidónico y el ácido eicosapentanoico se producen en por lo menos una relación 1:2.

La invención se relaciona adicionalmente con la producción de una planta transgénica, preferiblemente una planta de cultivo transgénico, que tiene un contenido aumentado de ácido araquidónico y/o ácido eicosapentanoico, aceites o lípidos que contienen ácidos grasos C18 o C20 con un enlace doble en la posición Δ 5, 8, 9, 11, 12, 14, 15 o 17 del ácido graso producido, respectivamente debido a la expresión de la Δ -12-/ Δ -15-desaturasa, de la Δ -9-elongasa, de la Δ -8-desaturasa y de la Δ -5-desaturasa en la planta. La expresión de la Δ -12-/ Δ -15-desaturasa de la invención conduce preferiblemente a ácido linoleico y ácido α -linolénico como productos que tienen un enlace doble en la posición A 9, 12 y 15 del ácido graso.

La invención se relaciona adicionalmente con secuencias de ácidos nucleicos específicas que codifican las proteínas con actividad Δ -12-/ Δ -15-desaturasa, construcciones de ácido nucleico, vectores y plantas transgénicas que contienen dichas secuencias de ácido nucleico.

Las plantas y especialmente los cultivos de aceite se han utilizado durante siglos como fuentes para productos comestibles o no comestibles. Existen registros escritos y excavaciones arqueológicas de cultivos de aceite tales como semilla de lino, oliva y sésamo que se utilizaron ampliamente por lo menos hace seis mil años.

Los productos no comestibles de cultivos de semilla de aceite tal como colza se utilizan y se incluyen en lubricantes, lámparas de aceite, y cosméticos tales como jabones. Los cultivos de aceite difieren en sus características culturales, económicas y de utilización, por ejemplo las semillas de colza y de lino se adaptan a climas relativamente fríos, mientras que el aceite de palma y coco se adaptan a climas calientes y húmedos. Algunas plantas son plantas oleaginosas reales lo que significa que el producto principal de tales plantas es el aceite, mientras que en el caso de otras tal como algodón o soja el aceite es más o menos un subproducto. Los aceites de diferentes plantas se caracterizan básicamente por su patrón de ácido graso individual.

Los ácidos grasos y triglicéridos tienen numerosas aplicaciones en la industria de los alimentos, nutrición animal, cosméticos y en el sector de los fármacos. Dependiendo de si estos son ácidos grasos insaturados o saturados libres o triglicéridos con un contenido aumentado de ácidos grasos saturados o insaturados, estos son adecuados para las aplicaciones más variadas; así, por ejemplo, ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (= LCPUFA) se agregan a una fórmula infantil para aumentar su valor nutricional. Los diversos ácidos grasos y triglicéridos se obtienen principalmente de microorganismos tales como *Mortierella* o de plantas oleaginosas tales como soja, aceite de semilla de colza, girasol y otros, en donde estos se obtienen usualmente en la forma de sus triacilglicéridos. Alternativamente, estos se obtienen en forma ventajosa de animales, tales como peces. Los ácidos grasos libres se preparan ventajosamente mediante hidrólisis.

Si se prefieren aceites con ácidos grasos saturados o con ácidos grasos insaturados eso depende de la finalidad prevista; así, por ejemplo, lípidos con ácidos grasos insaturados, específicamente ácidos grasos poliinsaturados, se prefieren en la nutrición humana debido a que estos tienen un efecto positivo en el nivel de colesterol en la sangre y así en la posibilidad de enfermedad cardíaca. Se utilizan en una variedad de alimentos dietéticos o medicamentos. Además los PUFA se utilizan comúnmente en alimentos, comidas y en la industria cosmética. Los ácidos grasos ω -3-y/o ω -6 poliinsaturados son una parte importante de alimentos para humanos y comidas para animales. Debido a la composición común de los ácidos grasos ω -3- poliinsaturados de alimentos humanos, que son un componente esencial del aceite de pescado, se debe agregar al alimento para aumentar el valor nutricional del alimento; así, por ejemplo, ácidos grasos poliinsaturados como ácido Docosahexaenoico (= DHA, C22:6 Δ 4,7,10,13,16,19) o ácido eicosapentanoico (= EPA, C20:5 Δ 5,8,11,14,17) se agregan como se mencionó anteriormente a la fórmula infantil para aumentar su valor nutricional. Mientras que el DHA tiene un efecto positivo en el desarrollo del cerebro de los bebés. La adición de ácidos grasos ω -3 poliinsaturados se prefiere como la adición de ácidos grasos ω -6 poliinsaturados como ácido araquidónico (= ARA, C20:4 Δ 5,8,11,14) al alimento común tiene un efecto indeseado por ejemplo en enfermedades reumáticas tal como artritis reumatoide. Los ácidos grasos ω -3- y ω -6 poliinsaturados son precursores de una familia de hormonas paracrininas llamadas eicosanoides tal como prostaglandinas que son productos del metabolismo de ácido Dihomo- γ - linoleico, ARA o EPA. Los eicosanoides están implicados en la regulación de la lipólisis, el inicio de respuestas inflamatorias, la regulación de la circulación y la presión sanguínea y otras funciones centrales del cuerpo. Los eicosanoides comprenden prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos, y prostacilinas. Los ácidos grasos ω -3 parecen evitar la arterosclerosis y enfermedades cardiovasculares principalmente al regular los niveles de diferentes eicosanoides. Otros eicosanoides son los tromboxanos y leucotrienos, que son productos del metabolismo de ARA o EPA.

Principalmente los microorganismos tales como *Mortierella* o plantas oleaginosas tal como soja, colza o girasol o algas tal como *Cryptocodinium* o *Phaeodactylum* son una fuente común de aceites que contienen PUFA, en donde estos se obtienen usualmente en la forma de sus glicéridos triacilo. Alternativamente, estos se obtienen ventajosamente de animales, tal como peces. Los ácidos grasos libres se preparan ventajosamente mediante hidrólisis con una base fuerte tal como hidróxido de potasio o de sodio.

Los aceites de planta son en general ricos en ácidos grasos tales como ácidos grasos monoinsaturados como ácido oleico o ácidos grasos poliinsaturados (= PUFA) como ácido linoleico o linoléico. Los LCPUFA como ácido araquidónico o ácido eicosapentanoico se encuentran raramente en plantas algunas excepciones son especies *Nephelium* y *Salvia* en las que se encuentra el ácido araquidónico y algunas especies *Santalum* en las que se encuentra ácido eicosapentanoico. El ácido docosahexaenoico LCPUFA no se encuentra en plantas. Los LCPUFA tal como DHA, EPA, ARA, ácido Dihomo- γ - linoleico (C_{20:3} ^{Δ 8,11,14}) o ácido Docosapentaenoico (= DPA, C_{22:5} ^{Δ 7,10,13,16,19}) no se producen por plantas oleaginosas tales como soja, colza, alazor o girasol. Una fuente natural para los dichos ácidos grasos son el pescado por ejemplo arenque, salmón, sardina, pez rojo, anguila, carpa, trucha, mero, caballa, lucio-perca, atún o algas.

Aproximadamente 80% de los aceites y grasas se utilizan en la industria de los alimentos. Cerca de aproximadamente 84 % de los aceites vegetales usados en todos el mundo se derivan de solo seis cultivos/ cultivos de aceite, que son soja, aceite de palma, colza, girasol, algodón, y nuez molida.

A causa de sus propiedades positivas no ha habido falta de intentos en el pasado para hacer genes disponibles que participan en la síntesis de ácidos grasos o triglicéridos para la producción de aceites en diversos organismos que tienen un contenido modificado de ácidos grasos insaturados. Así, en la patente WO 91/13972 y su equivalente Estadounidense se describe una Δ -9-desaturasa. En la patente WO 93/11245 se reivindica una Δ -15-desaturasa y en la WO 94/11516 una Δ -12-desaturasa. La patente WO 00/34439 describe una Δ -5- y Δ -8-desaturasa. Se describen otras desaturasas, por ejemplo, en la patente EP-A-0 550 162, WO94/18337, WO 97/30582, WO 97/21340, WO 95/18222, EP-A-0 794 250, Stukey et al., J. Biol. Chem., 265, 1990: 20144-20149, Wada et al., Nature 347, 1990: 200-203 o Huang et al., Lipids 34, 1999: 649-659. Hasta la fecha, sin embargo, las diversas desaturasas se han caracterizado solo inadecuadamente bioquímicamente debido a que las enzimas en la forma de proteínas unidas a la membrana son aislables y se pueden caracterizar solo con gran dificultad (McKeon et al., Methods in Enzymol. 71, 1981: 275-277, Wang et al., Plant Physiol. Biochem., 26, 1988: 777-792). De manera general, las desaturasas unidas a la membrana se caracterizan por la introducción en un organismo adecuado, que luego se investiga para la actividad de enzima por medio del análisis de los materiales de partida y productos. Las Δ -6-Desaturasas se describen en la patente WO93106712, US5,614,393, US5614393, WO 96/21022, WO0021557 y WO 99/27111 y también se describe su aplicación para la producción en organismos transgénicos, por ejemplo en la patente WO 9846763, WO 9846764 y WO 9846765. Al mismo tiempo la expresión de diversos genes de la biosíntesis de ácidos grasos, como en la patente WO 9964616 o WO 9846776, y también se describe y se reivindica la formación de ácidos grasos poliinsaturados. Con respecto a la efectividad de la expresión de las desaturasas y su efecto en la formación de los ácidos grasos poliinsaturados se puede observar que a través de la expresión de las desaturasas y elongasas como se describió hasta la fecha solo se han logrado bajos contenidos de ácidos grasos poliinsaturados/lípidos, tal como por vía de ejemplo ácido eicosapentaenoico o ácido araquidónico. Por lo tanto, es deseable una alternativa y ruta más efectiva con mayor rendimiento de producto.

De acuerdo con lo anterior, aún existe una gran demanda para nuevos y más adecuados genes, que codifican las enzimas, que participan en la biosíntesis de los ácidos grasos insaturados y hacen posible producir ciertos ácidos grasos específicamente en una escala industrial sin formar subproductos indeseados. En la selección de genes para la biosíntesis son particularmente importantes dos características anteriores. Por una parte, subsiste una necesidad de procesos mejorados para obtener los mayores contenidos posibles de ácidos grasos poliinsaturados. Ventajosamente los genes deben ser tan selectivos como sea posible y deben si es posible tener más de una actividad en la cadena de biosíntesis de ácidos grasos.

De acuerdo con lo anterior, es un objeto de la presente invención proporcionar genes adicionales de enzimas desaturasa y elongasa para la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados en plantas preferiblemente en plantas oleaginosas y para utilizarlos en un proceso comercial para la producción de PUFA especialmente LCPUFA. Dicho proceso debe aumentar el contenido LCPUFA en plantas tanto como sea posible preferiblemente en semillas de una planta oleaginosa.

Encontramos que un proceso para la producción de ácido araquidónico o ácido eicosapentanoico logra este objetivo o el ácido araquidónico y ácido eicosapentanoico en plantas transgénicas que producen semillas maduras con un contenido de por lo menos 1 % en peso de dichos compuestos denominados como el contenido total de lípidos de dicho organismo, comprende las siguientes etapas:

a) introducir por lo menos una secuencia de ácidos nucleicos en dicha planta transgénica, que codifica un polipéptido que tiene una actividad Δ -12-desaturasas y Δ -15-desaturasa, y

b) introducir por lo menos una segunda secuencia de ácidos nucleicos en dicha planta transgénica, que codifica un polipéptido que tiene una actividad Δ -9-elongasa, y

c) introducir por lo menos una tercera secuencia de ácidos nucleicos en dicha planta transgénica, que codifica un polipéptido que tiene una actividad Δ -8-desaturasa, y

d) introducir por lo menos una cuarta secuencia de ácidos nucleicos, que codifica un polipéptido que tiene una actividad Δ -5-desaturasa, y

5 e) cultivar y cosechar dicha planta transgénica.

De acuerdo con la invención las secuencias de ácidos nucleicos utilizadas aíslan las secuencias nucleicas que codifican los polipéptidos que tienen una actividad Δ -12-desaturasa- y Δ -15-desaturasa-, Δ 9-elongasa-, Δ -8 desaturasa- o Δ 5-desaturasa.

10 Las secuencias de ácidos nucleicos que utilizan el proceso de la invención mencionado anteriormente, codifican los polipéptidos que tienen actividad Δ -12-desaturasa y Δ -15-desaturasa, actividad Δ -8-desaturasa, Δ -9-elongasa o Δ -5-desaturasa y que se seleccionan del grupo que consiste de

a) una secuencia de ácidos nucleicos descrita en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 21 y

15 b) una secuencia de ácidos nucleicos, que, como resultado de la degeneración del código genético, se puede derivar de un secuencia de polipéptido como se describe en la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 20 o SEQ ID NO: 22 de acuerdo con la degeneración del código genético,

20 c) derivados de las secuencias de ácidos nucleicos descritas en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 21 que codifican los polipéptidos tienen por lo menos 50 % de homología con la secuencia como se describe en la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 20 o SEQ ID NO: 22 y cuyos polipéptidos tienen actividad Δ -12-desaturasa y Δ -15-desaturasa, actividad Δ -8-desaturasa, Δ -9-elongasa o Δ -5-desaturasa.

25 En el proceso de la invención la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la enzima Δ -12-desaturasa- y Δ -15-desaturasa bifuncional conduce a un flujo aumentado de ácido oleico (C18:1 Δ 9) a ácido linoléico (C18:3 Δ 9,12,15) y por lo tanto a un aumento de ácidos grasos ω -3 en comparación con los ácidos grasos ω -6. Adicionalmente esta enzima bifuncional actúa en ácidos grasos C16- que tienen un enlace doble en la molécula de ácido graso así como también en ácidos grasos C18 que tienen un enlace doble en la molécula de ácido graso. Esto conduce a un aumento adicional en el flujo de los ácidos grasos precursores tal como ácidos grasos C18 tal como ácido oleico hacia ácidos grasos C18 tal como ácido linoleico y linoléico. Esto es especialmente ventajoso en plantas tales como plantas oleaginosas que tienen un alto contenido de ácido oleico tal como aquellas de la familia Brassicáceas, tal como el género Brassica, por ejemplo aceite de semilla de colza o canola; la familia de Elaeagnáceas, tal como el género Elaeagnus, por ejemplo el género y las especies Olea europaea, o la familia Fabáceas, tal como el género Glicina, por ejemplo el género y las especies Glycine max, que son altas en ácido oleico. Pero también en otras plantas tales plantas oleaginosas como Brassica juncea, Camelina sativa, girasol o alazor y todas las otras plantas mencionadas aquí esto conduce a una cantidad mayor de ácidos grasos ω -3. Al utilizar dicha secuencia de ácidos nucleicos de la invención y la actividad de este producto de gen de los ácidos grasos ω -3 a los ácidos grasos ω -6 se producen en por lo menos una relación 1:2, preferiblemente en por lo menos una relación 1:3 o 1:4, más preferiblemente en por lo menos una relación 1:5 o 1:6. Esto significa que especialmente el ácido araquidónico y ácido eicosapentanoico se producen en por lo menos una relación 1:2, preferiblemente en por lo menos una relación 1:3 o 1:4, más preferiblemente en por lo menos una relación 1:5 o 1:6.

35 En particular las moléculas de los ácidos grasos ω -3 o de los ácidos grasos ω -6 se producen en el proceso de la invención, se producen más preferiblemente ácido araquidónico y ácido eicosapentanoico. Encontramos que este objeto se logra ventajosamente por la expresión combinada de cuatro secuencias de ácidos nucleicos aisladas de acuerdo con la invención que codifican los polipéptidos que tienen las siguientes actividades: un polipéptido con actividad Δ -12-desaturasa- y Δ -15-desaturasa, un polipéptido con una actividad C18- Δ -9-elongasa, un polipéptido con actividad C20- Δ -8-desaturasa y una actividad C20- Δ -5-desaturasa. Este objeto se logra en particular por la coexpresión de las secuencias aisladas de ácido nucleico de acuerdo con la invención. Los ácidos grasos C18 con un enlace doble en la posición Δ -9 se desaturan una primera vez para el ácido linoleico mediante la Δ -12-desaturasa y Δ -15-desaturasa y por lo tanto una segunda vez para el ácido linoléico mediante la misma enzima ventajosamente utilizada en el proceso de la invención. Los ácidos grasos linoleico C18 y ácido linoléico que tienen un enlace doble en la posición Δ -9 se elongan por la Δ -9-elongasa, que se utiliza ventajosamente en el proceso de la invención. La Δ -8- desaturasa utilizada en el proceso de un enlace doble en la posición Δ -8 se introduce en ácidos grasos C20. Además se introduce un enlace doble en las moléculas de ácido graso producidas en la posición Δ -5 por la Δ -5-desaturasa. Los productos finales de la reacción enzimática completa son ácido araquidónico y ácido eicosapentanoico.

55 Los ácidos grasos ω -3 o los ácidos grasos ω -6, preferiblemente los ácidos grasos ω -3 producidos en el proceso se unen ventajosamente en los lípidos de membrana y/o triacilglicéridos o mezclas de diferentes glicéridos, pero también puede ocurrir en las plantas como ácidos grasos libres o se unen en la forma de otros ésteres de ácido graso.

Los ésteres de ácido graso con los ácidos grasos ω -3 o los ácidos grasos ω -6 especialmente las moléculas de ácido araquidónico y ácido eicosapentanoico se pueden aislar en la forma de un aceite o lípido, por ejemplo en la forma de compuestos tal como esfingolípidos, fosfoglicéridos, lípidos, glicolípidos tal como glicosfingolípidos, fosfolípidos tal como fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol o difosfatidilglicerol, monoacilglicéridos, diacilglicéridos, triacilglicéridos u otros ésteres de ácido graso tal como los ésteres de la coenzima acetilo A de las plantas que se han utilizado para la preparación de los ésteres de ácido graso; preferiblemente, estos se aíslan en la forma de sus diacilglicéridos, triacilglicéridos y/o en la forma de fosfatidilcolina, especialmente preferiblemente en la forma de los triacilglicéridos. Además de estos ésteres, también están presentes los LCPUFA en las plantas, ventajosamente en las plantas oleaginosas como ácidos grasos libres o unidos en otros compuestos. Como una regla, los diversos compuestos mencionados anteriormente (ésteres de ácido graso y ácidos grasos libres) están presentes en las plantas con una distribución aproximada de 80 a 90% en peso de triglicéridos, 2 a 5 % en peso de diglicéridos, 5 a 10 % en peso de monoglicéridos, 1 a 5% en peso de ácidos grasos libres, 2 a 8 % en peso de fosfolípidos, el total de la cantidad de diversos compuestos a 100% en peso.

En el proceso de la invención [el singular debe incluir el plural y vice versa] los LCPUFA se producen en un contenido de por lo menos 1 % en peso, preferiblemente por lo menos 2, 3, 4 o 5 % en peso, más preferiblemente por lo menos 6, 7, 8, o 9 % en peso, más preferiblemente 10, 20 o 30 % en peso denominados como el contenido total de lípidos de la planta utilizada en el proceso. Esto significa que el ácido araquidónico y ácido eicosapentanoico se producen en un contenido de por lo menos 1 % en peso, preferiblemente por lo menos 2, 3, 4 o 5 % en peso, más preferiblemente por lo menos 6, 7, 8, o 9 % en peso, más preferiblemente 10, 20 o 30 % en peso denominados como el contenido total de lípidos. El material de partida preferido para el proceso de la invención es ácido oleico (C18:1), que se transforma a los productos finales preferidos ARA o EPA. En cuanto a las plantas del proceso de la invención se utiliza el producto del proceso que no es un producto de una sustancia pura per se. Esta es una mezcla de diferentes sustancias en donde uno o más compuestos son el producto principal y otros solo están contenidos como subproductos. Ventajosamente los subproductos no deben exceder 20 % en peso denominados como el contenido total de lípidos de la planta, preferiblemente los subproductos no deben exceder 15 % en peso, más preferiblemente no deben exceder 10 % en peso, más preferiblemente no deben exceder 5 % en peso. En el evento que una mezcla de diferentes ácidos grasos tales como ARA y EPA sean el producto del proceso de la invención dichos ácidos grasos se pueden purificar adicionalmente mediante un método conocido por un experto en la técnica tal como destilación, extracción, cristalización a bajas temperaturas, cromatografía o una combinación de dichos métodos. Estos ácidos grasos químicamente puros o composiciones de ácido graso son ventajosos para aplicaciones en el sector de la industria de alimentos, el sector de los cosméticos y especialmente el sector de la industria farmacológica.

Los ésteres de ácido graso o las mezclas de ácido graso producidas por el proceso de acuerdo con la invención ventajosamente comprenden 6 a 15 % de ácido palmítico, 1 a 6 % de ácido esteárico, 7 a 85 % de ácido oleico, 0.5 a 8 % de ácido vaccénico, 0.1 a 1 % de ácido aráquico, 7 a 25 % de ácidos grasos saturados, 8 a 85 % de ácidos grasos monoinsaturados y 60 a 85 % de ácidos grasos poliinsaturados que incluyen los LCPUFA, en cada caso con base en 100 % y en el contenido de ácido graso total de los organismos. Los LCPUFA ventajosos, que están presentes en los ésteres de ácido graso o las mezclas de ácidos grasos son preferiblemente por lo menos 1 %, 2 %, 3 %, 4% o 5% en peso de ácido araquidónico y/o preferiblemente por lo menos 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9% o 10% en peso de ácido eicosapentanoico, con base en el contenido de ácido graso total.

Más aún, los ésteres de ácido graso o mezclas de ácidos grasos que se han producido por el proceso de la invención comprenden ventajosamente ácidos grasos seleccionados del grupo de ácido grasos de ácido erúxico (ácido 13-docosaenoico), ácido estercúlico (ácido 9,10-metileno-octadec-9-enoico), ácido malválico (ácido 8,9-metilenoheptadec-8-enoico), ácido chaulmoógrico (ácido ciclopentenododecanoico), ácido graso furano (ácido 9,12-epoxioctadeca-9,11-dienoico), ácido vernólico (ácido 9,10-epoxioctadec-12-enoico), ácido tarírico (ácido 6-octadecinoico), ácido 6-nonadecinoico, ácido santálico (ácido 11-octadecen-9-inoico), ácido 6,9-octadeceninoico, ácido pirúlico (ácido 10-heptadecen-8-inoico), ácido crepenínico (ácido 9-octadecen-12-inoico), ácido 13,14-dihidroorofeico, ácido octadecen-13-eno-9,11-diinoico, ácido petroselénico (ácido cis-6-octadecenoico), ácido 9c,12t-octadecadienoico, ácido calendúlico (ácido 8t10t12c-octadecatrienoico), ácido catálpico (ácido 9t11t13c-octadecatrienoico), ácido eleostearico (ácido 9c11t13t-octadecatrienoico), ácido jacárico (ácido 8c10t12c-octadecatrienoico), ácido punícico (ácido 9c11t13c-octadecatrienoico), ácido pari-nárico (ácido 9c11t13t15c-octadecatetraenoico), ácido pinolénico (ácido all-cis-5,9,12-octadecatrienoico), ácido labalénico (ácido 5,6-octadecadienalénico), ácido ricinoleico (ácido 12-hidroxioléico) y/o ácido coriólico (ácido 13-hidroxi-9c, 11t-octadecadienoico). Los ácidos grasos mencionados anteriormente son, como una regla, ventajosamente solo encontrados en trazas de los ésteres de ácido graso o mezclas de ácidos grasos producidos por el proceso de acuerdo con la invención, es decir que, con base en los ácidos grasos totales, estos ocurren a menos de 30 %, preferiblemente a menos de 25 %, 24 %, 23 %, 22% o 21 %, especialmente preferiblemente a menos de 20 %, 15 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6% o 5 %, muy especialmente preferiblemente a menos de 4 %, 3 %, 2 % o 1 %. En una forma preferida adicional de la invención, estos ácidos grasos mencionados anteriormente ocurren a menos de 0.9 %, 0.8 %, 0.7 %, 0.6% o 0.5 %, especialmente preferiblemente a menos de 0.4 %, 0.3 %, 0.2 %, 0.1 %, con base en los ácidos grasos totales. Los ésteres de ácido graso o mezclas de ácidos grasos producidos por el proceso de acuerdo con la invención ventajosamente comprenden menos de 0.1 %, con base en los ácidos grasos totales, y/o

no ácido butírico, no colesterol, no ácido clupanodónico (= ácido docosapentaenoico, C22:5^{Δ4,8,12,15,21}) y no ácido nisínico (ácido tetracosahexaenoico, C23:6^{Δ3,8,12,15,18,21}),

Las secuencias aisladas de ácido nucleico utilizadas en el proceso de acuerdo con la invención codifican las proteínas o partes de estas, en donde las proteínas o la proteína individual o partes de las mismas comprenden una secuencia de aminoácidos con suficiente homología con la secuencia de aminoácidos que se muestra en las secuencias de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 20 o SEQ ID NO: 22 ya que las proteínas o partes de las mismas retienen una actividad Δ -12-desaturasa y Δ -15-desaturasa-, Δ -9-elongasa-, A-8-desaturasa- y/o Δ -5-desaturasa. Las proteínas o partes de las mismas que se codifica/codifican por las moléculas de ácido nucleico retienen preferiblemente su actividad enzimática esencial y la capacidad de participar en el metabolismo de los compuestos requeridos para la síntesis de de las membranas celulares o los cuerpos de lípido en los organismos, ventajosamente en plantas, o en el transporte de las moléculas a través de estas membranas. Ventajosamente, las proteínas codificadas por las moléculas de ácido nucleico tienen por lo menos aproximadamente 50 %, preferiblemente por lo menos aproximadamente 60% y more preferiblemente por lo menos aproximadamente 70 %, 80% o 90% y más preferiblemente por lo menos aproximadamente 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99% o más identidad con las secuencias de aminoácido mostradas en la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 20 o SEQ ID NO: 22. Para los propósitos de la invención, homología u homólogo se entiende que significa identidad o idéntico, respectivamente.

La homología se calcula sobre el aminoácido o la región de la secuencia de ácidos nucleicos completa. El experto tiene disponible una serie de programas que se basan en diversos algoritmos para la comparación de diversas secuencias. Aquí, los algoritmos de Needleman y Wunsch o Smith y Waterman dan resultados particularmente confiables. El programa PileUp (J. Mol. Evolution., 25, 351-360, 1987, Higgins et al., CABIOS, 5 1989: 151-153) o los programas Gap y BestFit [Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. 48; 443-453 (1970) y Smith and Waterman (Adv. Appl. Math. 2; 482-489 (1981)), que son parte del paquete de software GCG [Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711 (1991)], se utilizan para la alineación de secuencia. Los valores de homología de secuencia que se indicaron anteriormente como un porcentaje se determinan sobre la región de secuencia completa utilizando el programa GAP y las siguientes configuraciones: Peso Espacio: 50, Peso Longitud: 3, Emparejamiento Promedio: 10.000 y Emparejamiento Incorrecto Promedio: 0.000. A menos que se especifique otra cosa, estas configuraciones se utilizan siempre como configuraciones estándar para las alineaciones de secuencia. Más aún, en el proceso de la invención se utilizan ventajosamente las secuencias de ácidos nucleicos que difieren de una de las secuencias de nucleótidos mostradas en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 21 (y partes de las mismas) propio a la degeneración del código genético y que codifica así la misma Δ -12-desaturasa y Δ - 15-desaturasa, Δ -9-elongasa, Δ -8-desaturasa o Δ -5-desaturasa como aquellas codificadas por secuencias de nucleótidos mostradas en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 21.

Las plantas adecuadas para la producción en el proceso de acuerdo con la invención son, en principio todas las plantas que producen semillas maduras especialmente plantas de cultivo tales como plantas oleaginosas.

Las plantas que son adecuadas son, en principio, todas aquellas plantas que son capaces de sintetizar los ácidos grasos y que producen semillas maduras, tal como todas las plantas monocotiledóneas o dicotiledóneas. Las plantas ventajosas se seleccionan del grupo que consiste de las familias de plantas Anacardiáceas, Asteráceas, Apiáceas, Boragináceas, Brasicáceas, Cannabáceas, Elaeagnáceas, Euforbiáceas, Fabáceas, Geraniáceas, Gramináceas, Juglandáceas, Legumináceas, Lináceas, Litirariáceas, Malváceas, Onagráceas, Palmas, Poáceas, Rubiáceas, Escrofulariáceas, Solanáceas, Esterculiáceas y Teaceáceas o plantas de vegetales u ornamentales. Las plantas más preferidas se seleccionan del grupo que consiste del género de planta de Pistacia, Mangifera, Anacardio, Calendula, Carthamus, Centaurea, Cichorium, Cynara, Helianthus, Lactuca, Locusta, Tagetes, Valeriana, Borago, Daucus, Brassica, Camelina, Melanosinapis, Sinapis, Arabadopsis, Orychophragmus, Cannabis, Elaeagnus, Manihot, Janipha, Jatropha, Ricinus, Pisum, Albizia, Cathormion, Feuillea, Inga, Pithecolobium, Acacia, Mimosa, Medicago, Glycine, Dolichos, Phaseolus, Pelargonium, Cocos, Oleum, Juglans, Wallia, Arachis, Lino, Punica, Gossypium, Camissonia, Oenothera, Elaeis, Hordeum, Secale, Avena, Sorghum, Andropogon, Holcus, Panicum, Oryza, Zea, Triticum, Coffea, Verbascum, Capsicum, Nicotiana, Solanum, Lycopersicon, Theobroma y Camellia.

Ejemplos que se pueden mencionar son las siguientes plantas seleccionadas del grupo que consiste de Anacardiáceas tal como el género Pistacia, Mangifera, Anacardium, por ejemplo el género y las especies Pistacia vera [pistacho], Mangifer indica [mango] o Anacardium occidentale [marañón], Asteráceas, tal como el género Calendula, Carthamus, Centaurea, Cichorium, Cynara, Helianthus, Lactuca, Locusta, Tagetes, Valeriana, por ejemplo el género y las especies Calendula officinalis [caléndula común], Carthamus tinctorius [alazor], Centaurea cyanus [flor de maíz], Cichorium intybus [achicoria], Cynara scolymus [alcachofa], Helianthus annuus [girasol], Lactuca sativa, Lactuca crispera, Lactuca esculenta, Lactuca scariola L. ssp. sativa, Lactuca scariola L. var. integrata, Lactuca scariola L. var. integrifolia, Lactuca sativa subsp. romana, Locusta communis, Valeriana locusta [vegetales para ensalada], Tagetes lucida, Tagetes erecta o Tagetes tenuifolia [caléndula africana o francesa], Apiáceas, tal como el género Daucus, por ejemplo el género y las especies Daucus carota [zanahoria], Boragináceas, tal como el género Borago, por ejemplo el género y las especies Borago officinalis [borraja], Brasicáceas, tal como el género Brassica, Camelina, Melanosinapis, Sinapis, Arabadopsis, por ejemplo el género y las especies Brassica napus,

Brassica rapa ssp. [aceite de semilla de colza], Sinapis arvensis Brassica juncea, Brassica juncea var. juncea, Brassica juncea var. crispifolia, Brassica juncea var. foliosa, Brassica nigra, Brassica sinapioides, Camelina sativa, Melanosinapis communis [mostaza], Brassica oleracea [remolacha forrajera] o Arabidopsis thaliana, Cannabáceas, tal como el género Cannabis, tal como el género y las especies Cannabis sativa [cáñamo], Elaeagnáceas, tal como el género Elaeagnus, por ejemplo el género y las especies Olea europaea [oliva], Euforbiáceas, tal como el género Manihot, Janipha, Jatropha, Ricinus, por ejemplo el género y las especies Manihot utilissima, Janipha manihot, Jatropha manihot, Manihot aipil, Manihot dulcis, Manihot manihot, Manihot melanobasis, Manihot esculenta [yuca] o Ricinus communis [planta de aceite de ricino], Fabáceas, tal como el género Pisum, Albizia, Cathormion, Feuillea, Inga, Pithecolobium, Acacia, Mimosa, Medicago, Glycine, Dolichos, Phaseolus, Sorghum, por ejemplo el género y las especies Pisum sativum, Pisum arvense, Pisum humile [guisantes], Albizia berteriana, Albizia julibrissin, Albizia lebbeck, Acacia berteriana, Acacia littoralis, Albizia berteriana, Albizzia berteriana, Cathormion berteriana, Feuillea berteriana, Inga fragrans, Pithecolobium berterianum, Pithecolobium fragrans, Pithecolobium berterianum, Pseudalbizia berteriana, Acacia julibrissin, Acacia nemu, Albizia nemu, Feuillea julibrissin, Mimosa julibrissin, Mimosa speciosa, Sericanrda julibrissin, Acacia lebbeck, Acacia macrophylla, Albizia lebbeck, Feuillea lebbeck, Mimosa lebbeck, Mimosa speciosa, Medicago sativa, Medicago varia [alfalfa] Glycine max Dolichos sorghum, Glycine gracilis, Glycine hispida, Phaseolus max, Soja hispida o Soja max [soja], Geraniáceas, tal como el género Pelargonium, Coccois, Oleum, por ejemplo el género y las especies Coccois nucifera, Pelargonium grossularioides o Oleum coccois [coco], Gramináceas, tal como el género Saccharum, por ejemplo el género y las especies Saccharum officinarum, Juglandáceas, tal como el género Juglans, Wallia, por ejemplo el género y las especies Juglans regia, Juglans ailanthifolia, Juglans sieboldiana, Juglans cinerea, Wallia cinerea, Juglans bixbyi, Juglans californica, Juglans hindsii, Juglans intermedia, Juglans jamaicensis, Juglans major, Juglans microcarpa, Juglans nigra o Wallia nigra [nuez], Leguminosas, tal como el género Arachis, por ejemplo el género y las especies Arachis hypogaea [cacahuete], Lináceas, tal como el género Adenolinum, por ejemplo el género y las especies Linum usitatissimum, Linum humile, Linum austriacum, Linum bienne, Linum angustifolium, Linum catharticum, Linum flavum, Linum grandiflorum, Adenolinum grandiflorum, Linum lewisii, Linum narbonense, Linum perenne, Linum perenne var. lewisii, Linum pratense o Linum trigynum [semilla de lino], Litariáceas, tal como el género Punica, por ejemplo el género y las especies Punica granatum [pomegranate], Malváceas, tal como el género Gossypium, por ejemplo el género y las especies Gossypium hirsutum, Gossypium arboreum, Gossypium barbadense, Gossypium herbaceum o Gossypium thurberi [algodón], Onagráceas, tal como el género Camissonia, Oenothera, por ejemplo el género y las especies Oenothera biennis o Camissonia brevipes [onagra], Palmas, tal como el género Elaeis, por ejemplo el género y las especies Elaeis guineensis [aceite de palma], Poáceas, tal como el género Hordeum, Secale, Avena, Sorghum, Andropogon, Holcus, Panicum, Oryza, Zea (maíz), Triticum, por ejemplo el género y las especies Hordeum vulgare, Hordeum jubatum, Hordeum murinum, Hordeum secalinum, Hordeum distichon Hordeum aegiceras, Hordeum hexastichon, Hordeum hexastichum, Hordeum irregulare, Hordeum sativum, Hordeum secalinum [cebada], Secale [centeno], Avena sativa, Avena fatua, Avena byzantina, Avena fatua var. sativa, Avena hybrida [avenas], Sorghum bicolor, Sorghum halepense, Sorghum saccharatum, Sorghum vulgare, Andropogon drummondii, Holcus bicolor, Holcus sorghum, Sorghum aethiopicum, Sorghum arundinaceum, Sorghum caffrorum, Sorghum cernuum, Sorghum dochna, Sorghum drummondii, Sorghum durra, Sorghum guineense, Sorghum lanceolatum, Sorghum nervosum, Sorghum saccharatum, Sorghum subglabrescens, Sorghum verticilliflorum, Sorghum vulgare, Holcus halepensis, Sorghum miliaceum, Panicum militaceum [mijo], Oryza sativa, Oryza latifolia [arroz], Zea mays [maíz] Triticum aestivum, Triticum durum, Triticum turgidum, Triticum hybernum, Triticum macha, Triticum sativum o Triticum vulgare [trigo], Rubiáceas, tal como el género Coffea, por ejemplo el género y las especies Coffea spp., Coffea arabica, Coffea canephora o Coffea liberica [café], Scrophulariáceas, tal como el género Verbascum, por ejemplo el género y las especies Verbascum blattaria, Verbascum chaixii, Verbascum densiflorum, Verbascum lagurus, Verbascum longifolium, Verbascum lychnitis, Verbascum nigrum, Verbascum olympicum, Verbascum phlomoides, Verbascum phoenicum, Verbascum pulverulentum o Verbascum thapsus [mitrún], Solanáceas, tal como el género Capsicum, Nicotiana, Solanum, Lycopersicon, por ejemplo el género y las especies Capsicum annuum, Capsicum annuum var. glabrusculum, Capsicum frutescens [pimienta], Capsicum annuum [pimiento], Nicotiana tabacum, Nicotiana alata, Nicotiana attenuata, Nicotiana glauca, Nicotiana langsdorffii, Nicotiana obtusifolia, Nicotiana quadrivalvis, Nicotiana repanda, Nicotiana rustica, Nicotiana sylvestris [tabaco], Solanum tuberosum [papa], Solanum melongena [berenjena] Lycopersicon esculentum, Lycopersicon lycopersicum, Lycopersicon pyriforme, Solanum integrifolium o Solanum lycopersicum [tomate], Esterculiáceas, tal como el género Theobroma, por ejemplo el género y las especies Theobroma cacao [cacao] o Teáceas, tal como el género Camellia, por ejemplo el género y las especies Camellia sinensis [te].

Las plantas que se utilizan especialmente ventajosamente en el proceso de acuerdo con la invención son plantas que pertenecen a las plantas oleaginosas, es decir que se utilizan para la producción de aceite, tal como semilla de aceite o plantas de cultivo de aceite que comprenden grandes cantidades de compuesto de lípido, tal como cacahuete, aceite de semilla de colza, canola, girasol, alazor (Carthamus tinctoria), amapola, mostaza, cáñamo, planta de aceite de ricino, oliva, sésamo, Caléndula, Punica, onagra, mitrún, cardo, rosas silvestres, avellana, almendra, macadamia, aguacate, laurel, calabaza/calabacín, semilla de lino, soja, pistachos, borraja, árboles (aceite de palma, coco o nuez) o cultivos herbáceos tal como maíz, trigo, centeno, avena, trigo, arroz, cebada, algodón, yuca, pimienta, Caléndula, plantas Solanáceas tales como papa, tabaco, berenjena y tomate, especies Vicia, guisantes, alfalfa o arbustos (café, cacao, té), especies Salix, y gramíneas perennes y cultivos de forraje. Las plantas preferidas de acuerdo con la invención son plantas de cultivo de aceite tal como cacahuete, aceite de semilla de

colza, canola, girasol, alazor, amapola, mostaza, cáñamo, planta de aceite de ricino, oliva, Caléndula, Punica, onagra, calabaza/calabacín, semilla de lino, soja, borraja, árboles (aceite de palma, coco). Especialmente se prefieren plantas que son altas en ácidos grasos C18:1-, C18:2- y/o C18:3, tal como aceite de semilla de colza, canola, Brassica juncea, Camelina sativa, Orychophragmus, girasol, alazor, tabaco, mitrún, sésamo, algodón, calabaza/calabacín, amapola, onagra, nuez, semilla de lino, cáñamo o cardo. Las plantas especialmente preferidas son plantas tales como colza, canola, alazor, girasol, amapola, mostaza, cáñamo, onagra, nuez, semilla de lino o cáñamo. Otras plantas preferidas son grano de ricino, sésamo, oliva, caléndula, granada, avellana, maíz, almendra, macadamia, algodón, aguacate, calabaza, laurel, pistacho, aceite de palma, cacahuete, soja, caléndula, café, tabaco, cacao y borraja.

Para la producción de los ácidos grasos ω -6- y/o los ácidos grasos ω -3 adicionales es ventajoso introducir las secuencias de ácidos grasos nucleicos adicionales, que codifican otras enzimas de la síntesis de los ácidos grasos tales como preferiblemente Δ -5-elongasa(s) y/o Δ -4-desaturasa(s) [para los propósitos de la presente invención, el plural se entiende como que comprende el singular y vice versa]. Otros genes de ácido graso o metabolismo de lípido, que se pueden introducir se seleccionan del grupo que consiste de deshidrogenasas acil-CoA, desaturasas acil-ACP [= proteína de portador acilo], tioesterasas acil-ACP, transferasas acilo de ácido graso, aciltransferasas acil-CoA:lisofosfolípido, sintasas de ácido graso, hidroxilasas de ácido graso, carboxilasas acetil-coenzima A, oxidasas acil-coenzima A, desaturasas de ácido graso, acetilenasas de ácido graso, lipoxigenasas, lipasas triacilglicerol, sintasas alenóxido, liasas hidroperóxido o elongasas de ácido graso. Las secuencias de ácido nucleico preferidas, que se utilizan además del proceso de la invención, se describen en el protocolo de secuencia de la WO2005/012316 y en la Tabla 1 de la especificación de dicha solicitud, estas secuencias se incorporan por lo tanto como referencia.

Las plantas transgénicas se entiende como que significa células de planta única, ciertos tejidos, órganos o partes de plantas y sus cultivos en medio sólido o en cultivo líquido, partes de plantas y plantas completas tal como cultivos de células de plantas, protoplastos de plantas, cultivos de callo o tejidos de planta tal como hojas, tallos, brotes, semillas, flores, raíces, tubérculos etc. Dichas plantas transgénicas se pueden cultivar por ejemplo en medio de cultivo sólido o líquido, en suelo o en hidropónicos. Las plantas en el sentido de la invención también incluyen células de planta y ciertos tejidos, órganos y partes de plantas en todas sus formas fenotípicas tales como anteras, fibras, pelos de la raíz, troncos, embriones, callos, cotiledóneas, peciolos, material cosechado, tejido de planta, tejido reproductivo tal como semillas y cultivos celulares que se derivan de la planta transgénica actual y/o se pueden utilizar para lograr la planta transgénica. En este contexto, la semilla comprende todas las partes de la semilla tales como recubrimientos de semillas, células epidérmicas, células de semilla, endospermo o tejido embrionario.

Para los propósitos de la invención, "transgénico" o "recombinante" significa con respecto a, por ejemplo, una secuencia de ácidos nucleicos, un casete de expresión (= construcción de gen) o un vector que comprende la secuencia de ácidos nucleicos o un organismo transformado con las secuencias de ácido nucleico, las construcciones de gen o vectores como se describe aquí de acuerdo con la invención, todas aquellas construcciones logradas mediante métodos recombinantes en los que

a) la secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con la invención, o

b) una secuencia genética de control que se liga operablemente con la secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con la invención, por ejemplo un promotor, o

c) a) y b)

no se ubican en su ambiente genético natural o se han modificado mediante métodos recombinantes, es posible para que la modificación tome la forma de, por ejemplo, una sustitución, adición, eliminación, inversión o inserción de uno o más residuos de nucleótido. El ambiente genético natural se entiende como que significa el locus cromosómico o genómico natural en la planta original o la presencia en una colección genómica. En el caso de una colección genómica, el ambiente genético natural de la secuencia de ácidos nucleicos se retiene preferiblemente, por lo menos en parte. El ambiente flanquea la secuencia de ácidos nucleicos por lo menos en un lado y tiene una longitud de secuencia de por lo menos 50 bp, preferiblemente por lo menos 500 bp, especialmente preferiblemente por lo menos 1000 bp, más preferiblemente por lo menos 5000 bp. Un casete de expresión que ocurre en forma natural - por ejemplo la combinación que ocurre en forma natural del promotor natural de las secuencias de ácidos nucleicos con los genes Δ 12- desaturasa y Δ 15-desaturasa-, Δ -9-elongasa-, Δ -8-desaturasa- y/o Δ 5-desaturasa correspondientes - llega a ser un casete de expresión transgénico cuando este case de expresión se modifica mediante métodos sintéticos, no naturales ("artificiales") tal como, por ejemplo, tratamiento mutagénico. Se describen los métodos adecuados, por ejemplo, en US 5,565,350 o WO 00/15815.

Una planta transgénica para los propósitos de la invención se entiende por lo tanto que significa, como anteriormente, que los ácidos nucleicos utilizados en el proceso no están en su locus natural en el genoma de una planta, es posible para los ácidos nucleicos ser expresados homológamente o heterológamente. Sin embargo, como se menciona, transgénico también significa que, mientras que los ácidos nucleicos de acuerdo con la invención están en su posición natural en el genoma de una planta, la secuencia se ha modificado con respecto a la secuencia natural, y/o que se han modificado las secuencias reguladoras de las secuencias naturales. Transgénico se entiende

preferiblemente que significa la expresión de los ácidos nucleicos de acuerdo con la invención en un locus no natural en el genoma, es decir homólogo o, preferiblemente, tiene lugar la expresión heteróloga de los ácidos. Los organismos transgénicos preferidos son cultivos de semilla de aceite.

5 Después de cultivo las plantas transgénicas que se utilizan en el proceso de la invención se pueden comprar en el
 10 mercador sin aislar los ácidos grasos ω -6- y/o los ácidos grasos ω -3 preferiblemente el ácido araquidónico y/o ácido
 eicosapentanoico. Preferiblemente se aíslan los ácidos ω -6- y/o los ácidos grasos ω -3 de la planta en la forma de
 sus ácidos grasos libres, sus lípidos o aceites. La purificación se puede hacer mediante métodos convencionales tal
 como exprimir y extraer de las plantas u otros métodos en lugar de extracción tal como destilación, cristalización a
 15 bajas temperaturas, cromatografía o una combinación de dichos métodos. Ventajosamente las plantas se muelen,
 se calientan y/o se vaporizan antes del procedimiento de exprimido y extracción. Se utilizan como solventes para los
 solventes de extracción tal como hexano u otros solventes que tienen un comportamiento de extracción similar. Los
 aceites aislados se purifican adicionalmente mediante acidificación con por ejemplo ácido fosfórico. Los ácidos
 grasos libres se producen de dichos aceites o lípidos mediante hidrólisis. Se utiliza carbón o tierra diatomácea para
 retirar los tintes del fluido. En otra realización preferida del proceso de la invención el éster alquilo de los ácidos
 20 grasos se produce de los aceites y lípidos mediante transesterificación con una enzima con química convencional.
 Un método preferido es la producción del éster alquilo en la presencia de alcoholatos de los alcoholes inferiores
 correspondientes (alcoholes C1 a C10 tal como metanol, etanol, propanol, butanol, hexanol etc.) tal como
 metanolato o etanolato. Por lo tanto como el experto conoce el alcohol en la presencia de una cantidad catalítica de
 una base tal como NaOH o KOH se agrega a los aceites o lípidos.

20 En una forma preferid del proceso de la invención los lípidos se pueden obtener en la forma usual después que se
 han cultivado las plantas. Para este fin, los organismos primero se cosechan y luego se apartan, o se pueden utilizar
 directamente. En el caso de las células de planta, el tejido de planta o los órganos de la planta, "cultivar" se entiende
 que significa, por ejemplo, el cultivo sobre o en un medio de nutrientes, o de la planta intacta sobre o en un sustrato,
 por ejemplo en un cultivo hidropónico, compost para macetas o en tierra arable. Es ventajoso extraer los lípidos con
 25 solventes adecuados tales como solventes apolares, por ejemplo hexano, o solventes polares, por ejemplo etanol,
 isopropanol, o mezclas tal como hexano/isopropanol, fenol/cloroformo/alcohol isoamilo, a temperaturas entre 0° C y
 80° C, preferiblemente entre 20° C y 50° C. Como una regla, la biomasa se extrae con un exceso de solvente, por
 ejemplo con un exceso de solvente para la biomasa de 1:4. El solvente se retira posteriormente, por ejemplo
 mediante destilación. La extracción se puede llevar a cabo con CO₂ supercrítico. Después de la extracción, se puede
 30 retirar el resto de la biomasa, por ejemplo, mediante filtración. Los métodos estándar para la extracción de los ácidos
 grasos de plantas y microorganismos se describen en Bligh et al. (Can. J. Biochem. Physiol. 37, 1959: 911-917) o
 Vick et al. (Plant Physiol. 69, 1982: 1103-1108).

El aceite crudo así obtenido luego se puede purificar adicionalmente, por ejemplo al retirar la turbidez al agregar
 35 solventes polares tal como acetona o solventes apolares tales como cloroformo, seguido por filtración o
 centrifugación. También es posible la purificación adicional por medio de columnas u otras técnicas.

Para obtener los ácidos grasos libres de los triglicéridos, los últimos se hidrolizan en forma habitual, por ejemplo
 utilizando NaOH o KOH.

En el proceso de la invención se producen aceites, lípidos y/o ácidos grasos libres o fracciones de los mismos.
 Dichos productos se pueden utilizar para la producción de productos alimenticios y comidas, cosméticos o
 40 farmacéuticos.

Los aceites, lípidos, LCPUFA o composiciones de ácidos grasos producidas de acuerdo con el proceso de la
 invención se pueden utilizar en la forma con la que el experto está familiarizado para mezcla con otros aceites,
 lípidos, ácidos grasos o mezclas de ácido graso de origen animal, tal como, por ejemplo, aceites de pescado y/o
 45 aceites microbianos tales como de *Mortierella* o *Cryptocodium*. Estos aceites, lípidos, ácidos grasos o mezclas de
 ácidos grasos, que se componen de constituyentes vegetales, microbianos y/o animales, también se pueden utilizar
 para la preparación de alimentos, productos alimenticios, cosméticos o farmacéuticos.

El término "aceite", "lípidos" o "grasa" se entiende que significa una mezcla de ácido graso que comprende ácidos
 grasos insaturados, saturados, preferiblemente esterificados. El aceite, lípidos, grasa, ácido graso y/o composición de
 50 ácido graso es preferiblemente alto en ácidos grasos poliinsaturados (PUFA y/o LCPUFA) libres y/o,
 ventajosamente, esterificados, en particular ácido oleico, ácido linoleico, ácido α -linolénico, ácido araquidónico y/o
 ácido eicosatetraenoico.

Las plantas transgénicas que comprenden los LCPUFA sintetizados en el proceso de acuerdo con la invención
 también se pueden comercializar ventajosamente directamente sin existir ninguna necesidad para los aceites, lípidos
 o ácidos grasos sintetizados para ser aislados.

55 Sin embargo, los LCPUFA producidos en el proceso de acuerdo con la invención también se pueden aislar de las
 plantas como se describió anteriormente, en la forma de sus aceites, grasas, lípidos y/o ácidos grasos libres. Los
 ácidos grasos poliinsaturados producidos por este proceso se pueden obtener al cosechar el cultivo en el que
 crecen, o del campo. Esto se puede hacer mediante presión o extracción de las partes de la planta, preferiblemente

semillas de planta. En este contexto, se pueden obtener aceites, grasas, lípidos y/o ácidos grasos libres mediante lo que se conoce como prensado en frío o agitación en frío sin aplicar calor. Para permitir mayor facilidad de interrupción de las partes de la planta, específicamente las semillas, estas se trituran previamente, se vaporizan o se tuestan. Las semillas, que se han pretratado en esta forma se pueden presionar o extraer posteriormente con solventes tales como hexano caliente. El solvente se retira posteriormente. En el caso de los microorganismos, los últimos, después de cosecha, por ejemplo se extraen directamente sin etapas de procesamiento adicionales, después de interrupción, extraído por medio de diversos métodos con los que el experto está familiarizado. De esta forma, más de 96 % de los compuestos producidos en el proceso se puede aislar. Después de esto, los productos resultantes se procesan adicionalmente, es decir se refinan. En este proceso, primero se retiran las sustancias tales como mucílagos y la materia suspendida. Lo que se conoce como deslamado se puede efectuar enzimáticamente o, por ejemplo, físico-químicamente mediante la adición del ácido tal como ácido fosfórico. Después de estos, se retiran los ácidos grasos libres mediante tratamiento con una base, por ejemplo solución de hidróxido de sodio. El producto resultante se lava vigorosamente con agua para retirar el alcalino restante en el producto y luego se seca. Para retirar el pigmento restante en el producto, los productos se someten a blanqueamiento, por ejemplo utilizando tierra de relleno o carbón activo. Para el fin, el producto se desodoriza, por ejemplo utilizando vapor.

El sitio de biosíntesis preferido de los ácidos grasos, aceites, lípidos o grasas en las plantas que se utilizan ventajosamente es, por ejemplo, en general la semilla o capas celulares de la semilla, de tal manera que la expresión específica de semilla de los ácidos nucleicos utilizados en el proceso se hace codificante.

Sin embargo, es obvio que la biosíntesis de los ácidos grasos, aceites o lípidos no necesitan estar limitados por el tejido de semilla, pero también tiene lugar en una forma específica de tejido en todas las otras partes de la planta, por ejemplo en células epidérmicas o en los tubérculos.

En principio, los LCPUFA producidos por el proceso de acuerdo con la invención en los organismos utilizados en el proceso se pueden aumentar en dos formas diferentes. Ventajosamente, se puede agrandar el grupo de ácidos grasos poliinsaturados libres y/o el contenido de ácidos grasos poliinsaturados esterificados producidos por medio del proceso. Ventajosamente, se agranda el grupo de ácidos grasos poliinsaturados esterificados en las plantas transgénicas mediante el proceso de acuerdo con la invención.

En principio todos los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos con actividad Δ -8-desaturasa, Δ -9-elongasa y/o Δ -5-desaturasa se pueden utilizar en el proceso de la invención. Preferiblemente las secuencias de ácidos nucleicos se pueden aislar por ejemplo del microorganismo o plantas tal como hongos como *Mortierella*, algas como *Euglena*, *Cryptocodium* o *Isochrysis*, diátomos como *Phaeodactylum*, protozoarios como amebas tal como *Acanthamoeba* o *Perkinsus* o musgos como *Physcomitrella* o *Ceratodon*, pero también en animales diferentes a los humanos tal como *Caenorhabditis* son posibles como fuente para las secuencias de ácido nucleico. Las secuencias de ácidos nucleicos ventajosas de acuerdo con la invención que codifican los polipéptidos tienen una actividad Δ -8-desaturasa, Δ -9-elongasa y/o Δ -5-desaturasa que se origina de los microorganismos o plantas, ventajosamente *Phaeodactylum tricornutum*, *Ceratodon purpureus*, *Physcomitrella patens*, *Euglena gracilis*, *Acanthamoeba castellanii*, *Perkinsus marinus* o *Isochrysis galbana*. Así, la coexpresión de Δ -12-desaturasa específico de C18 y Δ -15-desaturasa, Δ -9-elongasa específica C18, una Δ -8-desaturasa específica C20 y una Δ -5-desaturasa específica C20 conduce a la formación de ácido araquidónico (C20:6n-4, Δ 5, 8, 11, 14) y/o ácido eicosapentanoico (C20:3n-5, Δ 5, 8, 11, 14, 17). Son más preferidas las secuencias mencionadas en el protocolo de secuencia.

En otra realización la invención se relaciona adicionalmente con secuencias aisladas de ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos con actividad Δ -12-desaturasa y Δ -15-desaturasa.

En una realización la invención se relaciona con una secuencia de ácidos nucleicos aislada que codifica un polipéptido que tiene una actividad Δ -12-desaturasa y Δ -15-desaturasa seleccionada del grupo que consiste de

a) una secuencia de ácidos nucleicos descrita en la SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 21;

b) una secuencia de ácidos nucleicos, que, como resultado de la degeneración del código genético, se puede derivar de un secuencia de polipéptido como se describe en la SEQ ID NO: 20 o SEQ ID NO: 22;

c) derivados de la secuencia de ácidos nucleicos descrita en la SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 21 que codifican los polipéptidos tienen por lo menos 70 % de homología con la secuencia como se describe en la SEQ ID NO: 20 o SEQ ID NO: 22 y cuyos polipéptidos tienen actividad Δ -12-desaturasa y Δ -15-desaturasa.

Esta Δ -12-desaturasa y Δ -15-desaturasa de la invención son capaces de desaturar los ácidos grasos C16 que tienen por lo menos un enlace doble en la cadena de ácido graso y/o ácidos grasos C18 que tienen por lo menos un enlace doble en la cadena de ácido graso. Preferiblemente los ácidos grasos C16- y/o C18 tienen solo un enlace doble en la cadena de ácido graso se desaturan. Esta actividad conduce a un aumento en el flujo de los ácidos grasos precursores tal como los ácidos grasos C18 hacia los ácidos grasos C18 que tiene más de un enlace doble en la cadena de ácido graso tal como ácido linoleico y/o linoléico. Los ácidos grasos C18 son más preferidos en la reacción que los ácidos grasos C16. Los ácidos grasos C18 se prefieren más del doble.

Se describe adicionalmente una secuencia de ácidos nucleicos aislada que codifica un polipéptido que tiene una actividad de Δ -12-desaturasas y Δ -15-desaturasa seleccionada del grupo que consiste de

a) una secuencia de ácidos nucleicos descrita en la SEQ ID NO: 23;

5 b) una secuencia de ácidos nucleicos, que, como resultado de la degeneración del código genético, se puede derivar de una secuencia de polipéptido como se describe en la SEQ ID NO: 24;

c) derivados de la secuencia de ácidos nucleicos descrita en la SEQ ID NO: 22 que codifican los polipéptidos tienen por lo menos 70% de homología con la secuencia como se describe en la SEQ ID NO: 24 y cuyos polipéptidos tienen actividad Δ -12-desaturasa y Δ -15-desaturasa.

10 Se describe adicionalmente una secuencia de ácidos nucleicos aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una Δ - 9-elongasa seleccionada del grupo que consiste de

a) una secuencia de ácidos nucleicos descrita en la SEQ ID NO: 11;

b) una secuencia de ácidos nucleicos, que, como resultado de la degeneración del código genético, se puede derivar de un secuencia de polipéptido como se describe en la SEQ ID NO: 12;

15 c) derivados de la secuencia de ácidos nucleicos descrita en la SEQ ID NO: 11 que codifican los polipéptidos tienen por lo menos 70 % de homología con la secuencia como se describe en la SEQ ID NO: 12 y cuyos polipéptidos tienen actividad Δ -9-elongasa.

Se describe adicionalmente una secuencia de ácidos nucleicos aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una Δ - 8-desaturasa seleccionada del grupo que consiste de

a) una secuencia de ácidos nucleicos descrita en la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 7;

20 b) una secuencia de ácidos nucleicos, que, como resultado de la degeneración del código genético, se puede derivar de un secuencia de polipéptido como se describe en la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 8;

c) derivados de la secuencia de ácidos nucleicos descrita en la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 7 que codifican los polipéptidos tienen por lo menos 70 % de homología con la secuencia como se describe en la SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 8 y cuyos polipéptidos tienen actividad Δ -8-desaturasa.

25 Se describe adicionalmente una secuencia de ácidos nucleicos aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una Δ - 5-desaturasa seleccionada del grupo que consiste de

a) una secuencia de ácidos nucleicos descrita en la SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 17;

b) una secuencia de ácidos nucleicos, que, como resultado de la degeneración del código genético, se puede derivar de un secuencia de polipéptido como se describe en la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 18;

30 c) derivados de la secuencia de ácidos nucleicos descrita en la SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 17 que codifican los polipéptidos tienen por lo menos 70 % de homología con la secuencia como se describe en la SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 18 y cuyos polipéptidos tienen actividad Δ -5-desaturasa.

35 Derivados de las secuencias de acuerdo con la invención significa, por ejemplo, homólogos funcionales de los polipéptidos o enzimas codificadas por la SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 21 que exhiben la misma dicha actividad enzimática. Esta actividad enzimática específica permite ventajosamente la síntesis de los LCPUFA de la ruta ω -6-y/o ω -3 de la cadena de síntesis de ácido graso tal como ARA y/o EPA. Las secuencias que codifican dichas enzimas que exhiben actividad Δ -12-desaturasa y Δ -15-desaturasa.

40 La enzima de acuerdo con la invención, Δ -12-desaturasas y Δ -15-desaturasa, ventajosamente introduce un enlace doble en residuos de ácidos grasos de glicerolípidos, ácidos grasos libres o ácidos grasos acil-CoA en la posición C₁₂-C₁₃ y C₁₅-C₁₆ de la cadena de ácido graso (ver SEQ ID NO: 19 o 21).

45 Las moléculas de ácido nucleico de la invención, por ejemplo una molécula de ácido con una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 21 o de una parte de la misma se puede aislar utilizando técnicas estándar de biología molecular y la información de secuencia proporcionada aquí. También, por ejemplo una secuencia homóloga o homóloga, se pueden identificar las regiones de secuencia conservadas en el ADN o el nivel de aminoácido con la ayuda de algoritmos comparativos. Estos se pueden utilizar como técnicas de sonda de hibridación e hibridación estándar (tales como, por ejemplo, aquellas descritas en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) para aislar las secuencias de ácidos nucleicos adicionales que se pueden utilizar en el proceso. Más aún, una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia completa de la SEQ ID NO: 19 o 50 SEQ ID NO: 21 o una parte de la misma se puede aislar mediante la reacción de la cadena polimerasa, en donde los cebadores de olinucleótido que se utilizan sobre la base de esta secuencia o partes de la misma (por ejemplo una

molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia completa o parte de la misma se puede aislar mediante la reacción de cadena polimerasa utilizando cebadores de oligonucleótido que se han generado con base en esta misma secuencia). Por ejemplo, se puede aislar el mRNA de las células (por ejemplo por medio del método de extracción de tiocianato de guanidinio de Chirgwin et al. (1979) *Biochemistry* 18:5294-5299) y cADN por medio de transcriptasa inversa (por ejemplo transcriptasa inversa Moloney MLV, disponible de Gibco/BRL, Bethesda, MD, o transcriptasa inversa AMV, disponible de Seikagaku America, Inc., St. Petersburg, FL). Los cebadores de oligonucleótido sintéticos para la amplificación por medio de la reacción de cadena de polimerasa se puede generar con base en una de las secuencias mostradas en la SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 21 o con la ayuda de las secuencias de aminoácido detalladas en la SEQ ID NO: 20 o SEQ ID NO: 22. Un ácido nucleico de acuerdo con la invención se puede amplificar mediante técnicas de amplificación PCR estándar utilizando cADN o, alternativamente, ADN genómico como la plantilla y cebadores de oligonucleótido adecuados. De esta manera, el ácido nucleico amplificado se puede clonar en un vector adecuado y caracterizar por medio de análisis de secuencia de ADN. Los oligonucleótidos, que corresponden a una secuencia de nucleótidos desaturada se puede generar mediante métodos sintéticos estándar, por ejemplo utilizando un sintetizador de ADN automático.

Los homólogos de las secuencias de ácidos nucleicos Δ -12-desaturasa y Δ -15-desaturasa con la secuencia SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 21 significa, por ejemplo, variantes alélicas con por lo menos aproximadamente 50 o 60 %, preferiblemente por lo menos aproximadamente 60 o 70 %, más preferiblemente por lo menos aproximadamente 70 o 80 %, 90% o 95% y aún más preferiblemente por lo menos aproximadamente 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93%, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99% o más identidad u homología con una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 21 o sus homólogos, derivados o análogos o partes de los mismos. Adicionalmente, las moléculas de ácidos nucleicos aislados de una secuencia de nucleótidos que hibrida con una de las secuencias de nucleótidos mostradas en la SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 21 o con una parte de las mismas, por ejemplo hibridan bajo condiciones exigentes. Una parte de la misma se entiende que significa, de acuerdo con la invención, que por lo menos 25 pares base (= bp), 50 bp, 75 bp, 100 bp, 125 bp o 150 bp, preferiblemente por lo menos 175 bp, 200 bp, 225 bp, 250 bp, 275 bp o 300 bp, especialmente preferiblemente 350 bp, 400 bp, 450 bp, 500 bp o más pares base se utilizan para la hibridación. También es posible y ventajoso utilizar la secuencia completa. Las variantes alélicas comprenden en particular variantes funcionales que se pueden obtener mediante eliminación, inserción o sustitución de los nucleótidos de/para la secuencia detallada en la SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 21, se pretende, sin embargo, que la actividad enzimática de las proteínas resultantes que se sintetizan se retiene ventajosamente para la inserción de uno o más genes. Las proteínas que retienen la actividad enzimática de la Δ -12-desaturasa y Δ -15-desaturasa, es decir cuya actividad no se reduce esencialmente, significa proteínas con por lo menos 10 %, preferiblemente 20 %, especialmente preferiblemente 30 %, muy especialmente preferiblemente 40 % de la actividad enzimática original en comparación con la proteína codificada por la SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 21. La homología se calcula sobre la región de secuencia de aminoácidos o ácido nucleico completa. El experto tiene disponible una serie de programas que se basan en diferentes algoritmos para la comparación de diversas secuencias. Aquí, los algoritmos de Needleman y Wunsch o Smith y Waterman dan resultados particularmente confiables. El programa PileUp (*J. Mol. Evolution.*, 25, 351-360, 1987, Higgins et al., *CABIOS*, 5 1989: 151-153) o los programas Gap y BestFit [Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48; 443-453 (1970) y Smith y Waterman (*Adv. Appl. Math.* 2; 482-489 (1981))], que son parte del paquete de software GCG [Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711 (1991)], se utilizan para la alineación de secuencia. Los valores de homología de secuencia que se indicaron anteriormente como un porcentaje se determinan sobre la región de secuencia completa utilizando el programa GAP y las siguientes configuraciones: Peso Espacio: 50, Peso Longitud: 3, Emparejamiento Promedio: 10.000 y Emparejamiento Incorrecto Promedio: 0.000. A menos que se especifique otra cosa, estas configuraciones siempre se utilizan como configuraciones estándar para las alineaciones de secuencia.

Los homólogos de la SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 21 significa por ejemplo también homólogos bacterianos, fúngicos y de planta, secuencias truncadas, ADN o ARN de hebra sencilla de la secuencia de ADN codificante o no codificante.

Los homólogos de la SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 21 también significa derivados tales como, por ejemplo, variantes promotoras. Los promotores en la dirección 5' de las secuencias de nucleótidos detalladas se pueden modificar mediante uno o más intercambios de nucleótido, mediante inserciones y/o eliminaciones sin la funcionalidad o actividad de los promotores se afecta adversamente, sin embargo. Es adicionalmente posible que la modificación de la secuencia promotora mejore su actividad o que se reemplace completamente por más promotores activos, que incluyen aquellos de organismos heterólogos.

En una realización adicional, los derivados de la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención representados en la SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 21 codifican las proteínas con por lo menos 40 %, ventajosamente aproximadamente 50 o 60 %, ventajosamente por lo menos aproximadamente 60 o 70% y más preferiblemente por lo menos aproximadamente 70 o 80 %, 80 a 90 %, 90 a 95% y más preferiblemente por lo menos aproximadamente 96 %, 97 %, 98 %, 99% o más homología (= identidad) con una secuencia de aminoácidos completa de la SEQ ID NO: 20 o SEQ ID NO: 22. La homología se calcula sobre la región de secuencia de aminoácidos o ácido nucleico completa. El programa PileUp (*J. Mol. Evolution.*, 25, 351-360, 1987, Higgins et al., *CABIOS*, 5 1989: 151-153) o los programas Gap y BestFit [Needleman and Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48; 443-453 (1970) y Smith and Waterman (*Adv. Appl. Math.* 2; 482-489 (1981))], que son parte del paquete de software GCG [Genetics

Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711 (1991)], se utilizan para la alineación de la secuencia. Los valores de homología de secuencia que se indicaron anteriormente como un porcentaje se determinan sobre la región de secuencia completa utilizando el programa BestFit y las siguientes configuraciones: Peso Espacio: 50, Peso Longitud: 3, Emparejamiento Promedio: 10.000 y Emparejamiento Incorrecto Promedio: 0.000. A menos que se especifique otra cosa, estas configuraciones siempre se utilizan como configuraciones estándar para las alineaciones de secuencia.

Más aún, la invención comprende moléculas de ácido nucleico que difieren de una de las secuencias de nucleótidos mostradas en la SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 21 (y partes de las mismas) propio a la degeneración del código genético y que así codifica la mismas Δ -12-desaturasa y Δ -15-desaturasa como aquellas codificadas por las secuencias de nucleótidos mostradas en la SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 21.

Además a las Δ -12-desaturasa y Δ -15-desaturasa mostradas en la SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 21, el experto reconocerá que los polimorfismos de la secuencia de ADN que conducen a cambios en las secuencias de aminoácido de las Δ -12-desaturasa y Δ -15-desaturasa pueden existir dentro de una población. Estos polimorfismos genéticos en el gen Δ -12-desaturasa y Δ -15-desaturasa pueden existir entre los individuos dentro de una población propio a la variación natural. Estas variantes naturales usualmente traen aproximadamente la varianza de 1 a 5% en la secuencia de nucleótidos del gen Δ -12-desaturasa y Δ -15-desaturasa. Cada y cada uno de estas variaciones de nucleótido y que resulta en polimorfismos de aminoácido en las Δ -12-desaturasa y Δ -15-desaturasa que son el resultado de la variación natural y no modifican la actividad funcional se abarcan por la invención.

Las secuencias de ácidos nucleicos de acuerdo con la invención (para los propósitos de la solicitud el singular abarca el plural y vice versa) o se pueden utilizar ventajosamente fragmentos de los mismos para aislar otras secuencias genómicas por medio de detección de homología.

Se pueden aislar los dichos derivados, por ejemplo, de otros organismos, organismos eucarióticos tales como plantas, especialmente musgos, algas, dinoflagelados, protozoarios u hongos.

Las variantes alélicas incluyen en particular variantes funcionales que se pueden obtener mediante eliminación, inserción o sustitución de nucleótidos en las secuencias descritas en la SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 21 la actividad enzimática de las proteína sintetizadas derivadas que se retienen.

Partiendo de la secuencia de ADN descrita en la SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 21 o partes de dichas secuencias tales secuencias de ADN se pueden aislar utilizando, por ejemplo, métodos de hibridación normal o la técnica PCR de otros eucariotes tal como aquellos identificados anteriormente por ejemplo. Estas secuencias de ADN hibridan bajo condiciones estándar con las dichas secuencias. Para uso la hibridación se hace ventajosamente de oligonucleótidos cortos de las regiones conservadas de una longitud promedio de aproximadamente 15 a 70 bp, preferiblemente de aproximadamente 17 a 60 bp, más preferiblemente de aproximadamente 19 a 50 bp, más preferiblemente de aproximadamente 20 a 40 bp, por ejemplo, que se puede determinar mediante comparaciones con otros genes desaturasa o elongasa en la forma conocida por aquellos expertos en la técnica. Las secuencias de caja de histidina se emplean ventajosamente. Sin embargo, los fragmentos largos de los ácido nucleicos de acuerdo con la invención o las secuencias completas también se pueden utilizar para hibridación. Estas condiciones estándar varían dependiendo del ácido nucleico empleado: oligonucleótido, fragmento más largo o secuencia completa, o dependiendo del tipo de ácido nucleico, ADN o ARN, se utiliza para hibridación. Así, por ejemplo, las temperaturas de fusión de los híbridos de ADN:ADN son aproximadamente 10° C menores de aquellos de los híbridos de ADN:ARN de la misma longitud.

Condiciones estándar significa, por ejemplo, dependiendo del ácido nucleico en cuestión temperaturas entre 42° C y 58° C en una solución reguladora acuosa que tiene una concentración de entre 0.1 y 5 x SSC (1 X SSC = 0.15 M NaCl, 15 mM citrato de sodio, pH 7.2) o adicionalmente en la presencia de 50 % de formamida, tal como por vía de ejemplo 42° C en 5 x SSC, 50 % de formamida. Las condiciones de hibridación para los híbridos de ADN:ADN son ventajosamente 0.1 x SSC y las temperaturas entre aproximadamente 20° C y 45° C, preferiblemente entre aproximadamente 30° C y 45° C. Para los híbridos de ADN:ARN las condiciones de hibridación son ventajosamente 0.1 x SSC y las temperaturas entre aproximadamente 30° C y 55° C. preferiblemente entre aproximadamente 45° C y 55° C. Estas temperaturas especificadas para hibridación son valores de temperatura de fusión calculados por vía de ejemplo para un ácido nucleico que tiene una longitud de aproximadamente 100 nucleótidos y un contenido G + C de 50 % en la ausencia de formamida. Las condiciones experimentales para hibridación de ADN se describen en textos de genética relevantes tales como por vía de ejemplo Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, y se pueden calcular por las fórmulas conocidas por aquellos expertos en la técnica, por ejemplo como una función de la longitud de los ácidos nucleicos, la naturaleza de los híbridos o el contenido G + C. Aquellos expertos en la técnica pueden recurrir a los siguientes textos para información adicional sobre hibridación: Ausubel et al. (eds), 1985, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York; Hames and Higgins (eds), 1985, Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (ed), 1991, Essential Molecular Biology: A Practical Approach, IRL Press at Oxford University Press, Oxford.

Adicionalmente, derivados significa homólogos de las secuencias SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 21, por ejemplo homólogos eucarióticos, secuencias truncadas, ADN de hebra sencilla de la secuencia de ADN codificante y no codificante o ARN de la secuencia de ADN codificante y no codificante.

5 Adicionalmente, homólogos de las secuencias SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 21 significa derivados tal como por vía de ejemplo variantes promotoras. Estas variantes se pueden modificar por uno o más intercambios de nucleótido, mediante inserción y/o eliminación sin, sin embargo, afectar adversamente la funcionalidad o la eficiencia de los promotores. Adicionalmente, los promotores pueden tener su eficiencia aumentada al alterar la secuencia o se pueden reemplazar completamente por promotores más efectivos aún de organismos externos.

10 Derivados también significan ventajosamente aquella secuencia de nucleótidos que se ha alterado en la región -1 a -2000 adelante del codón de inicio de tal manera que la expresión de gen y/o la expresión de proteína se modifica, preferiblemente aumenta. Adicionalmente, derivados también significa variantes, que se han modificado en el extremo 3'.

15 Las secuencias de ácidos nucleicos de acuerdo con la invención que codifican una Δ -12-desaturasa y Δ -15-desaturasa se pueden producir mediante síntesis o se pueden obtener en forma natural o contener una mezcla de componentes de ADN naturales y sintéticos así como también consisten de diversos segmentos de gen Δ -12-desaturasas y Δ -15-desaturasa heterólogos de diferentes organismos. En general, las secuencias de nucleótidos sintéticas se producen con codones, que se prefieren por los organismos anfitriones correspondientes, plantas por ejemplo.

20 Esto resulta usualmente en la expresión óptima del gen heterólogo. Estos codones preferidos por las plantas se pueden determinar de los codones que tiene la frecuencia mayor de proteína, que se expresan en la mayor parte de especies de planta de interés. Un ejemplo que se relaciona con bacterium *Corynebacterium glutamicum* se proporciona en Wada et al. (1992) *Nucleic Acids Res.* 20:2111-2118). Tales experimentos se pueden llevar a cabo utilizando métodos estándar y se conocen por la persona experta en la técnica.

25 Las secuencias funcionalmente equivalentes que codifican el gen Δ -12-desaturasa y Δ -15-desaturasa son aquellas derivadas de la secuencia de acuerdo con la invención que describe diferentes secuencias de nucleótidos aún poseen las funciones deseadas, es decir la actividad enzimática y selectividad específica de las proteínas. Esto significa que tales secuencias funcionalmente equivalentes tienen una actividad biológica o enzimática, que es por lo menos 10 %, preferiblemente por lo menos 20 %, 30 %, 40% o 50% especialmente preferiblemente por lo menos 60 %, 70 %, 80% o 90% y muy especialmente por lo menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98% o 99% o
30 más de la actividad de las proteínas/enzimas codificadas por las secuencias de la invención. Así los equivalentes funcionales incluyen variantes que ocurren en forma natural de las secuencias descritas aquí así como también artificiales, por ejemplo las secuencias de nucleótidos artificiales adaptadas para el uso de codón de una planta que se ha obtenido mediante síntesis química.

35 Adicionalmente, las secuencias de ADN artificiales adecuadamente, se proporcionan, como se describió anteriormente, estas median la propiedad deseada, por ejemplo un aumento en el contenido de enlaces dobles Δ -h12-, Δ -h15-, Δ -h8- y/o Δ -5- en ácidos grasos y una elongación de los ácidos grasos C18 que tienen un enlace doble Δ -9 en ácidos grasos, aceites o lípidos en plantas que producen semillas maduras preferiblemente en plantas de cultivo mediante sobreexpresión del gen Δ -12-desaturasa y Δ -15-desaturasa, Δ -9-elongasa, Δ -h8- desaturasa y/o Δ -5-desaturasa. Tales secuencias de ADN artificiales pueden exhibir actividad Δ -12-desaturasa y Δ -15-desaturasa, A-9-elongasa, Δ -h8-desaturasa y/o A-5-desaturasa, por ejemplo mediante retro-traducción de las proteínas construidas por medio de modelamiento molecular, o ser determinados mediante selección in vitro. Las técnicas posibles para le evolución in vitro de ADN para modificar o mejorar las secuencias de ADN se describen en Patten, P.A. et al., *Current Opinion in Biotechnology* 8, 724-733(1997) o in Moore, J.C. et al., *Journal of Molecular Biology* 272, 336-347 (1997). Particularmente son adecuadas las secuencias de ADN que se obtienen mediante retro-traducción de una
40 secuencia de polipéptido de acuerdo con el uso de codón específico para la planta anfitriona. Aquellos expertos en la técnica están familiarizados con los métodos de las genéticas de la planta pueden determinar fácilmente el uso de codón específico mediante análisis por ordenador de otros genes conocidos de la planta que se va a transformar.

Otras secuencias de ácidos nucleicos equivalentes adecuadas, que se pueden mencionar son secuencias que codifican las proteínas de fusión, un componente de la proteína de fusión es un polipéptido Δ -12-desaturasa y Δ -15-desaturasa, Δ -h8-desaturasa y/o Δ -5-desaturasa y/o un polipéptido Δ -9 elongasa o una parte funcionalmente equivalente del mismo. La segunda parte de la proteína de fusión puede ser, por ejemplo, otro polipéptido que tiene actividad enzimática o una secuencia de polipéptido antigénico por medio de lo cual es posible demostrar la expresión Δ -12-desaturasa y Δ -15-desaturasa, Δ -9-elongasa, Δ -h8- desaturasa y/o Δ -5-desaturasa (por ejemplo etiqueta myc o etiqueta his). Preferiblemente, sin embargo, esta es una secuencia de proteína reguladora, tal como
55 por vía de ejemplo una secuencia de señal para el retículo endoplásmico (= ER) que dirige la proteína Δ -12-desaturasa y Δ -15-desaturasa, Δ -h8-desaturasa y/o Δ -5-desaturasa y/o la proteína Δ -9-elongasa al punto deseado de acción, o las secuencias reguladoras que influyen la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con la invención, tal como promotores o terminadores. En otra realización preferida la segunda parte de la proteína de fusión es una secuencia de plastidio objetivo como se describe por Napier J.A. [Targeting of foreign proteins to the chloroplast, *Methods Mol. Biol.*, 49, 1995: 369 - 376]. Un vector preferido utilizado que comprende
60

dicha secuencia de plastidio objetivo se describe por Colin Lazarus [Guerineau F., Woolston S., Brooks L., Mullineaux P. "An expression cassette for targeting foreign proteins into chloroplast; Nucleic. Acids Res., Dec 9, 16 (23), 1988: 11380].

5 Ventajosamente, los genes Δ -12-desaturasa y Δ -15-desaturasa, Δ -9-elongasa, Δ -h8-desaturasa y/o Δ -5-desaturasa en el método de acuerdo con la invención se puede combinar con otros genes para la biosíntesis de ácido graso como se describió anteriormente. Ejemplos de tales genes son las acil transferasas, otras desaturasas o elongasas tal como Δ -4- desaturasas o ω -3- y/o ω -6- desaturasas específicas) y/o tal como Δ -5-elongasas para mencionar solo algunas. Para combinación de síntesis in vivo y especialmente in vitro con por ejemplo las reductasas B5 del citocromo NADH, que pueden tomar o liberar los equivalentes de reducción es ventajoso.

10 Las secuencias de aminoácido de acuerdo con la invención significan proteínas que contienen una secuencia de aminoácidos descrita en las secuencias SEQ ID NO: 20 o SEQ ID NO: 22 o una secuencia que se puede obtener de sustitución, inversión, inserción o eliminación de uno o más grupos de aminoácido (tales secuencias se derivan de SEQ ID NO: 20 o SEQ ID NO: 22), mientras que las actividades enzimáticas de las proteínas descritas en la SEQ ID NO: 20 o SEQ ID NO: 22 se retiene o no se reduce sustancialmente, es decir poseen la misma especificidad enzimática. "no sustancialmente reducido" o "la misma actividad enzimática" significa todas las enzimas que aún exhiben por lo menos 10 %, 20 %, 30 %, 40 % o 50 %, preferiblemente por lo menos 60 %, 70 %, 80 % o 90 % particularmente preferiblemente por lo menos 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99% o más, de la actividad enzimática de la enzima inicial obtenida del organismo de fuente tipo natural tal como organismos del género *Physcomitrella*, *Ceratodon*, *Borago*, *Thraustochytrium*, *Schizochytrium*, *Phytophthora*, *Mortierella*, *Caenorhabditis*, *Aleuritia*, *Muscariodides*, *Isochrysis*, *Phaeodactylum*, *Crypthecodinium*, *Acanthamoeba* o *Euglena*. Los organismos fuente preferidos son organismos tales como las especies *Euglena gracilis*, *Isochrysis galbana*, *Phaeodactylum tricorutum*, *Caenorhabditis elegans*, *Thraustochytrium*, *Phytophthora infestans*, *Ceratodon purpureus*, *Isochrysis galbana*, *Aleuritia farinosa*, *Muscariodides vialii*, *Mortierella alpina*, *Borago officinalis* o *Physcomitrella patens*. Para la estimación de una actividad enzimática, que es "no sustancialmente reducida" o que tiene la "misma actividad enzimática" la actividad enzimática de las secuencias derivadas se determina y se compara con las actividades enzimáticas tipo natural. Al hacer esto, por ejemplo, ciertos aminoácidos se pueden reemplazar por otros que tienen propiedades fisicoquímicas similares (llenado de espacio, basicidad, hidrofobicidad, etc.). Por ejemplo, los residuos arginina se intercambian por los residuos lisina, los residuos valina para los residuos isoleucina o los residuos de ácido aspártico para los residuos de ácido glutámico. Sin embargo, uno o más aminoácidos también se pueden intercambiar en la secuencia, agregar o retirar, o una pluralidad de estas mediciones se puede combinar con otra.

Derivados también significa equivalentes funcionales, que en particular también contienen mutaciones naturales o artificiales de una secuencia originalmente aislada que codifica una Δ -12-desaturasa y Δ -15-desaturasa, a Δ -9-elongasa, a Δ -h8-desaturasa y/o a Δ -5-desaturasa, que continúa exhibiendo la función deseada, que es la actividad enzimática y la selectividad del sustrato del mismo no se reduce sustancialmente. Las mutaciones comprenden sustituciones, adiciones, eliminaciones, intercambios o inserciones de uno o más residuos de nucleótido. Así, por ejemplo, la presente invención también abarca aquellas secuencias de nucleótido, que se obtienen mediante modificación de la secuencia de nucleótidos Δ -12-desaturasa y Δ -15-desaturasa, la secuencia de nucleótidos Δ -8-desaturasa, la secuencia de nucleótidos Δ -5-desaturasa y/o la secuencia de nucleótidos Δ -9-elongasa utilizada en el proceso de la invención. El objetivo de tal modificación puede ser, por ejemplo, para unir adicionalmente la secuencia codificante contenida allí o también, por ejemplo, para insertar las interfaces de la enzima de restricción adicional.

Los equivalentes funcionales también incluyen aquellas variantes que funcionan mediante comparación como se describió anteriormente cuando el gen inicial o el fragmento de gen se debilita (= no reducido sustancialmente) o reforzado (= actividad de enzima mayor que la actividad de la enzima inicial, es decir la actividad es mayor de 100 %, preferiblemente mayor de 110 %, 120 %, 130 %, 140% o 150 %, particularmente preferiblemente mayor de 200% o más).

Al mismo tiempo la secuencia de ácidos nucleicos, por ejemplo, puede ser ventajosamente una secuencia de ADN o cADN. Las secuencias codificantes adecuadas para inserción en un casete de expresión de acuerdo con la invención incluyen por vía de ejemplo aquellas que codifican una Δ -12-desaturasa y Δ -15-desaturasa, una Δ -h8-desaturasa y/o una Δ -5-desaturasa con las secuencias descritas anteriormente y le dan al anfitrión la capacidad de sobreproducir los ácidos grasos, aceites o lípidos que tienen enlaces dobles en la posición Δ -12-, Δ -15-, Δ -8 y la posición Δ -5, esto es ventajoso cuando al mismo tiempo se producen ácidos grasos que tienen por lo menos cuatro enlaces dobles. Estas secuencias pueden ser de origen homólogo o heterólogo.

55 La construcción de gen (= construcción de ácido nucleico o fragmento o casete de expresión) de acuerdo con la invención significa las secuencias especificadas en la SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 21 que resulta del código genético y/o derivados de los mismos que se ligan funcionalmente con una o más señales de regulación para aumentar ventajosamente la expresión del gen y que controlan la expresión de la secuencia codificante en la célula anfitriona. Estas secuencias reguladoras deben permitir la expresión selectiva de los genes y la expresión de la proteína. Dependiendo de la planta anfitriona esto puede significar, por ejemplo, que el gen se expresa y/o se sobreexpresa solo después de inducción o que se expresa y/o se sobreexpresa inmediatamente. Ejemplos de estas

secuencias reguladoras son secuencias a las cuales se unen los inductores o represores y en esta forma regulan la expresión del ácido nucleico. Además de estas nuevas secuencias de regulación o en lugar de estas secuencias la regulación natural de estas secuencias adelante de los genes estructurales reales que aún pueden estar presentes y que se han modificado genéticamente opcionalmente de tal manera que la regulación natural se apaga y la expresión de los genes aumenta. Sin embargo, la construcción del gen también se puede construir más simplemente, es decir no se han insertado señales de regulación adicionales adelante de la secuencia de ácidos nucleicos o derivados de los mismos y el promotor natural con su regulación no se ha retirado. En lugar de que esta secuencia de regulación natural mute en tal forma que no sobreviene la regulación adicional y/o se intensifica la expresión del gen. Estos promotores modificados en la forma de secuencias en parte (= promotor que contiene partes de las secuencias de ácidos nucleicos de acuerdo con la invención) también se puede llevar por su propia cuenta antes del gen natural para aumentar la actividad. Adicionalmente, la construcción del gen también puede contener ventajosamente una o más secuencias así llamadas mejoradas unidas funcionalmente al promotor que permite la expresión mejorada de la secuencia de ácido nucleico. En el extremo 3' de las secuencias de ADN también se pueden insertar secuencias ventajosas adicionales, tal como elementos reguladores adicionales o terminadores. El gen de la SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 21 puede estar presente en una o más copias en la construcción del gen (= casete de expresión).

Como se describió anteriormente, las secuencias reguladoras o factores pueden influenciar positivamente preferiblemente y así aumentar la expresión del gen de los genes introducidos. Así, el refuerzo de los elementos reguladores ventajosamente en el nivel de transcripción se puede afectar al utilizar señales de transcripción potentes tales como promotores y/o mejoradores. Sin embargo, además también es posible el refuerzo de traducción, por ejemplo al mejorar la estabilidad del mRNA.

Los promotores adecuados en el casete de expresión son el principio todos promotores que pueden controlar la expresión de genes externos en microorganismos como protozoarios tales como amebas, ciliados, algas tal como algas verdes, marrón, rojas o azules tal como Euglena, bacterias tales como bacterias gram-positivas o gram-negativas, levaduras tales como Saccharomyces, Pichia o Schizosaccharomyces u hongos tales como Mortierella, Thraustochytrium o Schizochytrium o plantas tales como Aleuritia, ventajosamente en plantas u hongos. Tales microorganismos se utilizan de manera general para clonar los genes de la invención genes y otros genes posibles de la cadena de biosíntesis de ácido graso para la producción de ácidos grasos de acuerdo con el proceso de la invención. El uso se hace preferiblemente en particular de promotores de planta o promotores derivados de virus de planta. Las secuencias de regulación ventajosas para el método de acuerdo con la invención se encuentran por ejemplo en promotores tales como cos, tac, trp, tet, trp-tet, lpp, lac, lpp-lac, lacIq-, T7, T5, T3, gal, trc, ara, SP6, λ -PR o en promotores λ -PL que se emplean ventajosamente en bacterias gram-negativas. Se encuentran otras secuencias de regulación ventajosas, por ejemplo, en los promotores gram-positivos amy y SPO2, en los promotores de levadura o fúngicos ADC1, MF α , AC, P-60, CYC1, GAPDH, TEF, rp28, ADH o en los promotores de planta CaMV/35S [Franck et al., Cell 21(1980) 285-294], SSU, OCS, lib4, STLS1, B33, nos (= Promotor de Sintasa Nopalina) o en el promotor ubiquitina o faseolina. El casete de expresión también puede contener un promotor químicamente inducible por medio del cual la expresión del gen Δ -12- y Δ -15-, Δ -8- y/o Δ -5- desaturasa exógeno y/o el gen Δ -9-elongasa en el microorganismo y/o la planta se puede controlar ventajosamente en las plantas en un tiempo particular. Los promotores de planta particulares de este tipo son por vía de ejemplo el promotor PRP1 [Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993), 361-366], un promotor inducible por bencenosulfonamida (EP 388 186), un promotor inducible por tetraciclina [Gatz et al., (1992) Plant J. 2, 397 - 404], un promotor inducible por ácido salicílico (WO 95/19443), un promotor inducible por ácido abscísico (EP 335 528) y un promotor inducible por etanol o ciclohexanona (WO93/21334). Otros ejemplos de promotores de planta, que se pueden utilizar ventajosamente son el promotor de FBPassa citosílico de papa, el promotor ST-LSI de papa (Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989) 2445-245), el promotor de fosforibosil pirofosfato amidotransferasa de Glicina max (ver también el número de acceso del banco de gen U87999) o un promotor específico nodieno como se describe en la EP 249 676. Particularmente son ventajosos aquellos promotores de planta, que aseguran la expresión en los tejidos o partes de planta /órganos en los que la biosíntesis de ácido graso o las etapas precursoras del mismo ocurre, en el endospermo o en el desarrollo del embrión por ejemplo. Particularmente es valioso citar los promotores ventajosos, que aseguran la expresión específica de semilla tal como por vía de ejemplo el promotor USP o derivaos de los mismos, el promotor LEB4, el promotor faseolina o el promotor napina. El promotor USP particularmente ventajoso citado de acuerdo con la invención o sus derivados median la expresión de gen muy temprano en el desarrollo de la semilla [Baeumlein et al., Mol Gen Genet, 1991, 225 (3): 459-67]. Otros promotores específicos de semilla ventajosos que se pueden utilizar para plantas monocotiledóneas o dicotiledóneas son los promotores adecuados para las dicotiledóneas tal como promotores del gen napina, como los citados por vía de ejemplo, de aceite de semilla de colza (patente US 5,608,152), el promotor oleosina de Arabidopsis (patente WO 98/45461), el promotor faseolina de Phaseolus vulgaris (patente US 5,504,200), el promotor Bce4 de Brassica (WO 91/13980) o el promotor leguminoso B4 (LeB4, Baeumlein et al., Plant J., 2, 2, 1992: 233 - 239) o los promotores adecuados para las monocotiledóneas tal como los promotores del gen lpt2 o lpt1 en cebada (patentes WO 95/15389 y WO95/23230) o los promotores del gen hordeína de cebada, el gen de glutelina de arroz, el gen oryzin de arroz, el gen prolamina de arroz, el gen gliadina de trigo, el gen de glutelina blanco, el gen zeína de maíz, el gen glutelina de avena, el gen kasirina de sorgo o el gen secalina de centeno que se describen en la patente WO99/16890.

Adicionalmente, particularmente se prefieren aquellos promotores, que aseguran la expresión en tejidos o partes de planta en los que, por ejemplo, la biosíntesis de los ácidos grasos, aceites y lípidos o toma lugar las etapas precursoras de los mismos. Particularmente digno de mención son los promotores, que aseguran la expresión específica de semilla. Valiosos de mencionar son el promotor del gen napina de aceite de semilla de colza (patente US 5,608,152), el promotor USP de Vicia faba (USP = proteína de semilla desconocida, Baeumlein et al., Mol Gen Genet, 1991, 225 (3): 459 - 67), el promotor del gen oleosina de Arabidopsis (patente WO98/45461), el promotor faseolina (patente US 5,504,200) o el promotor del gen legumina B4 (LeB4; Baeumlein et al., 1992, Plant Journal, 2 (2): 233-9). Otros promotores que se mencionan son aquellos del gen lpt2 o lpt1 de cebada (patente WO 95/15389 y WO 95/23230), que median la expresión específica de semilla en plantas monocotiledóneas. Otros promotores específicos de semilla ventajosos son promotores tales como los promotores de arroz, maíz o trigo descritos en la patente WO 99/16890 o Amy32b, Amy6-6 o aleuraina (patente US 5,677,474), Bce4 (colza, patente US 5,530,149), glicinina (soja, patente EP 571 741), carboxilasa piruvato fosfoenol (soja, patente JP 06/62870), ADR12-2 (soja, patente WO 98/08962), isocitratliasa (colza, patente US 5,689,040) o β -amilasa (cebada, patente EP 781 849).

Como se describió anteriormente, la construcción de expresión (= construcción de gen, construcción de ácido nucleico) pueden contener aún otros genes, que se introducen en el microorganismo o planta. Estos genes se pueden someter a regulación separada o someter a la misma región de regulación como el gen Δ -12- y Δ -15-desaturasa y/o el gen A-8- y/o Δ -5-desaturasa y/o el gen Δ -9-elongasa. Estos genes son por vía de ejemplo otros genes para biosíntesis, ventajosamente para la biosíntesis de ácido graso, que permite síntesis aumentada. Ejemplos que se pueden mencionar son los genes por ejemplo de la Δ -9-, Δ -4-desaturasa, Δ -5-elongasa, α -ketoacil reductasas, α -ketoacil sintasas, elongasas o las diversas hidroxilasas y acil-ACP tioesterasas. Los genes desaturasa y elongasa se utilizan ventajosamente en la construcción de ácido nucleico.

En principio todos los promotores naturales con sus secuencias de regulación se pueden utilizar como aquellos mencionados anteriormente para el casete de expresión de acuerdo con la invención y el método de acuerdo con la invención. Durante y antes de estos, los promotores sintéticos también se pueden utilizar ventajosamente.

En la preparación de una construcción de gen se pueden manipular diversos fragmentos de ADN con el fin de obtener una secuencia de nucleótidos, que se lee usualmente en la dirección correcta y se equipa con una trama de lectura correcta. Para conectar los fragmentos de ADN (= ácidos nucleicos de acuerdo con la invención) a otros adaptadores o ligadores se pueden unir a los fragmentos.

El promotor y las regiones terminadoras pueden proporcionar usualmente la dirección de transcripción con un ligador o poliligador que contiene uno o más puntos de restricción para la inserción de esta secuencia. De manera general, el ligador tiene 1 a 10, más de 1 a 8, preferiblemente 2 a 6, puntos de restricción. En general el tamaño del ligador entre la región reguladora es menos de 100 bp, frecuentemente menos de 60 bp, pero por lo menos 5 bp. El promotor puede ser natural u homólogo así como también externo o heterólogo para el organismo anfitrión, por ejemplo para la planta anfitriona. En la dirección de transcripción 5'-3' el casete de expresión contiene el promotor, una secuencia de ADN que codifica un gen Δ -12- y Δ -15-desaturasa, un gen Δ -8-desaturasa, un gen Δ -5-desaturasa y/o un gen Δ -9-elongasa y una región para la terminación de transcripción. Se pueden intercambiar diferentes regiones de terminación por otra en cualquier forma deseada.

Adicionalmente, se pueden emplear manipulaciones, que proporcionan interfaces de restricción adecuadas o que retiran el exceso de ADN o las interfaces de restricción. Mientras que se pueden utilizar las inserciones, eliminaciones o sustituciones, tales como transiciones y transversiones, entran en consideración, mutagenia in vitro, reparación de cebador, restricción o ligación. En manipulaciones adecuadas tal como restricción, masticadas o relleno de voladizos para extremos romos de extremos complementarios de los fragmentos se pueden proporcionar para la ligación.

Para una alta expresión ventajosa la adhesión de la señal de retención ER específica SEKDEL inter alia puede ser de importancia (Schouten, A. et al., Plant Mol. Biol. 30 (1996), 781-792). En esta forma el nivel de expresión promedio es triple o aún cuádruple. Otras señales de retención, que ocurren en forma natural en la planta y proteínas de animal ubicadas en el ER también se pueden emplear para la construcción del casete. En otra realización preferida se utiliza una secuencia de plastidios objetiva como se describe por Napier J.A. [Targeting of foreign proteins to the chloroplast, Methods Mol. Biol., 49, 1995: 369 - 376]. Un vector utilizado preferido que comprende dicha secuencia de plastidios objetiva se describe por Colin Lazarus [Guerineau F., Woolston S., Brooks L., Mullineaux P. "An expression cassette for targeting foreign proteins into chloroplast; Nucleic. Acids Res., Dec 9, 16 (23), 1988: 11380].

Las señales de poliadenilación preferida son señales de poliadenilación de planta, preferiblemente aquellas que corresponden sustancialmente a las señales de poliadenilación de T-ADN de Agrobacterium tumefaciens, en particular el gen 3 del T-ADN (sintasa octopina) del plásmido Ti pTiACH5 (Gielen et al., EMBOJ.3 (1984), 835 et seq.) o los equivalentes funcionales correspondientes.

Se produce una construcción del casete de expresión/gen mediante fusión de un promotor adecuado con una secuencia de ADN Δ -12- y Δ -15-desaturasa adecuada, una secuencia de ADN Δ -8- y/o Δ -5-desaturasa adecuada y/o una secuencia de ADN Δ -9-elongasa adecuada junto con una señal de poliadenilación mediante recombinación

común y técnicas de clonación como se describe, por ejemplo, en T. Maniatis, E.F. Fritsch y J. Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) así como también en T.J. Silhavy, M.L. Berman y L.W. Enquist, *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) y en Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987).

Las secuencias de ADN que codifican las secuencias de ácidos nucleicos utilizadas en el proceso de la invención tal como la Δ -12- y Δ -15-desaturasa de *Acanthamoeba castellanii*, Δ -8-desaturasa de *Euglena gracilis*, la Δ -9-elongasa de *Isochrysis galbana* y/o la Δ -5-desaturasa por ejemplo de *Thraustochytrium* u otros organismos tales como *Caenorhabditis elegans*, *Mortierella alpina*, *Borage officinalis* o *Physcomitrella patens* contiene todas las características de secuencia necesarias para alcanzar la ubicación correcta del sitio de biosíntesis de ácido graso, lípido o aceite. De acuerdo con lo anterior, no se necesitan secuencias objetivo adicionales per se. Sin embargo, puede ser deseable tal ubicación y ventajosa y por lo tanto se modifica o se refuerza artificialmente de tal manera que tales construcciones de fusión también son una realización ventajosa preferida de la invención.

Se prefieren particularmente las secuencias, que aseguran el objetivo en los plástidos. Bajo ciertas circunstancias en otros compartimientos (reportado en: Kermode, *Crit. Rev. Plant Sci.* 15, 4 (1996), 285-423) también puede ser deseable, por ejemplo en vacuolos, el mitocondrio, el retículo endoplásmico (ER), peroxisomas, estructuras de lípido o debido a la carencia de la retención de las secuencias operativas correspondientes en el compartimiento de origen, el citosol.

Ventajosamente, las secuencias de ácidos nucleicos de acuerdo con la invención o la construcción de gen junto con por lo menos un gen reportero se clonan en una construcción de gen, que se introduce en el organismo por medio de un vector o directamente en el genoma. Este gen reportero debe permitir la detección fácil por medio de un ensayo de crecimiento, de fluorescencia, químico, de bioluminiscencia o de resistencia o por medio de una medición fotométrica. Ejemplos de los genes reporteros que se pueden mencionar son genes de resistencia al antibiótico o al herbicida, genes de hidrolasa, genes de proteína fluorescente, genes de bioluminiscencia, genes metabólicos de azúcar o nucleótido o genes de biosíntesis tales como el gen *Ura3*, el gen *Ilv2*, el gen *luciferasa*, el gen β -galactosidasa, el gen *gfp*, el gen *fosfatasa 2-desoxiglucosa-6-fosfato*, el gen *h β -glucuronidasa*, el gen β -lactamasa, el gen *fosfotransferasa neomicina*, el gen *fosfotransferasa higromicina* o el gen *BASTA* (= de resistencia a glufosinato). Estos genes permiten fácilmente la medición y cuantificación de la actividad de transcripción y por lo tanto de la expresión de los genes. En esta forma se pueden identificar las posiciones de genoma que exhiben diferente productividad.

En una realización preferida una construcción de gen comprende la dirección 5', es decir en el extremo 5' de la secuencia codificante, un promotor y la dirección 3', es decir en el extremo 3', una señal de poliadenilación y opcionalmente otros elementos reguladores que se ligan en forma operativa a la secuencia codificante que interviene para la secuencia de ADN Δ -12- y Δ -15-desaturasa, Δ -8-desaturasa, Δ -9-elongasa y/o Δ -5-desaturasa. Un ligado operable significa la disposición secuencial del promotor, la secuencia codificante, el terminador y opcionalmente otros elementos reguladores de tal manera que cada uno de los elementos reguladores puede cumplir con su función en la expresión de la secuencia codificante en la forma debida. Las secuencias preferidas para ligado operable son secuencias objetivo para asegurar la localización subcelular en los plástidos. Sin embargo, las secuencias objetivo para asegurar la ubicación subcelular en el mitocondrio, en el retículo endoplásmico (= ER), en el núcleo, en los corpúsculos de aceite u otros compartimiento también se puede emplear así como también los promotores de traducción tal como la secuencia líder 5' en virus mosaico de tabaco (Gallie et al., *Nucl. Acids Res.* 15 (1987), 8693 -8711).

Una construcción del casete de expresión/gen, por ejemplo, puede contener un promotor constitutivo o un promotor específico de tejido (preferiblemente el promotor USP o *napina*) del gen que se va a expresar y la señal de retención ER. Para la señal de retención ER la secuencia de aminoácidos KDEL (lisina, ácido aspártico, ácido glutámico, leucina) o se emplea preferiblemente la secuencia de aminoácidos KKX (lisina-lisina-X-parada, en donde X significa entre sí el aminoácido conocido).

Para la expresión en un organismo anfitrión procariontico o eucariótico, por ejemplo un microorganismo tal como un hongo o una planta tal como un cultivo de aceite el casete de expresión se inserta ventajosamente dentro de un vector tal como por vía de ejemplo un plásmido, un fago u otro ADN que permite la expresión óptima de los genes en el organismo anfitrión. Ejemplos de plásmidos adecuados son: en la serie *E. coli* pLG338, pACYC184, pBR tal como por ejemplo pBR322, la serie pUC tal como pUC18 o pUC19, la serie M113mp, pKC30, pRep4, pHS1, pHS2, pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III113-B1, λ gt11 o pBdCl; en *Streptomyces* pIJ101, pIJ364, pIJ702 o pIJ361; en *Bacillus* pUB110, pC194 o pBD214; en *Corynebacterium* pSA77 o pAJ667; en hongos pALS1, pIL2 o pBB116; otros vectores fúngicos ventajosos se describen por Romanos, M.A. et al., [(1992) "Foreign gene expression in yeast: a review", *Yeast* 8: 423-488] y por van den Hondel, C.A.M.J.J. et al. [(1991) "Heterologous gene expression in filamentous fungi" así como también en *More Gene Manipulations in Fungi* [J.W. Bennet & L.L. Lasure, eds., pp. 396-428: Academic Press: San Diego] y en "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi" [van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J. (1991) in: *Applied Molecular Genetics of Fungi*, Peberdy, J.F. et al., eds., pp. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge]. Ejemplos de promotores de levadura ventajosos son 2mM, pAG-1, YEp6, YEp13 o pEMBLyE23. Ejemplos de promotores de algas o plantas son pLGV23, pGHlac+, pBIN19,

pAK2004, pVKH o pDH51 (ver Schmidt, R. and Willmitzer, L., 1988). Los vectores identificados anteriormente o derivados de los vectores identificados anteriormente son una selección pequeña de los plásmidos posibles. Los plásmidos adicionales son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica y se pueden encontrar, por ejemplo, en el libro Vectores de Clonación (Eds. Pouwels P.H. et al. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018). Los vectores de planta adecuados se describen *inter alia* en "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Ch. 6/7, pp. 71-119. Los vectores ventajosos se conocen como vectores lanzadera o vectores binarios que replican en *E. coli* y *Agrobacterium*.

Vectores significa con la excepción de los plásmidos todos los otros vectores conocidos por aquellos expertos en la técnica tal como por vía de ejemplo fagos, virus tal como SV40, CMV, baculovirus, adenovirus, transposones, elementos IS, plásmidos, fagémidos, cósmidos, ADN lineal o circular. Estos vectores se pueden replicar automáticamente en el organismo anfitrión o se replican cromosómicamente, se prefiere la replicación cromosómica.

En una realización adicional del vector la construcción del gen de acuerdo con la invención también se puede introducir ventajosamente en los organismos en la forma de un ADN lineal y se integra dentro del genoma del organismo anfitrión por vía de recombinación heteróloga u homóloga. Este ADN lineal se puede componer de un plásmido linearizado o solo del casete de expresión como vector o las secuencias de ácidos nucleicos de acuerdo con la invención.

En una realización ventajosa adicional la secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con la invención también se puede introducir en un organismo en sí mismo.

Si además de la secuencia de ácidos nucleicos de acuerdo con la invención los genes adicionales que se van a introducir dentro del organismo, junto con un gen reportero en un vector único o cada gen único con un gen reportero en el vector en cada caso se puede introducir dentro del organismo, mientras que se pueden introducir diferentes vectores simultáneamente o sucesivamente.

El vector contiene ventajosamente por lo menos una copia de las secuencias de ácidos nucleicos de acuerdo con la invención y/o el casete de expresión (= construcción de gen) de acuerdo con la invención.

Por vía de ejemplo el casete de expresión de la planta se puede instalar en el vector de transformación pRT ((a) Toepfer et al., 1993, *Methods Enzymol.*, 217: 66-78; (b) Toepfer et al. 1987, *Nucl. Acids. Res.* 15: 5890 ff.).

Alternativamente, un vector recombinante (= vector de expresión) también se puede transcribir y traducir *in vitro*, por ejemplo al utilizar el promotor T7 y la polimerasa de ARN T7.

Los vectores de expresión empleados en los procariotes hacen frecuentemente uso de sistemas inducibles con y sin proteínas de fusión o oligopéptidos de fusión, mientras que estas fusiones puede sobrevenir en la forma de terminal N y de terminal C o en otros dominios útiles de una proteína. Tales vectores de fusión tienen usualmente los siguientes propósitos: i.) para aumentar el índice de expresión de ARN; ii.) para aumentar el índice de síntesis de proteína alcanzable; iii.) para aumentar la solubilidad de la proteína; iv.) o para simplificar la purificación por medio de una secuencia de unión utilizable para cromatografía de afinidad. Los puntos de división proteolítica también se introducen frecuentemente por medio de las proteínas de fusión, que permiten la división de una porción de la proteína de fusión y purificación. Tales secuencias de reconocimiento para las proteasas se reconocen, por ejemplo el factor Xa, trombina y enteroquinasa.

Los vectores de expresión y de fusión ventajosos típicos son pGEX [Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B. y Johnson, K.S. (1988) *Gene* 67: 31-40], pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) y pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) que contienen glutatona S-transferasa (GST), proteína de unión a maltosa o proteína A.

Otros ejemplos de los vectores de expresión *E. coli* son pTrc [Amann et al., (1988) *Gene* 69:301-315] y vectores pET [Studier et al., *gen expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 60-89; Stratagene, Amsterdam, Países Bajos].

Otros vectores ventajosos para uso en levadura son pYepSec1 (Baldari, et al., (1987) *Embo J.* 6:229-234), pMFa (Kurjan y Herskowitz, (1982) *Cell* 30:933-943), pJRY88 (Schultz et al., (1987) *Gene* 54:113-123), y derivados pYES (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Los vectores para uso en hongos filamentosos se describen en: van den Hondel, C.A.M.J.J. & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi", in: *Applied Molecular Genetics of Fungi*, J.F. Peberdy, et al., eds., pp. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge.

Alternativamente, también se pueden utilizar ventajosamente vectores de expresión de células de insecto, por ejemplo para expresión en células Sf9. Estos son por ejemplo los vectores de las series pAc (Smith et al. (1983) *Mol. Cell Biol.* 3:2156-2165) y las series pVL (Lucklow y Summers (1989) *Virology* 170:31-39).

Adicionalmente, las células de planta o las células de algas se pueden utilizar ventajosamente para la expresión de gen. Ejemplos de vectores de expresión de planta se pueden encontrar en Becker, D., et al. (1992) "New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border", *Plant Mol. Biol.* 20: 1195-1197 o in Bevan, M.W. (1984) "Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation", *Nucl. Acid. Res.* 12: 8711-8721.

La planta anfitriona (= planta transgénica) contiene ventajosamente por lo menos una copia del ácido nucleico de acuerdo con la invención y/o de la construcción de gen de acuerdo con la invención.

La introducción de los ácido nucleicos de acuerdo con la invención, la construcción de gen o el vector en los organismos, las plantas por ejemplo, se pueden hacer en principio mediante todos los métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica. La introducción de las secuencias de ácidos nucleicos surge para plantas recombinantes o plantas transgénicas.

Para introducir los ácido nucleicos utilizados en el proceso, los últimos se amplifica y se ligan ventajosamente en la forma conocida. Preferiblemente, un procedimiento seguido por el protocolo para la polimerasa de ADN Pfu o sigue una mezcla de polimerasa de ADN Pfu/Taq. Los cebadores se seleccionan tomando en consideración la secuencia que se va a amplificar. Los cebadores se deben seleccionar ventajosamente en tal forma que el amplificado comprende la secuencia codogénica completa del codón de inicio al codón de parada. Después de la amplificación, el amplificado se analiza oportunamente. Por ejemplo, se puede llevar a cabo una separación electroforética de gel, que sigue mediante un análisis cuantitativo y cualitativo. Después de esto, el amplificado se puede purificar siguiendo un protocolo estándar (por ejemplo Qiagen). Una alícuota del amplificado purificado luego está disponible para la etapa de clonación posterior. Los vectores de clonación adecuados se mencionaron anteriormente y se conocen de manera general por el experto. Estos incluyen, en particular, los vectores que son capaces de replicación en sistemas microbianos, es decir principalmente vectores que aseguran la clonación eficiente en levaduras u hongos y que hacen posible la transformación estable de las plantas. Aquellas, que se pueden mencionar, de nuevo aquí en particular son diversos sistemas de vector binario y cointegrado, que son adecuados para la transformación mediada por T-ADN. Tales sistemas de vector, como una regla, se caracterizan en que comprenden por lo menos los genes vir requeridos para la transformación mediada por *Agrobacterium* y las secuencias delimitantes de T-ADN (límite de T-ADN). Estos sistemas de vector también comprenden ventajosamente regiones reguladoras cis adicionales tales como promotores y secuencias terminadoras y/o marcadores de selección, por medio de lo cual se pueden identificar los organismos transformados en forma adecuada. Aunque en el caso de sistemas de vector cointegrados los genes vir y las secuencias de T-ADN se disponen en el mismo vector, los sistemas binarios se basan en por lo menos dos vectores, uno de los cuales lleva genes vir, pero no T-ADN, mientras que un segundo lleva el T-ADN, pero no el gen vir. Propio a este hecho, los vectores mencionados anteriormente son relativamente pequeños, fáciles de manipular y de replicar en *E. coli* y en *Agrobacterium*. Estos vectores binarios incluyen vectores de las series pBIB-HYG, pPZP, pBecks, pGreen. De acuerdo con la invención, se utilizan Bin19, pB1101, pBinAR, pGPTV y pCAMBIA mediante preferencia. Un repaso general de los vectores binarios y su uso se encuentra en Hellens et al, *Trends in Plant Science* (2000) 5, 446-451. Con el fin de preparar los vectores, los vectores primero se pueden linearizar con endonucleasas de restricción y luego enzimáticamente modificado en una forma adecuada. Después de esto, el vector se purifica, y se emplea una alícuota para la etapa de clonación. En la etapa de clonación, el amplificado enzimáticamente dividido y, si es apropiado, purificado se clona con fragmentos de vector, que se han preparado en una forma similar, utilizando ligasa. En este contexto, una construcción particular de ácido nucleico, o vector o construcción de plásmido, puede tener uno o más de un segmento de gen codogénico. Los segmentos de gen codogénico en estas construcciones se ligan preferiblemente en forma operativa con las secuencias reguladoras. Las secuencias reguladoras incluyen, en particular, las secuencias de planta tal como los promotores descritos anteriormente y las secuencias terminadoras. Las construcciones se pueden propagar establemente ventajosamente en microorganismos, en particular en *E. coli* y *Agrobacterium tumefaciens*, bajo condiciones selectivas y hacen posible la transferencia del ADN heterólogo en plantas o microorganismos.

Los ácidos nucleicos utilizados en el proceso, los ácidos nucleicos de la invención y las construcciones de gen, se pueden introducir en organismos tales como microorganismos o ventajosamente plantas, ventajosamente utilizando los vectores de clonación, y así se utiliza en la transformación de plantas tal como aquellos que se publican y se citan en: *Plant Molecular Biology and Biotechnology* (CRC Press, Boca Raton, Florida), Chapter 6/7, p. 71-119 (1993); F.F. White, *Vectors for Gene Transfer in Higher Plants*; in: *Plantas transgénicas*, Vol. 1, Engineering y Utilization, Ed.: Kung y R. Wu, Academic Press, 1993, 15-38; B. Jenes et al., *Techniques for Gene Transfer*, in: *Transgenic Plants*, Vol. 1, Engineering y Utilization, Ed.: Kung y R. Wu, Academic Press (1993), 128-143; Potrykus, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 42 (1991), 205-225. Así, los ácido nucleicos, los ácidos nucleicos de la invención y las construcciones de ácido nucleico, y/o los vectores utilizados en el proceso se pueden utilizar para la modificación recombinante de un amplio espectro de organismos, ventajosamente plantas, ya que el último llega a ser mejor y/o productores PUFA y/o LCPUFA más eficientes.

En el caso de los microorganismos, aquellos expertos en la técnica pueden encontrar métodos apropiados para la introducción de los ácido nucleicos de la invención, la construcción de gen o el vector en los textos por Sambrook, J. et al. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, by F.M. Ausubel et al. (1994) *Current protocols in molecular biology*, John Wiley and Sons, por D.M. Glover et al., *DNA Cloning Vol.1*, (1995), IRL Press (ISBN 019-963476-9), por Kaiser et al. (1994) *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press o Guthrie et al. *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology*, 1994, Academic Press.

La transferencia de los genes externos dentro del genoma de una planta se llama transformación. Al hacer esto los métodos descritos para la transformación y regeneración de las plantas de tejidos de planta o células de planta se

utilizan para transformación transitoria o estable. Los métodos adecuados son transformación de protoplasto mediante la retoma de ADN inducida por poli(etilenglicol), el método "biolístico" utilizando el cañón de gen - denominado como el método de bombardeo de partícula, electroporación, la incubación de los embriones secos en la solución de ADN, microinyección y transferencia de gen mediada por *Agrobacterium*. Dichos métodos se describen por vía de ejemplo en B. Jenet et al., *Techniques for Gene Transfer*, in: *Transgenic Plants*, Vol. 1, Engineering and Utilization, eds. S.D. Kung y R. Wu, Academic Press (1993) 128-143 y en Potrykus *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 42 (1991) 205-225). Los ácidos nucleicos o la construcción que se va a expresar se clonan preferiblemente dentro de un vector, que es adecuado para transformar *Agrobacterium tumefaciens*, por ejemplo pBin19 (Bevan et al., *Nucl. Acids Res.* 12 (1984) 8711). La agrobacteria transformada por tal vector luego se puede utilizar en la forma conocida para la transformación de plantas, en particular de plantas de cultivo tales como por vía de ejemplo plantas de tabaco, por ejemplo al bañar hojas magulladas u hojas picadas en una solución agrobacteriana y luego cultivarlas en medio adecuado. Se describe la transformación de plantas por medio de *Agrobacterium tumefaciens*, por ejemplo, mediante Höfgen and Willmitzer in *Nucl. Acid Res.* (1988) 16, 9877 o se conoce inter alia de F.F. White, *Vectors for Gene Transfer in Higher Plants*; in *Transgenic plants*, Vol. 1, Engineering and Utilization, eds. S.D. Kung y R. Wu, Academic Press, 1993, pp. 15-38.

Las agrobacterias transformadas por un vector de expresión de acuerdo con la invención se pueden utilizar de manera similar en la forma conocida para la transformación de plantas tales como plantas de prueba como *Arabidopsis* o plantas de cultivo tales como cultivos de cereal, maíz, avena, centeno, cebada, trigo, soja, rice, algodón, remolacha azucarera, canola, girasol, lino, cáñamo, papas, tabaco, tomates, zanahoria, pimentón, aceite de semilla de colza, tapioca, yuca, arrurruz, caléndula, alfalfa, lechuga y los diversos árboles, especies de nuez y vino, en particular de plantas de cultivo que contienen aceite tales como soja, cacahuete, planta de aceite de ricino, girasol, maíz, algodón, lino (semilla de lino), aceite de semilla de colza, amapola, mostaza, sésamo, almendra, macadamia, oliva, caléndula, granada, avellana, aguacate, calabaza, nuez, laurel, pistacho, *Orychophragmus*, caléndula, borraja, primavera, canola, onagra, cáñamo, coco, aceite de palma, alazor (*Carthamus tinctorius*), café o cacao, por ejemplo al bañar hojas magulladas u hojas picadas en una solución agrobacteriana y luego cultivarlas en el medio adecuado. Para la producción de los LCPUFA, son ventajosamente adecuados por ejemplo ácido araquidónico y/o ácido eicosapentanoico, borraja, semilla de lino, girasol, alazor, *Brassica napus*, *Brassica juncea*, *Camelina sativa* o *Orychophragmus*.

Las células de planta modificadas genéticamente se pueden regenerar mediante todos los métodos conocidos en la técnica. Los métodos apropiados se pueden encontrar en las publicaciones denominadas como anteriormente por S.D. Kung y R. Wu, Potrykus o Höfgen y Willmitzer.

De acuerdo con lo anterior, un aspecto adicional de la invención se relaciona con organismos transgénicos transformados mediante por lo menos una secuencia de ácidos nucleicos, casete de expresión o vector de acuerdo con la invención así como también células, cultivos celulares, tejido, partes - tal como, por ejemplo, hojas, raíces, etc. en el caso de organismos de planta - o material reproductivo derivado de tales organismos. Los términos "organismo anfitrión", "célula anfitriona", "organismo recombinante (anfitrión)" y "célula transgénica (anfitrión)" se utilizan intercambiabilmente aquí. Por supuesto estos términos se relaciona solo con el organismo anfitrión particular o la célula objetivo particular pero también a los descendientes o descendientes potenciales de estos organismos o células. Desde entonces, debido a la mutación o efectos ambientales ciertas modificaciones pueden surgir en generaciones sucesivas, estos descendientes no necesitan ser necesariamente idénticos con la célula parental pero no obstante todavía se abarcan por el término como se utiliza aquí.

Los organismos adecuados o organismos anfitriones para el ácido nucleico, la construcción de gen o el vector de acuerdo con la invención son ventajosamente en principio todas las plantas, que son capaces de sintetizar los ácidos grasos, especialmente ácidos grasos insaturados o son adecuados para la expresión de genes recombinantes como se describió anteriormente. Ejemplos adicionales que se pueden mencionar son plantas tales como *Arabidopsis*, Asteráceas tales como Caléndula o plantas de cultivo tales como soja, cacahuete, planta de aceite de ricino, girasol, maíz, algodón, lino, aceite de semilla de colza, coco, aceite de palma, alazor (*Carthamus tinctorius*) o granos de cacao, bacterias tales como el género *Escherichia*, levaduras tal como el género *Saccharomyces*. Se da preferencia a organismos que pueden sintetizar en forma natural los aceites en cantidades relativamente grandes tales como hongos como *Mortierella alpina*, *Pythium insidiosum* o plantas tales como soja, aceite de semilla de colza, coco, aceite de palma, alazor, lino, planta de aceite de ricino, Caléndula, cacahuete, granos de cacao o girasol, o levaduras tal como *Saccharomyces cerevisiae* y se da particular preferencia a la familia de las Brasicáceas tal como aceite de semilla de colza, soja, lino, girasol, Caléndula, *Mortierella* o *Saccharomyces cerevisiae*.

Se identifican células anfitrionas útiles adicionales en: Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990).

Las cepas de expresión utilizables, por ejemplo aquellas que exhiben una actividad de proteasa relativamente baja, se describen en: Gottesman, S., *Expresión de gen Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 119-128.

Un objeto adicional de la invención como se describe se relaciona con el uso de un casete de expresión que contiene las secuencias de ADN que codifican un gen Δ -12- y Δ -15-desaturasa o las secuencias de ADN que hibridan con la misma para la transformación de las células de planta, tejidos o partes de plantas. El objetivo de uso es para aumentar el contenido de ácidos grasos, aceites o lípidos que tienen un contenido aumentado de enlaces dobles.

Al hacer esto, dependiendo de la elección del promotor, el gen Δ -12- y Δ -15-desaturasa se puede expresar específicamente en las hojas, en las semillas, los nódulos, en raíces, en el tallo u otras partes de la planta, preferiblemente en hojas y/o semillas. Aquellas plantas transgénicas sobreproducen los ácidos grasos, aceites o lípidos de acuerdo con la invención, el material reproductivo del mismo, junto con células de planta, tejidos o partes de las mismas son un objeto adicional de la presente invención.

El casete de expresión o las secuencias de ácidos nucleicos de acuerdo con la invención que contienen una secuencia del gen Δ -12- y Δ -15-desaturasa, más aún, también se puede emplear para la transformación de los organismos identificados por vía del ejemplo anterior tal como bacterias, cianobacterias, levaduras, hongos filamentosos, ciliados y algas con el objetivo de aumentar el contenido de ácidos grasos, aceites o lípidos de acuerdo con la invención.

Dentro de la estructura principal de la presente invención es el aumento del contenido de ácidos grasos, aceites o lípidos que poseen una cantidad mayor de ácidos grasos ω -3 en comparación con los ácidos grasos ω -6 tal como ácido eicosapentanoico en comparación con ácido araquidónico, debido a una sobreexpresión funcional del gen Δ -12- y Δ -15-desaturasa en la planta de acuerdo con la invención, ventajosamente en las plantas oleaginosas transgénicas de acuerdo con la invención, mediante comparación con las plantas iniciales no modificadas genéticamente por lo menos para la duración de por lo menos una generación de planta.

El locus preferido de biosíntesis, de ácidos grasos, aceites o lípidos por ejemplo, es de manera general la semilla o las capas de células de la semilla de tal manera que una expresión específica de semilla del gen Δ -12- y Δ -15-desaturasa si es apropiado. Sin embargo, es obvio que la biosíntesis de los ácidos grasos, aceites o lípidos no necesita ser limitada al tejido de semilla sino más bien puede ocurrir en una forma específica de tejido en todas las otras partes de la planta – en células de epidermis o por ejemplo en los nódulos.

Una expresión constitutiva del gen Δ -12- y Δ -15-desaturasa exógeno es, más aún, ventajosa. Por otra parte, sin embargo, también parece deseable la expresión inducible.

La eficiencia de la expresión del gen Δ -12- y Δ -15-desaturasa se puede determinar, por ejemplo, in vitro mediante propagación de meristema de brote. Adicionalmente, una expresión del gen Δ -12- y Δ -15-desaturasa modificado en naturaleza y nivel y su efecto en el ácido graso, se puede probar el desempeño de la biosíntesis de lípido o aceite en plantas de prueba en ensayos de invernadero.

Un objeto adicional de la invención comprende plantas transgénicas transformadas por un casete de expresión que contiene una secuencia de gen Δ -12- y Δ -15-desaturasa de acuerdo con la invención o las secuencias de ADN que las hibrida, así como también células transgénicas, tejido, partes y material de reproducción de tales plantas. Se da particular preferencia en este caso a plantas de cultivos transgénicos tal como por vía de ejemplo cebada, trigo, centeno, avena, maíz, soja, arroz, algodón, remolacha azucarera, la familia de las Brassicáceas tal como aceite de semilla de colza y canola, girasol, lino, cáñamo, cardo, papa, tabaco, tomate, tapioca, yuca, arrurruz, alfalfa, lechuga y los diversos árboles, especies de nuez y vino.

Para los propósitos de la invención las plantas son plantas mono- y dicotiledóneas que producen semillas maduras.

Un refinamiento adicional de acuerdo con la invención son plantas transgénicas como se describió anteriormente que contienen las secuencias de ácido nucleico, la construcción de gen y/o el vector de la invención.

La invención se explica en más detalle mediante los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Métodos de clonación general

Los métodos de clonación, tal como por vía de las divisiones de restricción de ejemplo, electroforesis en gel de agarosa, purificación de los fragmentos de ADN, transferencia de los ácidos nucleicos a nitrocelulosa y membranas de nylon, ligado de los fragmentos de ADN, transformación de células *Escherichia coli*, cultivo de bacterias y análisis de secuencia de ADN recombinante, se llevan a cabo como se describe en Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6).

Ejemplo 2: Análisis de secuencia de ADN recombinante

El secuenciamiento de las moléculas de ADN recombinante se hace utilizando un secuenciador de ADN de fluorescencia láser de la compañía ABI mediante el método de Sanger (Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci.

USA74, 5463-5467). Los fragmentos que resultan de una reacción de cadena polimerasa se secuencian y se revisan para evitar errores de polimerasa en las construcciones que se van a expresar.

Ejemplo 3: Clonación de las desaturasa específicas de PUFA de *Acanthamoeba castellanii* (= SEQ ID NO: 3, 5, 15, 19 y 21)

5 *Acanthamoeba castellanii* (Eukaryota; Protista; Sarcomastigophora; Sarcodina; Rhizopodea; Lobosa) es una especie de ameba, que es una especie común en el suelo. Se puede cultivar *Acanthamoeba castellanii* vegetativo sobre un amplio rango de temperatura (10 a 32° C). *A. castellanii* es capaz de sintetizar de novo el ácido linoleico y los ácidos grasos C20 n-6.

10 Se cultiva *A. castellanii* (ATTC 30010) a 30° C en un medio que contiene 0,75 % (p/v) de peptona, 1,5 % (p/v) de glucosa y 0,75 % (p/v) de extracto de levadura de acuerdo con la referencia de Jones et al. [Temperature-induced membrane-lipid adaptation in *Acanthamoeba castellanii*. *Biochem J.* 1993, 290:273-278]. Los cultivos celulares se cultivan bajo agitación (200 U/min) y se cosechan con una centrifuga a 250 x g, 5 min, 4° C, después de alcanzan una densidad celular de 5×10^6 - 10^7 (medido en un hemocitómetro Fuchs-Rosenthal).

15 El mRNA total se aísla de dichas células cosechadas con la ayuda del mini equipo de planta RNeasy (Qiagen). El cADN se sintetiza del mRNA total con el equipo de amplificación de cADN SMART RACE (Clontech) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para el aislamiento de los nuevos genes desaturasa se utilizan los siguientes cebadores desaturados para amplificación:

Deg1:

20 5'- GGITGG(C/T/A)TIGGICA(T/C) GA(T/C)(GT) (CT)I(GT) (GC)ICA-3'

Deg2:

5'- GG(A/G)AA(TCGA)AG(A/G)TG(A/G)TG(T/C)TC(A/G/T)AT(T/C)TG-3'

Se utilizan los cebadores mencionados anteriormente para la amplificación en combinación con el cebador adaptador 3' del equipo de amplificación de cADN SMART RACE.

25 Se utiliza el siguiente protocolo para la amplificación:

a) 2 min a 95° C,

b) 30 s a 94 ° C

30 s a 55-72° C

2 min a 72 ° C

30 Número de ciclos: 30

c) 10 min a 72 ° C

35 Se clonan amplicones PCR y se secuencian de acuerdo con las instrucciones del fabricante (pTOPO, Invitrogen). Se utiliza la información secuencia para la producción de clones de longitud completa. Para la clonación de los cebadores específicos se sintetizan los clones 5'- y 3' de longitud completa. Dichos cebadores se utilizan para la amplificación en el equipo de amplificación de cADN SMART RACE (Clontech) y los amplicones se clonan en el vector pTOPO (Invitrogen).

Se identifican tres secuencias, que muestran bajas similitudes a los genes desaturasa.

Además de acuerdo con [Zank et al. 2002, *Plant Journal* 31:255 268] la secuencia 9Ac (Δ -9-Elongasa de *Acanthamoeba*, SEQ ID NO: 11) se puede identificar, que muestra bajas similitudes para los genes elongasa.

40 Tabla 1: Secuencias desaturasa *Acanthamoeba castellanii*

Gen	Nucleótido bp	SEQ ID NO:
12Ac (Δ -12/ Δ 15-Desaturasa de <i>Acanthamoeba</i>)	1224 bp	19,21
8Ac (Δ -8-Desaturasa de <i>Acanthamoeba</i>)	1374 bp	3, 5
5Ac (Δ -5-Desaturasa de <i>Acanthamoeba</i>)	1353 bp	15

Ejemplo 4: Clonación de las desaturasas específicas PUFA de *Perkinsus marinus* (= SEQ ID NO: 7, 17 y 23)

Perkinsus marinus, que pertenece al reino Protista, es un parásito en conchas marinas. *P. marinus* es capaz de sintetizar los LCPUFA tal como ácido araquidónico (20:4). Los LCPUFA se producen de acuerdo con el presente trabajo sobre la ruta de ácido graso Δ -8-/ Δ -5 (ver figura 1).

5 Se cultiva *P. marinus* a 28° C como se describe por La Peyre et al. (J: Eukaryot. Microbiol. 1993, 40: 304 - 310).

Se aísla el mRNA total de dichas células cosechadas con la ayuda del mini Equipo de planta RNeasy (Qiagen). Se sintetiza cADN del mRNA total con el equipo de amplificación de cADN SMART RACE (Clontech) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

10 Para el aislamiento de los nuevos genes desaturasa se utilizan los siguientes genes degenerados para la amplificación:

Deg 1:

5'- GGITGG(C/T/A)TIGGICA(T/C) GA(T/C)(GT) (CT)I(GT) (GC)ICA-3'

Deg2:

5'- GG(A/G)AA(TCGA)AG(A/G)TG(A/G)TG(T/C)TC(A/G/T)AT(T/C)TG-3'

15 Se utilizan los cebadores mencionados anteriormente para la amplificación en combinación con el cebador adaptador 3' del equipo de amplificación de cADN SMART RACE.

Se utiliza el siguiente protocolo para la amplificación:

d) 2 min a 95° C,

e) 30 s a 94 ° C

20 30 s a 55-72° C

2 min a 72 ° C

Número de ciclos: 30

f) 10 min a 72 ° C

25 Se clona amplicones PCR y se secuencian de acuerdo con las instrucciones del fabricante (pTOPO, Invitrogen). Se utiliza la información de secuencia para la producción de clones de longitud completa. Para la clonación se sintetizan cebadores específicos 5'- y 3' de clones de longitud completa. Dichos cebadores se utilizan para la amplificación del equipo de amplificación de cADN SMART RACE (Clontech) y los amplicones se clonan en el vector pTOPO (Invitrogen). Se identifican tres secuencias, que permiten bajas similitudes a los genes desaturasa.

Tabla 2: Secuencias de desaturasa *Perkinsus marinus*

Gen	Nucleótido bp	SEQ ID NO:
12Pm (A-12 -Desaturasa de Perkinsus)	1254 bp	23
8Pm (Δ -8-Desaturasa de Perkinsus)	1236 bp	7
5Pm (Δ -5-Desaturasa de Perkinsus)	1374 bp	17

30

Ejemplo 5: Clonación de los plásmidos de expresión para la expresión heteróloga de genes *A. castellanii* y *P. marinus* en levaduras

35 Para la expresión heteróloga en levaduras las secuencias respectivas con PCR amplificado y con las enzimas de restricción KpnI-SacI de las secuencias resultantes se clonan en el vector de levadura pYES2 (Invitrogen). Para la amplificación se utilizan cebadores específicos (ver tabla 3 adelante). Solo se amplifican estructuras de lectura abiertas de los genes PUFA. Además se unen los laterales de división a las secuencias de ácido nucleico. En el extremo 5' un lado KpnI y se agrega una así llamada secuencia Kozak (Cell, 1986, 44: 283 - 292). Al extremo 3' se une un lateral SacI.

Tabla 3: Cebadores para la amplificación de las secuencias de ácidos nucleicos de las desaturasas

ES 2 380 052 T3

Gen	bp	Cebador	SEQ NO:	ID
12Ac	1224	Delantero: GGTACCATGGCGATCACGACGACGCAGACAC	25	
		Inverso: GAGCTCCTAGTGGGCCTTGCCGTGCTTGATCTCC	26	
8Ac	1374	Delantero: GGTACCATGGTCCTCACAACCCCGGCCCTC	27	
		Inverso: GGAGCTCTCAGTTCTCAGCACCCATCTTC	28	
5Ac	1353	Delantero: GGTACCATGGCCACCGCATCTGCATC	29	
		Inverso: GGAGCTTTAGCCGTAGTAGGCCTCCTT	30	
9Ac	891	Delantero: GGTACCATGGCGGCTGCGACGGCGAC	31	
		Inverso: GGAGCTTTAGTCGTGCTTCCTCTTGGG	32	
12Pm	1254	Delantero: GGTACCATGACCCAACTGAGGTCCA	33	
		Inverso: GGAGCTCTAACGAGAAGTGCGAGCGT	34	
8Pm	1236	Delantero: GGTACCATGTCTTCTCTTACCCTCTA	35	
		Inverso: GGAGCTCTATTCCACTATGGCAACAG	36	
5Pm	1374	Delantero: GGTACCATGACTACTTCAACCACTAC	37	
		Inverso: GGAGCTCTACCTAGCAAGCAATCTCT	38	

Composición de la mezcla PCR (50 ml)

5,00 µL cADN de plantilla

5 5,00 µL 10x Puffer (Advantage-Polimerasa)+ 25mM de MgCl₂

5,00 µL 2mM dNTP

1,25 µL cada cebador (10 pmol/µL del 5'-ATG así como también del cebador de parada 3')

0,50 µL Polimerasa Advantage

Se emplea la polimerasa Advantage de Clontech.

10 Protocolo PCR

Temperatura de adición: 1 min a 55 ° C

Temperatura desnaturalizante: 1 min a 94 ° C

Temperatura de elongación: 2 min a 72 ° C

15 Número de ciclos: 35

20 Los productos PCR y el vector pYES2 se incuban con las enzimas de restricción KpnI y SacI durante 1 h a 37° C. Después de esto se hace la reacción de ligación con el Equipo de Ligación Rápido (Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La mezcla de reacción luego se utiliza para la transformación de células E. coli DH5α (Invitrogen) de nuevo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se identifican clones positivos con PCR (esquema de reacción como se describió anteriormente). Se aísla el ADN de plásmido (Qiagen Dneasy) y se revisan los plásmidos resultantes al secuenciar y transformar con el método de acetato de litio en la cepa Saccharomyces W303-1A. Como un control el plásmido pYES2 (vector sin inserto) se transforma en paralelo. Se seleccionan levaduras transformadas en placas de agar en medio completo de uracilo de derrame mínimo (CMdum) complementado con 2 % de glucosa, pero sin uracilo.

5 Para expresar los genes de *A. castellanii* y *P. marinus*, los precultivos que consisten en cada caso de 5 ml de medio líquido completo de uracilo de derrame mínimo complementado con 2 % (p/v) de rafinosa, pero sin uracilo se inoculan inicialmente con los transformantes seleccionados y se incuban durante 2 días a 30° C y 200 rpm. Luego, se inoculan 5 ml de medio líquido CMdum (sin uracilo) complementado con 2 % de rafinosa y 300 mM de diversos ácidos grasos con los precultivos a un OD₆₀₀ de 0.05. Se induce la expresión mediante la adición de 2 % (p/v) de galactosa. Los cultivos se incuban durante 96 horas adicionales a 22° C.

Ejemplo 6: Clonación de los plásmidos de expresión para la expresión en plantas

10 Para transformar plantas, se genera un vector de transformación adicional se basa en pBIN19-35S (Bevan M. (1984) Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. Nucl. Acids Res. 18:203). Para este fin, se insertan sitios de división BamHI-XbaI en el extremo 5' y 3' de las secuencias codificantes, utilizando PCR. Las secuencias cebadores correspondientes se derivan de las regiones 5' y 3' de la secuencia de ácido nucleico respectiva (ver tabla 4).

Tabla 4: Cebadores para la expresión en plantas

Gen	bp	Cebador	SEQ NO:	ID
12Ac	1224	Delantero: GGATCCACCATGGCGATCACGACGACGCAGACA C	39	
		GGTCTAGACTAGTGGGCCTTGCCGTGCTTGATCT Inverso: CC	40	
8Ac	1374	Delantero: GGATCCAGGATGGTCCTCACAACCCCGGCCCTC	41	
		Inverso: GGTCTAGATCAGTTCTCAGCACCCATCTTC	42	
5Ac	1353	Delantero: GGATCCATGGCCACCGCATCTGCATC	43	
		Inverso: GGTCTAGATTAGCCGTAGTAGGCCTCCTT	44	
9Ac	891	Delantero: GGATCCATGGCGGCTGCGACGGCGAC	45	
		Inverso: GGTCTAGATTAGTCGTGCTTCCTCTTGGG	46	
12Pm	1254	Delantero: GGATCCATGACCCAACTGAGGTCCA	47	
		Inverso: GGTCTAGACTAACGAGAAGTGCGAGCGT	48	
8Pm	1236	Delantero: GGATCCATGTCTTCTCTTACCCTCTA	49	
		Inverso: GGTCTAGACTATTCCACTATGGGAACAG	50	
5Pm	1374	Delantero: GGATCCATGACTACTTCAACCACTAC	51	
		Inverso: GGTCTAGACTACCTAGCAAGCAATCTCT	52	

Composición de la mezcla de PCR (50 ml):

15

5.00 µl de cADN de plantilla

5.00 µl de regulador 10x (polimerasa Advantage)+ 25mM MgCl₂

5.00 µl 2mM dNTP

1.25 ml de cada cebador (10 pmol/µl)

20

0.50 µl polimerasa Advantage

Se emplea la polimerasa Advantage de Clontech.

Condiciones de reacción PCR:

Temperatura de hibridación: 1 min 55° C

Temperatura de desnaturalización: 1 min 94° C

Temperatura de elongación: 2 min 72° C

5 Número de ciclos: 35

Los productos PCR así como también el vector pBin19-35S se incuban con las enzimas de restricción BamHI y XbaI durante 16 horas a 37° C. Después de esto se hace una reacción de ligación con el Equipo de Ligación Rápido (Roche) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La mezcla de reacción luego se utiliza para la transformación de células E. coli DH5α (Invitrogen) de nuevo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se identifican clones positivos con PCR (esquema de reacción como se describió anteriormente) y se aísla el ADN de plásmido (Qiagen Dneasy). Los plásmidos resultantes se revisan al secuenciar y transformar mediante electroporación en Agrobacterium tumefaciens GC3101. Después de esto los transformantes se colocan en placas en placas de gar de 2% de Medio YEB con canamicina. Se añaden células tolerantes a la canamicina y se utilizan para la transformación de Arabidopsis thaliana.

15 **Ejemplo 7:** Expresión de genes A. castellanii y P. marinus en levaduras

Las levaduras que se han transformado con los plásmidos pYES2, pYES-12Ac, pYES-8Ac, pYES2-5Ac, pYES2-9Ac, pYES2-12Pm, pYES2-8Pm y pYES2-5Pm como se describe en el Ejemplo 5 se analizan como sigue:

Las células de levadura de los cultivos principales se cosechan mediante centrifugación (100 x g, 5 min, 20° C) y se lavan con 100 mM NaHCO₃, pH 8.0 para retirar el medio residual y los ácidos grasos. Partiendo con los sedimentos de células de levadura, se preparan metil ésteres de ácido graso (FAME) mediante metanolisis de ácido. Para este fin, los sedimentos de células se incuban durante una hora a 80° C junto con 2 ml de ácido sulfúrico metanólico 1 N y 2 % (v/v) de dimetoxipropano. Los FAME se extraen dos veces con éter petróleo (PE). Para retirar los ácidos grasos no derivados, las fases orgánicas se lavan en cada caso una vez con 2 ml de 100 mM NaHCO₃, pH 8.0 y 2 ml de agua destilado. Después de esto, se secan las fases PE con Na₂SO₄, se evaporan bajo argón y se toman en 100 ml de PE. Las muestras se separan en una columna capilar DB-23 (30 m, 0.25 mm, 0.25 mm, Agilent) en una cromatografía de gas Hewlett-Packard 6850 equipada con detector de ionización de flama. Las condiciones para el análisis GLC son como sigue: la temperatura del horno se programa de 50° C a 250° C con un índice de 5° C/min y finalmente 10 min a 250° C (holding).

Las señales se identifican al comparar los tiempos de retención con los estándares de ácido graso correspondientes (Sigma). La metodología se describe por ejemplo en Napier and Michaelson, 2001, Lipids. 36 (8):761-766; Sayanova et al., 2001, Journal of Experimental Botany. 52 (360):1581-1585, Sperling et al., 2001, Arch. Biochem. Biophys. 388 (2): 293-298 y Michaelson et al., 1998, FEBS Letters. 439 (3):215-218.

Ejemplo 8: Caracterización funcional de los genes de A. castellanii

La actividad del sustrato y especificidad de los genes se determinan después de expresión y después de cargar diversos ácidos grasos. La especificidad del sustrato de las desaturasas después de expresiones en levadura se puede determinar al cargar diferentes ácidos grasos. Ejemplos específicos para la determinación de la especificidad y la actividad se describen por ejemplo en a WO 93/11245, WO 94/11516, WO 93/06712, US 5,614,393, US 5614393, WO 96/21022, WO 0021557 y WO 99/27111, Qiu et al. 2001, J. Biol. Chem. 276, 31561-31566 para las Δ4-desaturasas, Hong et al. 2002, Lipids 37,863-868 para las Δ5- desaturasas. La WO 2005/012316 enseña tal método por ejemplo en el ejemplo 18 en más detalle.

a) Caracterización del gen 12Ac:

Primero se prueba la construcción pYES-12Ac en levaduras sin cargar los ácidos grasos. Sorprendentemente se muestra en comparación con el vector de control pYES2 (vector sin inserto) que aún sin cargar ácidos grasos nuevos ácidos grasos que son detectables en las levaduras (Figura 2 A y B).

La Figura 2 A y B muestra una comparación del perfil de ácido graso entre el control (construcción pYES2 sin el inserto, Figura 2A) y la construcción pYES2-12Ac (Figura 2B), que contiene el gen Acanthamoeba para la Δ-12-/Δ-15-desaturasa. Los ácidos grasos están en el mercado. Los nuevos ácidos grasos sintetizados son en cada caso los ácidos grasos de construcción pYES2-12Ac (2B) C16:2, C16:3, C18:2 y C18:3, mientras que los ácidos grasos inusuales 16:2n-4 y 16:3n- 1 se forman para los ácidos grasos C16. Para los ácidos grasos se forman el ácido linoleico C18 y ácido linolénico (18:2n-6 y 18:2n-3).

De acuerdo con los nuevos ácidos grasos sintetizados es posible identificar el producto de gen de la secuencia de ácidos nucleicos como una Δ-12-desaturasa. La enzima es capaz de desaturar C18:1 y C16:1 como sustrato para los ácidos grasos correspondientes C18:2 y C16:2. El índice de conversión de C18:1 (40,0 %) es mayor que el

índice de la conversión C16:1 (15,8 %). Esto significa que el índice de conversión de C18:1 es más del doble que el índice de conversión de C16:1.

El índice de conversión de la desaturasa se calcula de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Sustrato}}{(\text{sustrato} + \text{Producto})} \times 100$$

El resultado de la fórmula se da como un valor en porcentaje.

Adicionalmente la enzima muestra además una actividad de Δ -15-desaturasa clara. Esto significa también que los productos de la reacción Δ -12-desaturasa, que son C16:2 y/o C18:2 se desaturan adicionalmente a C16:3 y/o C18:3.

b) Caracterización del gen 8Ac:

- 10 De acuerdo con diferentes alineaciones de secuencia (Blast) realizadas con la secuencia SEQ ID NO: 3 (secuencia 8Ac) con diferentes bases de datos (NCBI-BLAST: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) la secuencia de proteína modificada es más probablemente una Δ -5-desaturasa putativa.

Secuencias con similitudes significativas	(bits)	Valor
gi 16033740 gb AAL13311.1 delta-5 desaturasa de ácido graso [P...	176	1e-42
gi 50882495 gb AAT85663.1 ácido graso poliinsaturado delta...	170	6e-41
gi 4150956 dbj BAA37090.1 delta 5 desaturasa de ácido graso [D...	156	9e-37
gi 23894018 emb CAD53323.1 (delta 5 desaturasa de ácido graso [...	156	1e-36
gi 33466346 gb AAQ19605.1 delta-4 desaturasa de ácido graso [E...	150	7e-35
gi 5263169 dbj BAA81814.1 desaturasa de ácido graso [Dictyoste...	149	1e-34
gi 25956288 gb AAN75707.1 delta 4-desaturasa [Thraustochyt...	142	1e-32
gi 25956290 gb AAN75708.1 delta 4-desaturasa [Thraustochyt...	139	1e-31
gi 25956294 gb AAN75710.1 delta 4-desaturasa [Thraustochyt...	139	1e-31
gi 25956292 gb AAN75709.1 delta 4-desaturasa [Thraustochyt...	138	2e-31
gi 20069125 gb AAM09688.1 delta-4 desaturasa de ácido graso [T...	138	3e-31
gi 39545945 gb AAR28035.1 delta-5 desaturasa [Mortierella ...	136	9e-31
gi 3859488 gb AAC72755.1 delta-5 desaturasa de ácido graso [Mo...	135	2e-30
gi 41017070 sp 074212 FAD5_MORAP Delta-5 ácido graso desatur...	130	7e-29
gi 48854274 ref ZP_00308437.1 COG3239: Ácido graso desatura...	114	4e-24
gi 48854276 ref ZP_00308439.1 COG3239: Ácido graso desatura...	114	7e-24

- 15 De acuerdo con esto se cargan diferentes ácidos grasos de actividad putativa (18:2, 18:3, 20:3n-6, 20:4n-3). Ninguno de dichos ácidos grasos se desaturan mediante la enzima. Este resultado muestra claramente que la proteína codificada por el gen 8Ac no tiene una actividad Δ -5-desaturasa ni una actividad Δ -6-desaturasa.

Inesperadamente después de cargar los ácidos grasos 20:2n-6 y 20:3n-3 se puede mostrar, que la secuencia 8Ac codifica una Δ -8-desaturasa (ver figuras 3 A, 3 B, 4 A y 4 B).

- 20 La Figura 3 A y B muestra el perfil de ácido graso de levaduras transformadas con la construcción pYES2 como control (Figura 3 A) y pYES2-8Ac (Figura 3 B) y se carga con el ácido graso C20:2 Δ 11,14. Los ácidos grasos están en el mercado.

La Figura 4 A y B muestra el perfil de ácido graso de levadura transformada con la construcción pYES2 (Figura 4 A) como control y pYES2-8Ac (Figura 4 B) y se carga con el ácido graso C20:3 Δ 11,14,17. Los ácidos grasos respectivos están en el mercado.

- 25 La proteína codificada por la secuencia 8Ac es por lo tanto una Δ -8-desaturasa. Los índices de conversión para los ácidos grasos C20:2 y C20:3 son 15,2% y 17,5% respectivamente. Es absolutamente asombroso como la secuencia

8Ac, que tiene algunas similitudes para las desaturasas "front-end", tiene la región conservada de la característica Cyt b5 motiv His-Pro- Gly-Gly (HPGG), que es necesaria para construir el dominio Heme. En mutaciones generales en dicho dominio conducen al agotamiento de la actividad enzimática (Sayanova et al. 1999, Plant Physiol 121 (2):641-646). La secuencia de aminoácidos de esta nueva Δ -8-desaturasa muestra las diferencias inesperadas para conocer las desaturasas "front-end". En lugar del motivo HPGG esta desaturasa muestra el motivo HPAG, que se debe a una alanina en la posición 44 de la secuencia. Sayanova et al. 1999, Plant Physiol 121(2):641-646 ha mostrado que tal cambio del motivo HPPG a HPAG conduce a inactivar las enzimas. Por lo tanto la actividad de la nueva Δ -8-desaturasa es aún más sorprendente.

Para la mejora adicional de la actividad de la Δ -8-desaturasa, se mutageniza la secuencia de la enzima.

10 El siguiente cebador.

8AcMf CAAGTACCACCCGGCGGCAGCAGGGCCA y

8AcMr TGGCCCTGCTGCCGCCCGGGTGGTACTTG

se utilizan junto con el Equipo de mutagenia dirigida a sitio (Stratagene) para la mutagenia de acuerdo con las instrucciones del fabricante de la Δ -8-desaturasa. Esta mutagenia después de esto se revisa por secuenciamiento. Debido a que la mutagenia de las secuencias de nucleótidos 124-CACCCGGCCGGC se cambia a 124-CACCCGGGCGGC, que conduce a un cambio de Alanina a Glicina en la posición 44 de la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en la SEQ ID NO: 3. La secuencia resultante se muestra en la SEQ ID NO: 5. Como ya se describió para la secuencia de 8Ac la secuencia mutada 8AcM también se clona dentro del vector pYES2 y se transforma en levadura. La levadura transformada con el vector pYES-8Ac o pYES2-8AcM se cultiva y se carga en paralelo con diferentes ácidos grasos (ver tabla 5). Los resultados de la carga se muestran en la tabla 5. La enzima mutada 8AcM se muestra en comparación con la enzima tipo natural 8Ac una actividad aumentada hacia el ácido graso C20:2. Esto es un aumento de dos veces de la actividad. La mutación no tiene influencia de la actividad con el ácido graso C20:3 como sustrato. Esto muestra claramente que con la mutación la actividad de la Δ -8-desaturasa se puede influenciar en una forma muy específica.

25 Tabla 5. Índice de conversión de ácido graso de levaduras transformadas con pYES-8Ac o pYES2-8AcM

Plásmido	Ácido graso C20:2	Ácido graso C20:3
pYES-8Ac	15,2%	17,5 %
pYES2-8AcM	30,0 %	17,2%

La Δ -8-desaturasa mutada 8AcM y sus derivados son especialmente útiles solos o en combinación con la Δ -12- y Δ -15-desaturasa, la Δ -9-elongasa y la Δ -5-desaturasa para la síntesis de ácido araquidónico.

c) Caracterización del gen 5Pm:

30 Las construcciones pYES2 y pYES-5Pm se transforman en levaduras que se cultivan en paralelo como se describe. Después de esto se cargan 250 mM de diferentes ácidos grasos. Durante estos experimentos de carga se puede mostrar que los ácidos grasos tales como C16: 0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2n-6, C20:2n-6 o C22:4n-6 no se desaturan mediante la proteína codificada por la secuencia 5Pm. Mientras que el sustrato C20:3n-6 se desatura por la enzima (ver figuras 5 A y 5 B). Las Figuras 5 A y 5 B muestran claramente que la enzima produce ácido araquidónico durante la transformación del sustrato de ácido graso C20: 3n-6. No se produce el nuevo ácido graso mediante el control (Figura 5 A). La desaturación del sustrato de ácido graso C20:3n-6 a ácido araquidónico se debe a una actividad Δ -5-desaturasa, que se codifica por la secuencia 5Pm (SEQ ID NO: 17). El índice de conversión calculado de acuerdo con la ecuación mencionada anteriormente es 15,4 %.

40 La Figura 5 A y 5 B muestra la comparación del perfil de ácido graso de levaduras transformadas con la construcción pYES2 como control y se carga con el ácido graso C20:3n-6 (Figura 5 A) y con la construcción pYES2-5Pm cargada con el ácido graso C20:3n-6 (Figura 5 B). Los ácidos grasos están en el mercado. El nuevo ácido graso sintetizado es C20:4n-6 (ácido araquidónico).

d) Caracterización de los genes 5Ac, 9Ac, 12Pm und 8Pm:

45 De acuerdo con las comparaciones de secuencia es capaz de identificar las secuencias 5Ac, 12Pm y 8Pm como desaturasas que tienen una actividad Δ -5-desaturasa, Δ -12-desaturasa y Δ -8-desaturasa. Para la secuencia 9Ac somos capaces de mostrar una actividad Δ -9-elongasa.

En combinación con el gen 12Ac y 8Ac el conjunto completo de enzimas de *A. castellanii*, que es necesario para la síntesis de ácido araquidónico (C20:4n-6) o se puede identificar ácido eicosapentanoico. Además de genes adicionales para la síntesis de dichos ácidos grasos mencionados anteriormente se aíslan de *P. marinus*. con la

ayuda de dichos genes se puede mejorar adicionalmente el contenido de PUFA y/o LCPUFA. Para la síntesis del ácido araquidónico o ácido eicosapentanoico se pueden introducir dichos genes en plantas o microorganismos (ver ejemplo 8).

Ejemplo 8: Generación de plantas transgénicas

- 5 a) Generación de plantas transgénicas de aceite de semilla de colza (método modificado de Moloney et al., 1992, Plant Cell Reports, 8:238-242)

Los vectores binarios en *Agrobacterium tumefaciens* C58C1:pGV2260 o *Escherichia coli* (Deblaere et al, 1984, Nucl. Acids. Res. 13, 4777-4788) se pueden utilizar para generar plantas transgénicas de aceite de semilla de colza. Para transformar las plantas de aceite de semilla de colza (Var. Drakkar, NPZ Nordeutsche Pflanzenzucht, Hohenlieth, Alemania), se utiliza una dilución 1:50 de un cultivo durante la noche de una colonia agrobacteriana positivamente transformada en medio Murashige-Skoog (Murashige and Skoog 1962 Physiol. Plant. 15, 473) complementado con 3 % de sacarosa (medio 3MS). Los petiolos o hipocotiledóneas de plantas de aceite de semilla de colza frescamente germinadas (en cada caso aproximadamente 1 cm²) se incuban con una dilución agrobacteriana 1:50 durante 5-10 minutos en un plato Petri. Esto se sigue por 3 días de coincubación en la oscuridad a 25° C en medio 3MS complementado con 0.8 % de Bacto agar. Después se hacen crecer cultivos durante 3 días a 16 horas luz/8 horas oscuridad y el cultivo se continua a un ritmo semanal en medio MS complementado con 500 mg/l de Claforan (cefotaxim sodio), 50 mg/l de canamicina, 20 mM benicilaminopurina (BAP), ahora complementado con 1.6 g/l de glucosa. Se transfieren los brotes que crecen al medio MS complementado con 2 % de sacarosa, 250 mg/l de Claforan y 0.8 % de Bacto agar. Si no se desarrollan raíces después de tres semanas, se agrega ácido 2-indolebutírico al medio cuando crece la hormona para raíz.

Se obtienen brotes regenerados en medio 2MS complementado con canamicina y Claforan; después de raíz, estos se transfieren al compost y, después de cultivar durante dos semanas en una cabina de ambiente controlado o en el invernadero, se cosechan y analizan las flores y semillas maduras mediante análisis de lípidos para expresión elongasa y/o desaturasa, tal como actividad Δ -12- y Δ -15-desaturasa, Δ -8-desaturasa, Δ -9-elongasa o Δ -5-desaturasa. De esta forma, se pueden identificar las estirpes con contenidos elevados de PUFA y/o LCPUFA.

- b) Generación de plantas transgénicas de semilla de lino

Las plantas transgénicas de semilla de lino se pueden generar por ejemplo mediante el método de Bell et al., 1999, In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant. 35(6): 456-465 por medio de bombardeo de partícula. En general, se transforma la semilla de lino mediante una transformación mediada por agrobacterias, por ejemplo mediante el método de Mlynarova et al. (1994), Plant Cell Report 13: 282-285.

- c) Generación de plantas transgénicas *Arabidopsis*

Se transfieren plásmidos binarios a la cepa *A. tumefaciens* GV3101 mediante electroporación y se seleccionan colonias resistentes a canamicina en todos los casos. La estirpe tipo natural Col0 o transgénica CA1-9, que contiene la región codificante de la actividad de elongación l. galbana, IgASE1 [Qi, B., Beaudoin, F., Fraser, T., Stobart, A.K., Napier, J.A. y Lazarus, C.M. (2002) Identification of a cDNA encoding a novel C18-D9 polyunsaturated fatty acid - specific elongating activity from the docosahexaenoic acid (DHA)-producing microalga, *Isochrysis galbana*. FEBS Lett. 510, 159-65] se utiliza como el anfitrión para la transformación con el gen *A. castellanii* Δ 8-desaturasa. Se realiza transformación mediada por *A. tumefaciens* como se describe en Bechthold et al. [(1993) In plant *Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of *Arabidopsis thaliana* plants. C.R. Acad. Sci. Ser. III Sci.Vie., 316, 1194-1199.] y las semillas de plantas sumergidas se rocían en medio Murashige y Skoog que contiene 50 mg ml⁻¹ de canamicina.

Ejemplo 9: Extracción de lípidos de hojas

El efecto de la modificación genética en plantas, hongos, algas, ciliados o en la producción de un compuesto deseado (tal como un ácido graso) se puede determinar al cultivar los microorganismos modificados o la planta modificada bajo condiciones adecuadas (tal como aquellas descritas anteriormente) y se analiza el medio y/o los componentes celulares para la producción elevada del producto deseado (es decir de los lípidos o un ácido graso). Estas técnicas analíticas se conocen por el experto y comprenden espectroscopía, cromatografía de capa delgada, diversos tipos de métodos de tinción, métodos enzimáticos y microbiológicos y cromatografía analítica tal como cromatografía líquida de alto desempeño (ver, por ejemplo, Ullman, Encyclopedia of Industrial Chemistry, Vol. A2, p. 89-90 y p. 443-613, VCH: Weinheim (1985); Fallon, A., et al., (1987) "Applications of HPLC in Biochemistry" in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 17; Rehm et al. (1993) Biotechnology, Vol. 3, Chapter III: "Product recovery and purification", p. 469-714, VCH: Weinheim; Belter, P.A., et al. (1988) Bioseparations: downstream processing for Biotechnology, John Wiley and Sons; Kennedy, J.F., y Cabral, J.M.S. (1992) Recovery processes for biological Materials, John Wiley and Sons; Shaeiwitz, J.A., y Henry, J.D. (1988) Biochemical Separations, in: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Vol. B3; Chapter 11, p. 1-27, VCH: Weinheim; y Dechow, F.J. (1989) Separation and purification techniques in biotechnology, Noyes Publications).

Además de los procesos mencionados anteriormente, los lípidos de planta se extraen del material de planta como se describe por Cahoon et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (22):12935-12940 y Browse et al. (1986) Analytic Biochemistry 152:141-145. Los análisis cualitativo y cuantitativo de los lípidos o ácidos grasos se describe por Christie, William W., Advances in Lipid Methodology, Ayr/Scotland: Oily Press (Oily Press Lipid Library; 2); Christie, William W., Gas Chromatography and Lipids. A Practical Guide - Ayr, Scotland: Oily Press, 1989, Repr. 1992, IX, 307 pp. (Oily Press Lipid Library; 1); "Progress in Lipid Research, Oxford: Pergamon Press, 1 (1952) - 16 (1977) bajo el título: Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids CODEN.

Un ejemplo es el análisis de ácidos grasos (abreviaturas: FAME, metil éster de ácido graso; GC-MS, cromatografía líquida de gas/espectrometría de masa; TAG, triacilglicerol; TLC, cromatografía de capa delgada).

La detección no ambigua para la presencia de productos de ácido graso se puede obtener al analizar los organismos recombinantes utilizando métodos estándar analíticos: GC, GC-MS o TLC, como lo describe en varias ocasiones Christie y las referencias allí (1997, en: Advances on Lipid Methodology, Fourth Edition: Christie, Oily Press, Dundee, 119-169; 1998, Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Verfahren [Gas chromatography/mass spectrometric methods], Lipid 33:343-353).

El material que se va a analizar se puede alterar mediante sonicación, molido en un molino en vidrio, nitrógeno líquido y molido por medio de otros métodos aplicables. Después de alteración, el material se puede centrifugar. El sedimento se resuspende en agua destilada, se calienta durante 10 minutos a 100° C, se enfría en hielo y se vuelve a centrifugar, seguido por extracción durante una hora a 90° C en ácido sulfúrico 0.5 M en metanol con 2 % de dimetoxipropano, que conduce a aceite hidrolizado y compuestos de lípido, que da los lípidos transmetilados. Estos metil ésteres de ácido graso se extraen en éter petróleo y finalmente se someten a un análisis GC utilizando una columna capilar (Chrompack, Sílice fusionada WCOT, CP-Wax-52 CB, 25 mm, 0.32 mm) en un gradiente de temperatura de entre 170° C y 240° C durante 20 minutos y 5 minutos a 240° C. La identidad de los metil ésteres de ácido graso resultantes se puede definir utilizando estándares, que están disponibles de fuentes disponibles (es decir Sigma).

El material de planta se homogeniza inicialmente mecánicamente al triturar en un mortero y pistilo para hacerlo más agradable para extracción.

Esto se sigue al calentar a 100° C durante 10 minutos y, después enfriar en hielo, mediante resedimentación. El sedimento celular se hidroliza durante una hora a 90° C con 1 M ácido sulfúrico metanólico y 2 % de dimetoxipropano, y los lípidos se transmetilan. Los metil ésteres de ácido graso resultantes (FAME) se extraen en éter petróleo. Los FAME extraídos se analizan mediante cromatografía líquida a gas utilizando una columna capilar (Chrompack, Sílice fusionada WCOT, CPWax- 52 CB, 25 m, 0.32 mm) y un gradiente de temperatura de 170° C a 240° C en 20 minutos y 5 minutos a 240° C. La identidad de los metil ésteres de ácido graso se confirma mediante comparación con los estándares FAME correspondientes (Sigma). La identidad y posición del enlace doble se puede analizar adicionalmente mediante derivatización química adecuada de las mezclas FAME, por ejemplo para dar derivados 4,4-dimetoxioxazolona (Christie, 1998) por medio de GC-MS.

El material de hoja de Arabidopsis thaliana Col0 transgénica y super-transformantes de estirpe transgénica CA1-9 ambas transformadas con la construcción pBIN1935S-8Ac se analizan mediante cromatografía de gas de los derivados metil éster como se describió anteriormente. Se confirman las identidades mediante GC-MS y co-migración con estándares auténticos. Los índices de conversión se muestran en la siguiente tabla 6:

Tabla 6: Índice de conversión con AcD8 (delta-8-desaturasa de Acanthamoeba castellanii) de diferentes sustratos

Ácidos grasos	% de ácidos grasos totales	% de conversión de sustrato
20:2Δ ^{11, 14}	1.1	-
20:3Δ ^{8, 11, 14}	1.9	63
20:2Δ ^{11, 14, 17}	1.3	-
20:2Δ ^{8, 11, 14, 17}	0.8	40

La Figure 6 muestra el resultado con la estirpe CA1-9. En la Arabidopsis doble transgénica se puede mostrar una actividad clara de Ac8 mediante la conversión del presente 20:2Δ^{11, 14} o 20:3Δ^{11, 14, 17} en 20:3Δ^{8, 11, 14} o 20:4Δ^{8, 11, 14, 17}, los precursores de ácido araquidónico o ácido eicosapentanoico.

Adicionalmente se hacen perfiles Acil-CoA de las hojas de Arabidopsis de Arabidopsis tipo natural (Figura 7 A), Arabidopsis Δ9elo (Figura 7 B) y Arabidopsis Δ9eloΔ8des (Figura 7 C) utilizando el método de Larson et al. [Plant J.

2002 Nov;32(4):519-27]. Los resultados de las mediciones se muestran en la Figura 7 y demuestran de nuevo la funcionalidad de 8Ac en plantas.

Equivalentes:

5 Se pueden identificar muchos equivalentes de las realizaciones específicas de acuerdo con la invención descrita aquí o se encuentra por el experto recurriendo simplemente a experimentos de rutina. Se pretende que estos equivalentes caigan dentro del alcance de las reivindicaciones de patente.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Rothamsted Research

10 <120> Proceso para la producción de ácido araquidónico y/o ácido eicosapentanoico

<130> PF57175

<140> 20050119

<141> 2005-12-10

<160> 52

15 <170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1266

<212> ADN

<213> Euglena gracilis

20 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(1266)

<223> Delta-8-Desaturasa

<400> 1

atg aag tca aag cgc caa gcg ctt ccc ctt aca att gat gga aca aca 48
Met Lys Ser Lys Arg Gln Ala Leu Pro Leu Thr Ile Asp Gly Thr Thr
1 5 10 15

tat gat gtg tct gcc tgg gtc aat ttc cac cct ggt ggt gcg gaa att 96
Tyr Asp Val Ser Ala Trp Val Asn Phe His Pro Gly Gly Ala Glu Ile
20 25 30

ata gag aat tac caa gga agg gat gcc act gat gcc ttc atg gtt atg 144
Ile Glu Asn Tyr Gln Gly Arg Asp Ala Thr Asp Ala Phe Met Val Met
35 40 45

cac tct caa gaa gcc ttc gac aag ctc aag cgc atg ccc aaa atc aat 192
His Ser Gln Glu Ala Phe Asp Lys Leu Lys Arg Met Pro Lys Ile Asn
50 55 60

25 ccc agt tct gag ttg cca ccc cag gct gca gtg aat gaa gct caa gag 240

ES 2 380 052 T3

Pro 65	Ser	Ser	Glu	Leu	Pro 70	Pro	Gln	Ala	Ala	Val 75	Asn	Glu	Ala	Gln	Glu 80	
gat Asp	ttc Phe	cgg Arg	aag Lys	ctc Leu 85	cga Arg	gaa Glu	gag Glu	ttg Leu	atc Ile 90	gca Ala	act Thr	ggc Gly	atg Met	ttt Phe 95	gat Asp	288
gcc Ala	tcc Ser	ccc Pro	ctc Leu 100	tgg Trp	tac Tyr	tca Ser	tac Tyr	aaa Lys 105	atc Ile	agc Ser	acc Thr	aca Thr	ctg Leu 110	ggc Gly	ctt Leu	336
gga Gly	gtg Val	ctg Leu 115	ggt Gly	tat Tyr	ttc Phe	ctg Leu	atg Met 120	gtt Val	cag Gln	tat Tyr	cag Gln	atg Met 125	tat Tyr	ttc Phe	att Ile	384
ggg Gly	gca Ala 130	gtg Val	ttg Leu	ctt Leu	ggg Gly 135	atg Met 135	cac His	tat Tyr	caa Gln	cag Gln	atg Met 140	ggc Gly	tgg Trp	ctt Leu	tct Ser	432
cat His 145	gac Asp	att Ile	tgc Cys	cac His	cac His 150	cag Gln	act Thr	ttc Phe	aag Lys	aac Asn 155	cgg Arg	aac Asn	tgg Trp	aac Asn 160	aac Asn 160	480
ctc Leu	gtg Val	gga Gly	ctg Leu	gta Val 165	ttt Phe	ggc Gly	aat Asn	ggt Gly	ctg Leu 170	caa Gln	ggt Gly	ttt Phe	tcc Ser	gtg Val 175	aca Thr	528
tgc Cys	tgg Trp	aag Lys	gac Asp 180	aga Arg	cac His	aat Asn	gca Ala	cat His 185	cat His	tcg Ser	gca Ala	acc Thr	aat Asn 190	gtt Val	caa Gln	576
ggg Gly	cac His	gac Asp 195	cct Pro	gat Asp	att Ile	gac Asp	aac Asn 200	ctc Leu	ccc Pro	ctc Leu	tta Leu	gcc Ala 205	tgg Trp	tct Ser	gag Glu	624
gat Asp	gac Asp 210	gtc Val	aca Thr	cgg Arg	gcg Ala	tca Ser 215	ccg Pro	att Ile	tcc Ser	cgc Arg	aag Lys 220	ctc Leu	att Ile	cag Gln	ttc Phe	672
cag Gln 225	cag Gln	tat Tyr	tat Tyr	ttc Phe	ttg Leu 230	gtc Val	atc Ile	tgt Cys	atc Ile	ttg Leu 235	ttg Leu	cgg Arg	ttc Phe	att Ile	tgg Trp 240	720
tgt Cys	ttc Phe	cag Gln	agc Ser	gtg Val 245	ttg Leu	acc Thr	gtg Val	cgc Arg	agt Ser 250	ctg Leu	aag Lys	gac Asp	aga Arg	gat Asp 255	aac Asn 255	768
caa Gln	ttc Phe	tat Tyr	cgc Arg	tct Ser	cag Gln	tat Tyr	aag Lys	aag Lys 265	gag Glu	gcc Ala	att Ile	ggc Gly	ctc Leu 270	gcc Ala	ctg Leu	816
cat His	tgg Trp	aca Thr 275	ttg Leu	aag Lys	gcc Ala	ctg Leu	ttc Phe 280	cac His	tta Leu	ttc Phe	ttt Phe 285	atg Met 285	ccc Pro	agc Ser	atc Ile	864
ctc Leu	aca Thr 290	tcg Ser	ctg Leu	ttg Leu	gta Val 295	ttt Phe 295	ttc Phe	gtt Val	tcg Ser	gag Glu	ctg Leu 300	gtt Val	ggc Gly	ggc Gly	ttc Phe	912
ggc Gly 305	att Ile	gcg Ala	atc Ile	gtg Val	gtg Val 310	ttc Phe	atg Met	aac Asn	cac His	tac Tyr 315	cca Pro	ctg Leu	gag Glu	aag Lys	atc Ile 320	960
ggg Gly	gac Asp	tcg Ser	gtc Val	tgg Trp 325	gat Asp	ggc Gly	cat His	gga Gly	ttc Phe 330	tcg Ser	gtt Val	ggc Gly	cag Gln	atc Ile 335	cat His	1008
gag Glu	acc Thr	atg Met	aac Asn	att Ile	cgg Arg	cga Arg	ggg Gly	att Ile	atc Ile	aca Thr	gat Asp	tgg Trp	ttt Phe	ttc Phe	gga Gly	1056

ES 2 380 052 T3

```

          340              345              350
.ggc ttg aac tac cag atc gag cac cat ttg tgg ccg acc ctc cct cgc 1104
Gly Leu Asn Tyr Gln Ile Glu His His Leu Trp Pro Thr Leu Pro Arg
          355              360              365

cac aac ctg aca gcg gtt agc tac cag gtg gaa cag ctg tgc cag aag 1152
His Asn Leu Thr Ala Val Ser Tyr Gln Val Glu Gln Leu Cys Gln Lys
          370              375              380

cac aac ctg ccg tat cgg aac ccg ctg ccc cat gaa ggg ttg gtc atc 1200
His Asn Leu Pro Tyr Arg Asn Pro Leu Pro His Glu Gly Leu Val Ile
          385              390              395              400

ctg ctg cgc tat ctg gcg gtg ttc gcc cgg atg gcg gag aag caa ccc 1248
Leu Leu Arg Tyr Leu Ala Val Phe Ala Arg Met Ala Glu Lys Gln Pro
          405              410              415

gcg ggg aag gct cta taa 1266
Ala Gly Lys Ala Leu
          420

```

<210> 2

<211> 421

<212> PRT

5 <213> *Euglena gracilis*

<400> 2

```

Met Lys Ser Lys Arg Gln Ala Leu Pro Leu Thr Ile Asp Gly Thr Thr
 1              5              10              15

Tyr Asp Val Ser Ala Trp Val Asn Phe His Pro Gly Gly Ala Glu Ile
          20              25              30

Ile Glu Asn Tyr Gln Gly Arg Asp Ala Thr Asp Ala Phe Met Val Met
          35              40              45

His Ser Gln Glu Ala Phe Asp Lys Leu Lys Arg Met Pro Lys Ile Asn
 50              55              60

Pro Ser Ser Glu Leu Pro Pro Gln Ala Ala Val Asn Glu Ala Gln Glu
 65              70              75              80

Asp Phe Arg Lys Leu Arg Glu Glu Leu Ile Ala Thr Gly Met Phe Asp
          85              90              95

Ala Ser Pro Leu Trp Tyr Ser Tyr Lys Ile Ser Thr Thr Leu Gly Leu
          100              105              110

Gly Val Leu Gly Tyr Phe Leu Met Val Gln Tyr Gln Met Tyr Phe Ile
          115              120              125

Gly Ala Val Leu Leu Gly Met His Tyr Gln Gln Met Gly Trp Leu Ser
          130              135              140

```

ES 2 380 052 T3

His Asp Ile Cys His His Gln Thr Phe Lys Asn Arg Asn Trp Asn Asn
 145 150 155 160

Leu Val Gly Leu Val Phe Gly Asn Gly Leu Gln Gly Phe Ser Val Thr
 165 170 175

Cys Trp Lys Asp Arg His Asn Ala His His Ser Ala Thr Asn Val Gln
 180 185 190

Gly His Asp Pro Asp Ile Asp Asn Leu Pro Leu Leu Ala Trp Ser Glu
 195 200 205

Asp Asp Val Thr Arg Ala Ser Pro Ile Ser Arg Lys Leu Ile Gln Phe
 210 215 220

Gln Gln Tyr Tyr Phe Leu Val Ile Cys Ile Leu Leu Arg Phe Ile Trp
 225 230 235 240

Cys Phe Gln Ser Val Leu Thr Val Arg Ser Leu Lys Asp Arg Asp Asn
 245 250 255

Gln Phe Tyr Arg Ser Gln Tyr Lys Lys Glu Ala Ile Gly Leu Ala Leu
 260 265 270

His Trp Thr Leu Lys Ala Leu Phe His Leu Phe Phe Met Pro Ser Ile
 275 280 285

Leu Thr Ser Leu Leu Val Phe Phe Val Ser Glu Leu Val Gly Gly Phe
 290 295 300

Gly Ile Ala Ile Val Val Phe Met Asn His Tyr Pro Leu Glu Lys Ile
 305 310 315 320

Gly Asp Ser Val Trp Asp Gly His Gly Phe Ser Val Gly Gln Ile His
 325 330 335

Glu Thr Met Asn Ile Arg Arg Gly Ile Ile Thr Asp Trp Phe Phe Gly
 340 345 350

Gly Leu Asn Tyr Gln Ile Glu His His Leu Trp Pro Thr Leu Pro Arg
 355 360 365

His Asn Leu Thr Ala Val Ser Tyr Gln Val Glu Gln Leu Cys Gln Lys
 370 375 380

His Asn Leu Pro Tyr Arg Asn Pro Leu Pro His Glu Gly Leu Val Ile
 385 390 395 400

Leu Leu Arg Tyr Leu Ala Val Phe Ala Arg Met Ala Glu Lys Gln Pro
 405 410 415

Ala Gly Lys Ala Leu
 420

<210> 3

<211> 1374

5 <212> ADN

<213> Acanthamoeba castellanii

<220>

ES 2 380 052 T3

<221> CDS

<222> (1)..(1374)

<223> Delta-8-Desaturasa

<400> 3

atg gtc ctc aca acc ccg gcc ctc aac ctg aag aag gaa cga acg tcg	48
Met Val Leu Thr Thr Pro Ala Leu Asn Leu Lys Lys Glu Arg Thr Ser	
1 5 10 15	
ttc acc cag gag gag ctt tcc aag ctc tgg gtc ctt cac ggc cag gtg	96
Phe Thr Gln Glu Glu Leu Ser Lys Leu Trp Val Leu His Gly Gln Val	
20 25 30	
tac gat ttc acc gac ttt gtc aag tac cac ccg gcc ggc agc agg gcc	144
Tyr Asp Phe Thr Asp Phe Val Lys Tyr His Pro Ala Gly Ser Arg Ala	
35 40 45	
atc ctg ctc ggc cgt ggc cgt gat tgt acc gtg ctc ttc gag tcc tac	192
Ile Leu Leu Gly Arg Gly Arg Asp Cys Thr Val Leu Phe Glu Ser Tyr	
50 55 60	
cac aca gtc ctg cct tcc gat gct ctt ctc gag aag tac cgc gtc tct	240
His Thr Val Leu Pro Ser Asp Ala Leu Leu Glu Lys Tyr Arg Val Ser	
65 70 75 80	
gct ccc aac gcc aag ctc gag gag agc cgg tca gcc aag ctg ttc tcg	288
Ala Pro Asn Ala Lys Leu Glu Glu Ser Arg Ser Ala Lys Leu Phe Ser	
85 90 95	
ttc gag gag ggt agc ttc tac cga acc ctc aag cag cga acg cgc gag	336
Phe Glu Glu Gly Ser Phe Tyr Arg Thr Lys Leu Lys Gln Arg Thr Arg Glu	
100 105 110	
tac ttc aag acc aac aac ctg agc acc aag gcc acc acg atg gag gtc	384
Tyr Phe Lys Thr Asn Asn Leu Ser Thr Lys Ala Thr Thr Met Glu Val	
115 120 125	
atc tac ttc gtg gcc acc atc ctc agc atc tac ttc tgc acg tgg gcc	432
Ile Tyr Phe Val Ala Thr Ile Leu Ser Ile Tyr Phe Cys Thr Trp Ala	
130 135 140	
gcc ttc gtg cag ggt tcc ctc atc gcc gct gtc ctt cac gga gtg ggc	480
Ala Phe Val Gln Gly Ser Leu Ile Ala Ala Val Leu His Gly Val Gly	
145 150 155 160	
cgt gcg atc tgt atc ata caa ccg act cat gcg act tcg cac tac gcc	528
Arg Ala Ile Cys Ile Ile Gln Pro Thr His Ala Thr Ser His Tyr Ala	
165 170 175	

5

ES 2 380 052 T3

atg ttc cgc tca gtg tgg ctc aac cag tgg gcc tac agg atc tcc atg 576
Met Phe Arg Ser Val Trp Leu Asn Gln Trp Ala Tyr Arg Ile Ser Met
180 185 190

gcc gtc agc gga tcg tcg ccg gcc cag tgg acc acc aag cac gtc atc 624
Ala Val Ser Gly Ser Ser Pro Ala Gln Trp Thr Thr Lys His Val Ile
195 200 205

aac cat cac gtc gag acc aac ctg tgc ccc acc gat gac gac acc atg 672
Asn His His Val Glu Thr Asn Leu Cys Pro Thr Asp Asp Thr Met
210 215 220

tac ccc atc aag cgc atc ctg cac gag ttc cct cgt ctg ttc ttc cac 720
Tyr Pro Ile Lys Arg Ile Leu His Glu Phe Pro Arg Leu Phe Phe His
225 230 235 240

aag tac cag cac atc tac atc tgg ctg gtg tac ccc tac acc acc atc 768
Lys Tyr Gln His Ile Tyr Ile Trp Leu Val Tyr Pro Tyr Thr Thr Ile
245 250 255

ttg tgg cac ttc tcc aac ctg gcc aag ctc gcc ctc ggc gcc gct cgc 816
Leu Trp His Phe Ser Asn Leu Ala Lys Leu Ala Leu Gly Ala Ala Arg
260 265 270

ggt cag atg tac gag ggt atc gcc aag gtg agc caa gag acc tcg ggt 864
Gly Gln Met Tyr Glu Gly Ile Ala Lys Val Ser Gln Glu Thr Ser Gly
275 280 285

gac tgg gtg gag acg gcc atg acg ctg ttc ttc ttc acg ttc tcc cgt 912
Asp Trp Val Glu Thr Ala Met Thr Leu Phe Phe Phe Thr Phe Ser Arg
290 295 300

ctg ctg ctg ccc ttc ctg tgc ctg ccc ttc acc acg gcc gcc gcg gtg 960
Leu Leu Leu Pro Phe Leu Cys Leu Pro Phe Thr Thr Ala Ala Ala Val
305 310 315 320

ttc ctg ctc tcc gag tgg acc tgc tcg acc tgg ttc gcg ctg cag ttc 1008
Phe Leu Leu Ser Glu Trp Thr Cys Ser Thr Trp Phe Ala Leu Gln Phe
325 330 335

gcc gtg agc cac gag gtc gac gag tgc gtc gag cac gag aag tcg gtc 1056
Ala Val Ser His Glu Val Asp Glu Cys Val Glu His Glu Lys Ser Val
340 345 350

ctc gac acc ctc aag gcc aac gag gcc aag ggc atc gtc aac cag ggc 1104
Leu Asp Thr Leu Lys Ala Asn Glu Ala Lys Gly Ile Val Asn Gln Gly
355 360 365

ggc ctc gtc gac tgg ggc gcc cac cag gtt cgg gcc tcg cac aac tac 1152
Gly Leu Val Asp Trp Gly Ala His Gln Val Arg Ala Ser His Asn Tyr
370 375 380

tct gcc gac tcc ctg ctg tcg ctc cac ttc agc ggt ggc ctc aac ctt 1200
Ser Ala Asp Ser Leu Leu Ser Leu His Phe Ser Gly Gly Leu Asn Leu
385 390 395 400

cag atc gag cac cac ctc ttc ccc tcc gtc cac tac act cac tac cct 1248
Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Ser Val His Tyr Thr His Tyr Pro
405 410 415

gcc ccg tcc aag att gtg cag cag acg tgc aag gag ttc aac ttg ccc 1296
Ala Pro Ser Lys Ile Val Gln Gln Thr Cys Lys Glu Phe Asn Leu Pro
420 425 430

tgc act ctg tcg ccg tcg atg atg ggt gcc gtg acc aag cac tac cac 1344
Cys Thr Leu Ser Pro Ser Met Met Gly Ala Val Thr Lys His Tyr His
435 440 445

cag ctc aag aag atg ggt gct gag aac tga 1374
Gln Leu Lys Lys Met Gly Ala Glu Asn
450 455

<210> 4

<211> 457

5 <212> PRT

<213> Acanthamoeba castellanii

ES 2 380 052 T3

<400> 4

Met Val Leu Thr Thr Pro Ala Leu Asn Leu Lys Lys Glu Arg Thr Ser
 1 5 10 15

Phe Thr Gln Glu Glu Leu Ser Lys Leu Trp Val Leu His Gly Gln Val
 20 25 30

Tyr Asp Phe Thr Asp Phe Val Lys Tyr His Pro Ala Gly Ser Arg Ala
 35 40 45

Ile Leu Leu Gly Arg Gly Arg Asp Cys Thr Val Leu Phe Glu Ser Tyr
 50 55 60

His Thr Val Leu Pro Ser Asp Ala Leu Leu Glu Lys Tyr Arg Val Ser
 65 70 75 80

Ala Pro Asn Ala Lys Leu Glu Glu Ser Arg Ser Ala Lys Leu Phe Ser
 85 90 95

Phe Glu Glu Gly Ser Phe Tyr Arg Thr Leu Lys Gln Arg Thr Arg Glu
 100 105 110

Tyr Phe Lys Thr Asn Asn Leu Ser Thr Lys Ala Thr Thr Met Glu Val
 115 120 125

Ile Tyr Phe Val Ala Thr Ile Leu Ser Ile Tyr Phe Cys Thr Trp Ala
 130 135 140

Ala Phe Val Gln Gly Ser Leu Ile Ala Ala Val Leu His Gly Val Gly
 145 150 155 160

Arg Ala Ile Cys Ile Ile Gln Pro Thr His Ala Thr Ser His Tyr Ala
 165 170 175

Met Phe Arg Ser Val Trp Leu Asn Gln Trp Ala Tyr Arg Ile Ser Met
 180 185 190

Ala Val Ser Gly Ser Ser Pro Ala Gln Trp Thr Thr Lys His Val Ile
 195 200 205

ES 2 380 052 T3

Asn His His Val Glu Thr Asn Leu Cys Pro Thr Asp Asp Asp Thr Met
 210 215 220

Tyr Pro Ile Lys Arg Ile Leu His Glu Phe Pro Arg Leu Phe Phe His
 225 230 235 240

Lys Tyr Gln His Ile Tyr Ile Trp Leu Val Tyr Pro Tyr Thr Thr Ile
 245 250 255

Leu Trp His Phe Ser Asn Leu Ala Lys Leu Ala Leu Gly Ala Ala Arg
 260 265 270

Gly Gln Met Tyr Glu Gly Ile Ala Lys Val Ser Gln Glu Thr Ser Gly
 275 280 285

Asp Trp Val Glu Thr Ala Met Thr Leu Phe Phe Phe Thr Phe Ser Arg
 290 295 300

Leu Leu Leu Pro Phe Leu Cys Leu Pro Phe Thr Thr Ala Ala Ala Val
 305 310 315 320

Phe Leu Leu Ser Glu Trp Thr Cys Ser Thr Trp Phe Ala Leu Gln Phe
 325 330 335

Ala Val Ser His Glu Val Asp Glu Cys Val Glu His Glu Lys Ser Val
 340 345 350

Leu Asp Thr Leu Lys Ala Asn Glu Ala Lys Gly Ile Val Asn Gln Gly
 355 360 365

Gly Leu Val Asp Trp Gly Ala His Gln Val Arg Ala Ser His Asn Tyr
 370 375 380

Ser Ala Asp Ser Leu Leu Ser Leu His Phe Ser Gly Gly Leu Asn Leu
 385 390 395 400

Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Ser Val His Tyr Thr His Tyr Pro
 405 410 415

Ala Pro Ser Lys Ile Val Gln Gln Thr Cys Lys Glu Phe Asn Leu Pro
 420 425 430

Cys Thr Leu Ser Pro Ser Met Met Gly Ala Val Thr Lys His Tyr His
 435 440 445

Gln Leu Lys Lys Met Gly Ala Glu Asn
 450 455

<210> 5

<211> 1374

<212> ADN

5 <213> Acanthamoeba castellanii

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1374).

<223> Delta-8-Desaturasa

10 <400> 5

ES 2 380 052 T3

atg gtc ctc aca acc ccg gcc ctc aac ctg aag aag gaa cga acg tcg Met Val Leu Thr Thr Pro Ala Leu Asn Leu Lys Lys Glu Arg Thr Ser 1 5 10 15	48
ttc acc cag gag gag ctt tcc aag ctc tgg gtc ctt cac ggc cag gtg Phe Thr Gln Glu Glu Leu Ser Lys Leu Trp Val Leu His Gly Gln Val 20 25 30	96
tac gat ttc acc gac ttt gtc aag tac cac ccg ggc ggc agc agg gcc Tyr Asp Phe Thr Asp Phe Val Lys Tyr His Pro Gly Gly Ser Arg Ala 35 40 45	144
atc ctg ctc ggc cgt ggc cgt gat tgt acc gtg ctc ttc gag tcc tac Ile Leu Leu Gly Arg Gly Arg Asp Cys Thr Val Leu Phe Glu Ser Tyr 50 55 60	192
cac aca gtc ctg cct tcc gat gct ctt ctc gag aag tac cgc gtc tct His Thr Val Leu Pro Ser Asp Ala Leu Leu Glu Lys Tyr Arg Val Ser 65 70 80	240
gct ccc aac gcc aag ctc gag gag agc cgg tca gcc aag ctg ttc tcg Ala Pro Asn Ala Lys Leu Glu Glu Ser Arg Ser Ala Lys Leu Phe Ser 85 90 95	288
ttc gag gag ggt agc ttc tac cga acc ctc aag cag cga acg cgc gag Phe Glu Glu Gly Ser Phe Tyr Arg Thr Lys Leu Lys Gln Arg Thr Arg Glu 100 105 110	336
tac ttc aag acc aac aac ctg agc acc aag gcc acc acg atg gag gtc Tyr Phe Lys Thr Asn Asn Leu Ser Thr Lys Ala Thr Thr Met Glu Val 115 120 125	384
atc tac ttc gtg gcc acc atc ctc agc atc tac ttc tgc acg tgg gcc Ile Tyr Phe Val Ala Thr Ile Leu Ser Ile Tyr Phe Cys Thr Trp Ala 130 135 140	432
gcc ttc gtg cag ggt tcc ctc atc gcc gct gtc ctt cac gga gtg ggc Ala Phe Val Gln Gly Ser Leu Ile Ala Ala Val Leu His Gly Val Gly 145 150 155 160	480
cgt gcg atc tgt atc ata caa ccg act cat gcg act tcg cac tac gcc Arg Ala Ile Cys Ile Ile Gln Pro Thr His Ala Thr Ser His Tyr Ala 165 170 175	528
atg ttc cgc tca gtg tgg ctc aac cag tgg gcc tac agg atc tcc atg Met Phe Arg Ser Val Trp Leu Asn Gln Trp Ala Tyr Arg Ile Ser Met 180 185 190	576
gcc gtc agc gga tcg tcg ccg gcc cag tgg acc acc aag cac gtc atc Ala Val Ser Gly Ser Ser Pro Ala Gln Trp Thr Thr Lys His Val Ile 195 200 205	624
aac cat cac gtc gag acc aac ctg tgc ccc acc gat gac gac acc atg	672

ES 2 380 052 T3

Asn His His Val Glu Thr Asn Leu Cys Pro Thr Asp Asp Asp Thr Met
 210 215 220
 tac ccc atc aag cgc atc ctg cac gag ttc cct cgt ctg ttc ttc cac 720
 Tyr Pro Ile Lys Arg Ile Leu His Glu Phe Pro Arg Leu Phe Phe His
 225 230 235 240
 aag tac cag cac atc tac atc tgg ctg gtg tac ccc tac acc acc atc 768
 Lys Tyr Gln His Ile Tyr Ile Trp Leu Val Tyr Pro Tyr Thr Thr Ile
 245 250 255
 ttg tgg cac ttc tcc aac ctg gcc aag ctc gcc ctc ggc gcc gct cgc 816
 Leu Trp His Phe Ser Asn Leu Ala Lys Leu Ala Leu Gly Ala Ala Arg
 260 265 270
 ggt cag atg tac gag ggt atc gcc aag gtg agc caa gag acc tcg ggt 864
 Gly Gln Met Tyr Glu Gly Ile Ala Lys Val Ser Gln Glu Thr Ser Gly
 275 280 285
 gac tgg gtg gag acg gcc atg acg ctg ttc ttc ttc acg ttc tcc cgt 912
 Asp Trp Val Glu Thr Ala Met Thr Leu Phe Phe Phe Thr Phe Ser Arg
 290 295 300
 ctg ctg ctg ccc ttc ctg tgc ctg ccc ttc acc acg gcc gcc gcg gtg 960
 Leu Leu Leu Pro Phe Leu Cys Leu Pro Phe Thr Thr Ala Ala Ala Val
 305 310 315 320
 ttc ctg ctc tcc gag tgg acc tgc tcg acc tgg ttc gcg ctg cag ttc 1008
 Phe Leu Leu Ser Glu Trp Thr Cys Ser Thr Trp Phe Ala Leu Gln Phe
 325 330 335
 gcc gtg agc cac gag gtc gac gag tgc gtc gag cac gag aag tcg gtc 1056
 Ala Val Ser His Glu Val Asp Glu Cys Val Glu His Glu Lys Ser Val
 340 345 350
 ctc gac acc ctc aag gcc aac gag gcc aag ggc atc gtc aac cag ggc 1104
 Leu Asp Thr 355 Leu Lys Ala Asn Glu Ala Lys Gly Ile Val Asn Gln Gly
 360 365
 ggc ctc gtc gac tgg ggc gcg cac cag gtt cgg gcc tcg cac aac tac 1152
 Gly Leu Val Asp Trp Gly Ala His Gln Val Arg Ala Ser His Asn Tyr
 370 375 380
 tct gcc gac tcc ctg ctg tcg ctc cac ttc agc ggt ggc ctc aac ctt 1200
 Ser Ala Asp Ser Leu Leu Ser Leu His Phe Ser Gly Gly Leu Asn Leu
 385 390 395 400
 cag atc gag cac cac ctc ttc ccc tcc gtc cac tac act cac tac cct 1248
 Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Ser Val His Tyr Thr His Tyr Pro
 405 410 415
 gcc ccg tcc aag att gtg cag cag acg tgc aag gag ttc aac ttg ccc 1296
 Ala Pro Ser Lys Ile Val Gln Gln Thr Cys Lys Glu Phe Asn Leu Pro
 420 425 430
 tgc act ctg tcg ccg tcg atg atg ggt gcc gtg acc aag cac tac cac 1344
 Cys Thr Leu Ser Pro Ser Met Met Gly Ala Val Thr Lys His Tyr His
 435 440 445
 cag ctc aag aag atg ggt gct gag aac tga 1374
 Gln Leu Lys Lys Met Gly Ala Glu Asn
 450 455

<210> 6

<211> 457

<212> PRT

5 <213> Acanthamoeba castellanii

<400> 6

ES 2 380 052 T3

Met Val Leu Thr Thr Pro Ala Leu Asn Leu Lys Lys Glu Arg Thr Ser
1 5 10 15

Phe Thr Gln Glu Glu Leu Ser Lys Leu Trp Val Leu His Gly Gln Val
20 25 30

Tyr Asp Phe Thr Asp Phe Val Lys Tyr His Pro Gly Gly Ser Arg Ala
35 40 45

Ile Leu Leu Gly Arg Gly Arg Asp Cys Thr Val Leu Phe Glu Ser Tyr
50 55 60

His Thr Val Leu Pro Ser Asp Ala Leu Leu Glu Lys Tyr Arg Val Ser
65 70 75 80

Ala Pro Asn Ala Lys Leu Glu Glu Ser Arg Ser Ala Lys Leu Phe Ser
85 90 95

Phe Glu Glu Gly Ser Phe Tyr Arg Thr Leu Lys Gln Arg Thr Arg Glu
100 105 110

Tyr Phe Lys Thr Asn Asn Leu Ser Thr Lys Ala Thr Thr Met Glu Val
115 120 125

Ile Tyr Phe Val Ala Thr Ile Leu Ser Ile Tyr Phe Cys Thr Trp Ala
130 135 140

Ala Phe Val Gln Gly Ser Leu Ile Ala Ala Val Leu His Gly Val Gly
145 150 155 160

Arg Ala Ile Cys Ile Ile Gln Pro Thr His Ala Thr Ser His Tyr Ala
165 170 175

Met Phe Arg Ser Val Trp Leu Asn Gln Trp Ala Tyr Arg Ile Ser Met
180 185 190

Ala Val Ser Gly Ser Ser Pro Ala Gln Trp Thr Thr Lys His Val Ile
195 200 205

Asn His His Val Glu Thr Asn Leu Cys Pro Thr Asp Asp Asp Thr Met
210 215 220

Tyr Pro Ile Lys Arg Ile Leu His Glu Phe Pro Arg Leu Phe Phe His
225 230 235 240

Lys Tyr Gln His Ile Tyr Ile Trp Leu Val Tyr Pro Tyr Thr Thr Ile
245 250 255

ES 2 380 052 T3

Leu Trp His Phe Ser Asn Leu Ala Lys Leu Ala Leu Gly Ala Ala Arg
 260 265 270

Gly Gln Met Tyr Glu Gly Ile Ala Lys Val Ser Gln Glu Thr Ser Gly
 275 280 285

Asp Trp Val Glu Thr Ala Met Thr Leu Phe Phe Phe Thr Phe Ser Arg
 290 295 300

Leu Leu Leu Pro Phe Leu Cys Leu Pro Phe Thr Thr Ala Ala Ala Val
 305 310 315 320

Phe Leu Leu Ser Glu Trp Thr Cys Ser Thr Trp Phe Ala Leu Gln Phe
 325 330 335

Ala Val Ser His Glu Val Asp Glu Cys Val Glu His Glu Lys Ser Val
 340 345 350

Leu Asp Thr Leu Lys Ala Asn Glu Ala Lys Gly Ile Val Asn Gln Gly
 355 360 365

Gly Leu Val Asp Trp Gly Ala His Gln Val Arg Ala Ser His Asn Tyr
 370 375 380

Ser Ala Asp Ser Leu Leu Ser Leu His Phe Ser Gly Gly Leu Asn Leu
 385 390 395 400

Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Ser Val His Tyr Thr His Tyr Pro
 405 410 415

Ala Pro Ser Lys Ile Val Gln Gln Thr Cys Lys Glu Phe Asn Leu Pro
 420 425 430

Cys Thr Leu Ser Pro Ser Met Met Gly Ala Val Thr Lys His Tyr His
 435 440 445

Gln Leu Lys Lys Met Gly Ala Glu Asn
 450 455

<210> 7

<211> 1236

<212> ADN

5 <213> Perkinsus marinus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1236)

<223> Delta-8-Desaturasa

10 <400> 7

ES 2 380 052 T3

atg	tct	tct	ctt	acc	ctc	tac	aga	ggc	ccc	ttt	tcc	cga	atg	gtg	ctc	48
Met	Ser	Ser	Leu	Thr	Leu	Tyr	Arg	Gly	Pro	Phe	Ser	Arg	Met	Val	Leu	
1			5					10					15			
cct	cgt	cag	gaa	atc	tgc	atc	gat	ggt	cgc	ata	tac	gat	gtc	act	gag	96
Pro	Arg	Gln	Glu	Ile	Cys	Ile	Asp	Gly	Arg	Ile	Tyr	Asp	Val	Thr	Glu	
		20					25					30				
ttc	atc	aat	cgt	cat	cca	ggg	ggg	aag	att	atc	ctc	ttc	caa	ggt	ggg	144
Phe	Ile	Asn	Arg	His	Pro	Gly	Gly	Lys	Ile	Ile	Leu	Phe	Gln	Val	Gly	
		35				40					45					
gct	gat	gcc	act	gat	gct	ttt	cgt	gag	ttt	cat	gct	ggc	agt	gag	aag	192
Ala	Asp	Ala	Thr	Asp	Ala	Phe	Arg	Glu	Phe	His	Ala	Gly	Ser	Glu	Lys	
	50				55				60							
gca	gag	aag	atc	ctc	aaa	acc	cta	cca	tcc	cgt	gat	gat	gac	ggt	act	240
Ala	Glu	Lys	Ile	Leu	Lys	Thr	Leu	Pro	Ser	Arg	Asp	Asp	Asp	Gly	Thr	
65				70					75					80		
ttc	ctt	cct	tca	acc	caa	cgc	tcc	atc	atg	gat	gat	ttc	aaa	cgc	cta	288
Phe	Leu	Pro	Ser	Thr	Gln	Arg	Ser	Ile	Met	Asp	Asp	Phe	Lys	Arg	Leu	
			85					90					95			
aga	gat	gac	ctc	gtc	agc	aga	ggt	gtc	ttc	aag	cca	agc	gtc	atg	cat	336
Arg	Asp	Asp	Leu	Val	Ser	Arg	Gly	Val	Phe	Lys	Pro	Ser	Val	Met	His	
			100				105						110			
ggt	gta	tac	cgc	tgc	ttg	gaa	gtc	ggt	gct	ctc	tat	ctc	att	ggc	ttc	384
Val	Val	Tyr	Arg	Cys	Leu	Glu	Val	Val	Ala	Leu	Tyr	Leu	Ile	Gly	Phe	
		115				120					125					
tat	ttg	gct	ctg	tgc	acc	agt	aat	gtg	tac	ggt	ggg	tgt	gct	gta	ctt	432
Tyr	Leu	Ala	Leu	Cys	Thr	Ser	Asn	Val	Tyr	Val	Gly	Cys	Ala	Val	Leu	
	130				135					140						
ggt	gta	gct	caa	ggt	cgt	gct	ggt	tgg	ttg	atg	cat	gaa	gga	ggt	cat	480
Gly	Val	Ala	Gln	Gly	Arg	Ala	Gly	Trp	Leu	Met	His	Glu	Gly	Gly	His	
145				150					155					160		
cac	tct	ctg	act	ggt	aac	tgg	aaa	ggt	gac	cag	ttc	ctc	caa	gaa	cta	528
His	Ser	Leu	Thr	Gly	Asn	Trp	Lys	Val	Asp	Gln	Phe	Leu	Gln	Glu	Leu	
			165				170						175			
ttt	ttc	ggc	att	ggt	tgt	ggt	atg	tca	gct	gcg	tgg	tgg	cgc	aat	gca	576
Phe	Phe	Gly	Ile	Gly	Cys	Gly	Met	Ser	Ala	Ala	Trp	Trp	Arg	Asn	Ala	
		180					185						190			
cac	aac	aag	cat	cac	gct	gct	cct	cag	cat	tta	ggg	aaa	gat	ggt	gat	624
His	Asn	Lys	His	His	Ala	Ala	Pro	Gln	His	Leu	Gly	Lys	Asp	Val	Asp	
		195			200						205					
ctc	gag	aca	ttg	cct	ctg	gtc	gcc	ttc	aat	aag	gcc	gta	ctt	cga	ggc	672
Leu	Glu	Thr	Leu	Pro	Leu	Val	Ala	Phe	Asn	Lys	Ala	Val	Leu	Arg	Gly	
	210				215					220						
cgt	cta	ccg	tct	gtc	tgg	atc	aga	tca	caa	gct	gtg	tgc	ttt	gca	ccg	720
Arg	Leu	Pro	Ser	Val	Trp	Ile	Arg	Ser	Gln	Ala	Val	Cys	Phe	Ala	Pro	
225				230					235					240		
ata	tca	aca	cta	ctg	gta	tcg	ttc	ttt	tgg	caa	ttc	tac	cta	cac	ccg	768
Ile	Ser	Thr	Leu	Leu	Val	Ser	Phe	Phe	Trp	Gln	Phe	Tyr	Leu	His	Pro	
			245						250				255			

ES 2 380 052 T3

agg cat att att agg aca ggt cga cga atg gag tct ttc tgg cta ctc 816
 Arg His Ile Ile Arg Thr Gly Arg Arg Met Glu Ser Phe Trp Leu Leu
 260 265 270

gta cgc tac tta gtt att gtg tac ctc ggg ttc agc tat gga ttg gta 864
 Val Arg Tyr Leu Val Ile Val Tyr Leu Gly Phe Ser Tyr Gly Leu Val
 275 280 285

tcg gtc ttg tta tgt tac atc gca agt gtg cat gtt ggt ggt atg tac 912
 Ser Val Leu Leu Cys Tyr Ile Ala Ser Val His Val Gly Gly Met Tyr
 290 295 300

atc ttt gta cac ttc gct cta tca cat aca cat tta cct gtc att aac 960
 Ile Phe Val His Phe Ala Leu Ser His Thr His Leu Pro Val Ile Asn
 305 310 315 320

cag cat ggt aga gct aac tgg ttg gaa tac gca tct aag cac aca gtt 1008
 Gln His Gly Arg Ala Asn Trp Leu Glu Tyr Ala Ser Lys His Thr Val
 325 330 335

aat gtg tca act aac aat tat ttc gtc aca tgg ctc atg agt tat ttg 1056
 Asn Val Ser Thr Asn Asn Tyr Phe Val Thr Trp Leu Met Ser Tyr Leu
 340 345 350

aat tat caa ata gag cat cat ctc ttc ccg tca tgt ccc cag ttt aga 1104
 Asn Tyr Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Ser Cys Pro Gln Phe Arg
 355 360 365

ttc cct ggt tac gtc agt atg agg gtt cga gaa ttt ttt cat aag cat 1152
 Phe Pro Gly Tyr Val Ser Met Arg Val Arg Glu Phe Phe His Lys His
 370 375 380

gga ttg aag tat aac gag gtc ggc tat cta cat gca ctc aat ctc aca 1200
 Gly Leu Lys Tyr Asn Glu Val Gly Tyr Leu His Ala Leu Asn Leu Thr
 385 390 395 400

ttt tca aat ctg gct gct gtt gcc ata gtg gaa tag 1236
 Phe Ser Asn Leu Ala Ala Val Ala Ile Val Glu
 405 410

<210> 8

<211> 411

<212> PRT

5 <213> Perkinsus marinus

<400> 8

Met Ser Ser Leu Thr Leu Tyr Arg Gly Pro Phe Ser Arg Met Val Leu
 1 5 10 15

Pro Arg Gln Glu Ile Cys Ile Asp Gly Arg Ile Tyr Asp Val Thr Glu
 20 25 30

Phe Ile Asn Arg His Pro Gly Gly Lys Ile Ile Leu Phe Gln Val Gly
 35 40 45

Ala Asp Ala Thr Asp Ala Phe Arg Glu Phe His Ala Gly Ser Glu Lys
 50 55 60

ES 2 380 052 T3

Ala Glu Lys Ile Leu Lys Thr Leu Pro Ser Arg Asp Asp Asp Gly Thr
65 70 75 80

Phe Leu Pro Ser Thr Gln Arg Ser Ile Met Asp Asp Phe Lys Arg Leu
85 90 95

Arg Asp Asp Leu Val Ser Arg Gly Val Phe Lys Pro Ser Val Met His
100 105 110

Val Val Tyr Arg Cys Leu Glu Val Val Ala Leu Tyr Leu Ile Gly Phe
115 120 125

Tyr Leu Ala Leu Cys Thr Ser Asn Val Tyr Val Gly Cys Ala Val Leu
130 135 140

Gly Val Ala Gln Gly Arg Ala Gly Trp Leu Met His Glu Gly Gly His
145 150 155 160

His Ser Leu Thr Gly Asn Trp Lys Val Asp Gln Phe Leu Gln Glu Leu
165 170 175

Phe Phe Gly Ile Gly Cys Gly Met Ser Ala Ala Trp Trp Arg Asn Ala
180 185 190

His Asn Lys His His Ala Ala Pro Gln His Leu Gly Lys Asp Val Asp
195 200 205

Leu Glu Thr Leu Pro Leu Val Ala Phe Asn Lys Ala Val Leu Arg Gly
210 215 220

Arg Leu Pro Ser Val Trp Ile Arg Ser Gln Ala Val Cys Phe Ala Pro
225 230 235 240

Ile Ser Thr Leu Leu Val Ser Phe Phe Trp Gln Phe Tyr Leu His Pro
245 250 255

Arg His Ile Ile Arg Thr Gly Arg Arg Met Glu Ser Phe Trp Leu Leu
260 265 270

Val Arg Tyr Leu Val Ile Val Tyr Leu Gly Phe Ser Tyr Gly Leu Val
275 280 285

Ser Val Leu Leu Cys Tyr Ile Ala Ser Val His Val Gly Gly Met Tyr
290 295 300

Ile Phe Val His Phe Ala Leu Ser His Thr His Leu Pro Val Ile Asn
305 310 315 320

Gln His Gly Arg Ala Asn Trp Leu Glu Tyr Ala Ser Lys His Thr Val
325 330 335

ES 2 380 052 T3

Asn Val Ser Thr Asn Asn Tyr Phe Val Thr Trp Leu Met Ser Tyr Leu
 340 345 350
 Asn Tyr Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Ser Cys Pro Gln Phe Arg
 355 360 365
 Phe Pro Gly Tyr Val Ser Met Arg Val Arg Glu Phe Phe His Lys His
 370 375 380
 Gly Leu Lys Tyr Asn Glu Val Gly Tyr Leu His Ala Leu Asn Leu Thr
 385 390 395 400
 Phe Ser Asn Leu Ala Ala Val Ala Ile Val Glu
 405 410

<210> 9

<211> 777

<212> ADN

5 <213> Isochrysis galbana

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(777)

<223> Delta-9-Elongasa

10 <400> 9

atg gcc ctc gca aac gac gcg gga gag cgc atc tgg gcg gct gtg acc	48
Met Ala Leu Ala Asn Asp Ala Gly Glu Arg Ile Trp Ala Ala Val Thr	
1 5 10 15	
gac ccg gaa atc ctc att ggc acc ttc tcg tac ttg cta ctc aaa ccg	96
Asp Pro Glu Ile Leu Ile Gly Thr Phe Ser Tyr Leu Leu Leu Lys Pro	
20 25 30	
ctg ctc cgc aat tcc ggg ctg gtg gat gag aag aag ggc gca tac agg	144
Leu Leu Arg Asn Ser Gly Leu Val Asp Glu Lys Lys Gly Ala Tyr Arg	
35 40 45	
acg tcc atg atc tgg tac aac gtt ctg ctg gcg ctc ttc tct gcg ctg	192
Thr Ser Met Ile Trp Tyr Asn Val Leu Leu Ala Leu Phe Ser Ala Leu	
50 55 60	
agc ttc tac gtg acg gcg acc gcc ctc ggc tgg gac tat ggt acg ggc	240
Ser Phe Tyr Val Thr Ala Thr Ala Leu Gly Trp Asp Tyr Gly Thr Gly	
65 70 75 80	
gcg tgg ctg cgc agg caa acc ggc gac aca ccg cag ccg ctc ttc cag	288
Ala Trp Leu Arg Arg Gln Thr Gly Asp Thr Pro Gln Pro Leu Phe Gln	
85 90 95	
tgc ccg tcc ccg gtt tgg gac tcg aag ctc ttc aca tgg acc gcc aag	336
Cys Pro Ser Pro Val Trp Asp Ser Lys Leu Phe Thr Trp Thr Ala Lys	
100 105 110	

ES 2 380 052 T3

gca ttc tat tac tcc aag tac gtg gag tac ctc gac acg gcc tgg ctg 384
Ala Phe Tyr Tyr Ser Lys Tyr Val Glu Tyr Leu Asp Thr Ala Trp Leu
115 120 125

agg gtc tcc ttt ctc cag gcc ttc cac cac ttt ggc gcg ccg tgg gat 432
Arg Val Ser Phe Leu Gln Ala Phe His His Phe Gly Ala Pro Trp Asp
130 135 140

gtg tac ctc ggc att cgg ctg cac aac gag ggc gta tgg atc ttc atg 480
Val Tyr Leu Gly Ile Arg Leu His Asn Glu Gly Val Trp Ile Phe Met
145 150 155

ttt ttc aac tcg ttc att cac acc atc atg tac acc tac tac ggc ctc 528
Phe Phe Asn Ser Phe Ile His Thr Ile Met Tyr Thr Tyr Tyr Gly Leu
165 170 175

acc gcc gcc ggg tat aag ttc aag gcc aag ccg ctc atc acc gcg atg 576
Thr Ala Ala Gly Tyr Lys Phe Lys Ala Lys Pro Leu Ile Thr Ala Met
180 185 190

cag atc tgc cag ttc gtg ggc ggc ttc ctg ttg gtc tgg gac tac atc 624
Gln Ile Cys Gln Phe Val Gly Gly Phe Leu Leu Val Trp Asp Tyr Ile
195 200 205

aac gtc ccc tgc ttc aac tcg gac aaa ggg aag ttg ttc agc tgg gct 672
Asn Val Pro Cys Phe Asn Ser Asp Lys Gly Lys Leu Phe Ser Trp Ala
210 215 220

ttc aac tat gca tac gtc ggc tcg gtc ttc ttg ctc ttc tgc cac ttt 720
Phe Asn Tyr Ala Tyr Val Gly Ser Val Phe Leu Leu Phe Cys His Phe
225 230 235 240

ttc tac cag gac aac ttg gca acg aag aaa tcg gcc aag gcg ggc aag 768
Phe Tyr Gln Asp Asn Leu Ala Thr Lys Lys Ser Ala Lys Ala Gly Lys
245 250 255

cag ctc tag 777
Gln Leu

<210> 10

<211> 258

<212> PRT

5 <213> Isochrysis galbana

<400> 10

Met Ala Leu Ala Asn Asp Ala Gly Glu Arg Ile Trp Ala Ala Val Thr
1 5 10 15

Asp Pro Glu Ile Leu Ile Gly Thr Phe Ser Tyr Leu Leu Leu Lys Pro
20 25 30

Leu Leu Arg Asn Ser Gly Leu Val Asp Glu Lys Lys Gly Ala Tyr Arg
35 40 45

Thr Ser Met Ile Trp Tyr Asn Val Leu Leu Ala Leu Phe Ser Ala Leu
50 55 60

ES 2 380 052 T3

Ser Phe Tyr Val Thr Ala Thr Ala Leu Gly Trp Asp Tyr Gly Thr Gly
65 70 75 80

Ala Trp Leu Arg Arg Gln Thr Gly Asp Thr Pro Gln Pro Leu Phe Gln
85 90 95

Cys Pro Ser Pro Val Trp Asp Ser Lys Leu Phe Thr Trp Thr Ala Lys
100 105 110

Ala Phe Tyr Tyr Ser Lys Tyr Val Glu Tyr Leu Asp Thr Ala Trp Leu
115 120 125

Arg Val Ser Phe Leu Gln Ala Phe His His Phe Gly Ala Pro Trp Asp
130 135 140

Val Tyr Leu Gly Ile Arg Leu His Asn Glu Gly Val Trp Ile Phe Met
145 150 155 160

Phe Phe Asn Ser Phe Ile His Thr Ile Met Tyr Thr Tyr Tyr Gly Leu
165 170 175

Thr Ala Ala Gly Tyr Lys Phe Lys Ala Lys Pro Leu Ile Thr Ala Met
180 185 190

Gln Ile Cys Gln Phe Val Gly Gly Phe Leu Leu Val Trp Asp Tyr Ile
195 200 205

Asn Val Pro Cys Phe Asn Ser Asp Lys Gly Lys Leu Phe Ser Trp Ala
210 215 220

Phe Asn Tyr Ala Tyr Val Gly Ser Val Phe Leu Leu Phe Cys His Phe
225 230 235 240

Phe Tyr Gln Asp Asn Leu Ala Thr Lys Lys Ser Ala Lys Ala Gly Lys
245 250 255

Gln Leu

<210> 11

<211> 891

<212> ADN

5 <213> Acanthamoeba castellanii

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(891)

<223> Delta-9-Elongasa

10 <400> 11

ES 2 380 052 T3

atg gcg gct gcg acg gcg acg acg gca acg acg gcg gtg atg gag caa 48
Met Ala Ala Ala Thr Ala Thr Thr Ala Thr Thr Ala Val Met Glu Gln
1 5 10 15

gtg ccc att acg gag gcc atc ttc cgg ccg gac ctc tgg gtc gga cgg 96
Val Pro Ile Thr 20 Glu Ala Ile Phe Arg 25 Pro Asp Leu Trp Val Gly Arg
30

gac cag tgg gag gcg aat gcc gtg agc ttc gta tgg agg tac tgg tgg 144
Asp Gln Trp 35 Glu Ala Asn Ala Val Ser Phe Val Trp Arg Tyr Trp Trp
40 45

ttc ttc ctg gtg atg gcc gtg gca tac ctg ccc atc atc ttc gcc ctc 192
Phe Phe Leu Val Met Gly Val Ala Tyr Leu Pro Ile Ile Phe Gly Leu
50 55 60

aag tac tgg atg aag gat cgt ccg gcc ttc aac ctc cgt cgg ccg ctc 240
Lys Tyr Trp Met Lys Asp Arg Pro Ala Phe Asn 75 Leu Arg Arg Pro Leu
65 70 80

atc ttg tgg aat atc ttc atg gcg acg ttc tcg acc gcc ggc ttc ctg 288
Ile Leu Trp Asn Ile Phe Met Ala Thr Phe Ser Thr Ala Gly Phe Leu
85 90 95

tcg atc gtc tac ccc ctc atc gag aac tgg gtc tac ccc ggc ggc ggc 336
Ser Ile Val Tyr 100 Pro Leu Ile Glu Asn 105 Trp Val Tyr Pro Gly Gly Gly
110

ctc acc ccg cat gag ttc atc tgc tcg gcc agc tac tcc tac aag ttt 384
Leu Thr 115 Pro His Glu Phe Ile Cys 120 Ser Ala Ser Tyr 125 Tyr Lys Phe
125

ggg gat tgc gcc atc tgg gtg ttc ctc ttc aac atg tcg aag atc ctc 432
Gly Asp Cys Ala Ile Trp Val Phe Leu Phe Asn Met Ser Lys Ile Leu
130 135 140

gag ttc gtc gac acc atc ttc atc gtc ccc agg aag acc cac ctc ggc 480
Glu Phe Val Asp Thr Ile Phe Ile Val Pro Arg Lys Thr His Leu Gly
145 150 155 160

ttc ctc cac tac tac cac cac atc atc acc tac tcc ttc tgc ctc tac 528
Phe Leu His Tyr Tyr His His Ile Ile Thr Tyr Ser Phe Cys Leu Tyr
165 170 175

gcc ggc cag tac atg cac cac tac aac tgt ggc ggc tat ttc ttc tgc 576
Ala Gly Gln Tyr Met His His Tyr Asn Cys Gly Gly Tyr Phe Phe Cys
180 185 190

ctc atg aac ttc ttc gtc cac gcc atc atg tac ttc tac tac gct ctc 624
Leu Met Asn Phe Phe Val His Gly Ile Met Tyr Phe Tyr Tyr Ala Leu
195 200 205

cgc tcc atg ggc ttc cgt ccc tcc ttc gat att ggc atc acc ttc ctc 672
Arg Ser Met Gly Phe Arg Pro Ser Phe Asp Ile Gly Ile Thr Phe Leu
210 215 220

cag att ttg caa atg gtg ctc gcc gtg gcc atc atc acc atc tcc gcc 720
Gln Ile Leu Gln Met Val Leu Gly Val Ala Ile Ile Thr Ile Ser Ala
225 230 235 240

ggc tgc gag aag gtg gac ccc atc gga acg acc ttc ggc tac ttt att 768
Gly Cys Glu Lys Val Asp Pro Ile Gly Thr Thr Phe Gly Tyr Phe Ile
245 250 255

tat ttc tcg ttc ttc gtc ctc ttc tgc aag ttc ttc tac tac cgc tac 816
Tyr Phe Ser Phe Phe Val Leu Phe Cys Lys Phe Phe Tyr Tyr Arg Tyr
260 265 270

atc gcc acg ccc gcc aag aag ccc gag gcc gcc gcc aag tcg cca gcc 864
Ile Ala Thr 275 Pro Ala Lys Lys Pro 280 Glu Ala Ala Ala Lys Ser Pro Ala
285

acc aag ccc aag agg aag cac gac taa 891
Thr Lys Pro Lys Arg Lys His Asp
290 295

<210> 12

5 <211> 296

ES 2 380 052 T3

<212> PRT

<213> Acanthamoeba castellanii

<400> 12

Met Ala Ala Ala Thr Ala Thr Thr Ala Thr Thr Ala Val Met Glu Gln
1 5 10 15

Val Pro Ile Thr Glu Ala Ile Phe Arg Pro Asp Leu Trp Val Gly Arg
20 25 30

Asp Gln Trp Glu Ala Asn Ala Val Ser Phe Val Trp Arg Tyr Trp Trp
35 40 45

Phe Phe Leu Val Met Gly Val Ala Tyr Leu Pro Ile Ile Phe Gly Leu
50 55 60

Lys Tyr Trp Met Lys Asp Arg Pro Ala Phe Asn Leu Arg Arg Pro Leu
65 70 75 80

Ile Leu Trp Asn Ile Phe Met Ala Thr Phe Ser Thr Ala Gly Phe Leu
85 90 95

Ser Ile Val Tyr Pro Leu Ile Glu Asn Trp Val Tyr Pro Gly Gly Gly
100 105 110

Leu Thr Pro His Glu Phe Ile Cys Ser Ala Ser Tyr Ser Tyr Lys Phe
115 120 125

Gly Asp Cys Ala Ile Trp Val Phe Leu Phe Asn Met Ser Lys Ile Leu
130 135 140

Glu Phe Val Asp Thr Ile Phe Ile Val Pro Arg Lys Thr His Leu Gly
145 150 155 160

Phe Leu His Tyr Tyr His His Ile Ile Thr Tyr Ser Phe Cys Leu Tyr
165 170 175

Ala Gly Gln Tyr Met His His Tyr Asn Cys Gly Gly Tyr Phe Phe Cys

180 185 190

Leu Met Asn Phe Phe Val His Gly Ile Met Tyr Phe Tyr Tyr Ala Leu
195 200 205

Arg Ser Met Gly Phe Arg Pro Ser Phe Asp Ile Gly Ile Thr Phe Leu
210 215 220

Gln Ile Leu Gln Met Val Leu Gly Val Ala Ile Ile Thr Ile Ser Ala
225 230 235 240

Gly Cys Glu Lys Val Asp Pro Ile Gly Thr Thr Phe Gly Tyr Phe Ile
245 250 255

Tyr Phe Ser Phe Phe Val Leu Phe Cys Lys Phe Phe Tyr Tyr Arg Tyr
260 265 270

Ile Ala Thr Pro Ala Lys Lys Pro Glu Ala Ala Ala Lys Ser Pro Ala
275 280 285

Thr Lys Pro Lys Arg Lys His Asp
290 295

5

<210> 13

ES 2 380 052 T3

<211> 1320

<212> ADN

<213> Thraustrochytrium

<220>

5 <221> CDS

<222> (1)..(1320)

<223> Delta-5-Desaturasa

<400> 13

atg ggc aag ggc agc gag ggc cgc agc gcg gcg cgc gag atg acg gcc	48
Met Gly Lys Gly Ser Glu Gly Arg Ser Ala Ala Arg Glu Met Thr Ala	
1 5 10 15	
gag gcg aac ggc gac aag cgg aaa acg att ctg -atc gag ggc gtc ctg	96
Glu Ala Asn Gly Asp Lys Arg Lys Thr Ile Leu Ile Glu Gly Val Leu	
20 25 30	
tac gac gcg acg aac ttt aag cac ccg ggc ggt tcg atc atc aac ttc	144
Tyr Asp Ala Thr Asn Phe Lys His Pro Gly Gly Ser Ile Ile Asn Phe	
35 40 45	
ttg acc gag ggc gag gcc ggc gtg gac gcg acg cag gcg tac cgc gag	192
Leu Thr Glu Gly Glu Ala Gly Val Asp Ala Thr Gln Ala Tyr Arg Glu	
50 55 60	
ttt cat cag cgg tcc ggc aag gcc gac aag tac ctc aag tcg ctg ccg	240

ES 2 380 052 T3

Phe 65	His	Gln	Arg	Ser	Gly 70	Lys	Ala	Asp	Lys	Tyr 75	Leu	Lys	Ser	Leu	Pro 80	
aag Lys	ctg Leu	gat Asp	gcg Ala	tcc Ser 85	aag Lys	gtg Val	gag Glu	tcg Ser	cgg Arg 90	ttc Phe	tcg Ser	gcc Ala	aaa Lys	gag Glu 95	cag Gln	288
gcg Ala	cgg Arg	cgc Arg	gac Asp 100	gcc Ala	atg Met	acg Thr	cgc Arg	gac Asp 105	tac Tyr	gcg Ala	gcc Ala	ttt Phe 110	cgc Arg 110	gag Glu	gag Glu	336
ctc Leu	gtc Val	gcc Ala 115	gag Glu	ggg Gly	tac Tyr	ttt Phe	gac Asp 120	cgc Pro	tcg Ser	atc Ile	ccg Pro	cac His 125	atg Met	att Ile	tac Tyr	384
cgc Arg	gtc Val 130	gtg Val	gag Glu	atc Ile	gtg Val	gcg Ala 135	ctc Leu	ttc Phe	gcg Ala	ctc Leu	tcg Ser 140	ttc Phe	tgg Trp	ctc Leu	atg Met	432
tcc Ser 145	aag Lys	gcc Ala	tcg Ser	ccc Pro	acc Thr 150	tcg Ser	ctc Leu	gtg Val	ctg Leu	ggc Gly 155	gtg Val	gtg Val	atg Met	aac Asn	ggc Gly 160	480
att Ile	gcg Ala	cag Gln	ggc Gly	cgc Arg 165	tgc Cys	ggc Gly	tgg Trp	gtc Val	atg Met 170	cac His	gag Glu	atg Met	ggc Gly	cac His 175	ggg Gly	528
tcg Ser	ttc Phe	acg Thr	ggc Gly 180	gtc Val	atc Ile	tgg Trp	ctc Leu	gac Asp 185	gac Asp	cgg Arg	atg Met	tgc Cys	gag Glu 190	ttc Phe	ttc Phe	576
tac Tyr	ggc Gly 195	gtc Val	ggc Gly	tgc Cys	ggc Gly	atg Met	agc Ser 200	ggg Gly	cac His	tac Tyr	tgg Trp	aag Lys 205	aac Asn	cag Gln	cac His	624
agc Ser	aag Lys 210	cac His	cac His	gcc Ala	gcg Ala	ccc Pro 215	aac Asn	cgc Arg	ctc Leu	gag Glu	cac His 220	gat Asp	gtc Val	gat Asp	ctc Leu	672
aac Asn 225	acg Thr	ctg Leu	ccc Pro	ctg Leu	gtc Val 230	gcc Ala	ttt Phe	aac Asn	gag Glu	cgc Arg 235	gtc Val	gtg Val	cgc Arg	aag Lys	gtc Val 240	720
aag Lys	ccg Pro	gga Gly	tcg Ser	ctg Leu 245	ctg Leu	gcg Ala	ctc Leu	tgg Trp	ctg Leu 250	cgc Arg	gtg Val	cag Gln	gcg Ala	tac Tyr 255	ctc Leu	768
ttt Phe	gcg Ala	ccc Pro	gtc Val 260	tcg Ser	tgc Cys	ctg Leu	ctc Leu	atc Ile 265	ggc Gly	ctt Leu	ggc Gly	tgg Trp	acg Thr 270	ctc Leu	tac Tyr	816
ctg Leu	cac His	ccg Pro 275	cgc Arg	tac Tyr	atg Met	ctg Leu	cgc Arg 280	acc Thr	aag Lys	cgg Arg	cac His 285	atg Met	gag Glu	ttc Phe	gtc Val	864
tgg Trp	atc Ile 290	ttc Phe	gcg Ala	cgc Arg	tac Tyr 295	att Ile	ggc Gly	tgg Trp	ttc Phe	tcg Ser 300	ctc Leu	atg Met	ggc Gly	gct Ala	ctc Leu	912
ggc Gly 305	tac Tyr	tcg Ser	ccg Pro	ggc Gly 310	acc Thr	tcg Ser	gtc Val	ggg Gly	atg Met	tac Tyr 315	ctg Leu	tgc Cys	tcg Ser	ttc Phe	ggc Gly 320	960
ctc Leu	ggc Gly	tgc Cys	att Ile 325	tac Tyr	att Ile	ttc Phe	ctg Leu	cag Gln	ttc Phe 330	gcc Ala	gtc Val	agc Ser	cac His	acg Thr 335	cac His	1008
ctg Leu	ccg Pro	gtg Val	acc Thr	aac Asn	ccg Pro	gag Glu	gac Asp	cag Gln	ctg Leu	cac His	tgg Trp	ctc Leu	gag Glu	tac Tyr	gcg Ala	1056

ES 2 380 052 T3

```

          340          345          350
gcc gac cac acg gtg aac att agc acc aag tcc tgg ctc gtc acg tgg 1104
Ala Asp His Thr Val Asn Ile Ser Thr Lys Ser Trp Leu Val Thr Trp
          355          360          365

tgg atg tcg aac ctg aac ttt cag atc gag cac cac ctc ttc ccc acg 1152
Trp Met Ser Asn Leu Asn Phe Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Thr
          370          375          380

gcg ccg cag ttc cgc ttc aag gaa atc agt cct cgc gtc gag gcc ctc 1200
Ala Pro Gln Phe Arg Phe Lys Glu Ile Ser Pro Arg Val Glu Ala Leu
          385          390          395

ttc aag cgc cac aac ctc ccg tac tac gac ctg ccc tac acg agc gcg 1248
Phe Lys Arg His Asn Leu Pro Tyr Tyr Asp Leu Pro Tyr Thr Ser Ala
          405          410          415

gtc tcg acc acc ttt gcc aat ctt tat tcc gtc ggc cac tcg gtc ggc 1296
Val Ser Thr Thr Phe Ala Asn Leu Tyr Ser Val Gly His Ser Val Gly
          420          425          430

gcc gac acc aag aag cag gac tga 1320
Ala Asp Thr Lys Lys Gln Asp
          435

```

<210> 14

<211> 439

<212> PRT

5 <213> Thraustrochytrium

<400> 14

```

Met Gly Lys Gly Ser Glu Gly Arg Ser Ala Ala Arg Glu Met Thr Ala
1          5          10          15

Glu Ala Asn Gly Asp Lys Arg Lys Thr Ile Leu Ile Glu Gly Val Leu
20          25          30

Tyr Asp Ala Thr Asn Phe Lys His Pro Gly Gly Ser Ile Ile Asn Phe
35          40          45

Leu Thr Glu Gly Glu Ala Gly Val Asp Ala Thr Gln Ala Tyr Arg Glu
50          55          60

Phe His Gln Arg Ser Gly Lys Ala Asp Lys Tyr Leu Lys Ser Leu Pro
65          70          75          80

Lys Leu Asp Ala Ser Lys Val Glu Ser Arg Phe Ser Ala Lys Glu Gln
85          90          95

Ala Arg Arg Asp Ala Met Thr Arg Asp Tyr Ala Ala Phe Arg Glu Glu
100         105         110

Leu Val Ala Glu Gly Tyr Phe Asp Pro Ser Ile Pro His Met Ile Tyr
115         120         125

```

ES 2 380 052 T3

Arg Val Val Glu Ile Val Ala Leu Phe Ala Leu Ser Phe Trp Leu Met
 130 135 140

Ser Lys Ala Ser Pro Thr Ser Leu Val Leu Gly Val Val Met Asn Gly
 145 150 155 160

Ile Ala Gln Gly Arg Cys Gly Trp Val Met His Glu Met Gly His Gly
 165 170 175

Ser Phe Thr Gly Val Ile Trp Leu Asp Asp Arg Met Cys Glu Phe Phe
 180 185 190

Tyr Gly Val Gly Cys Gly Met Ser Gly His Tyr Trp Lys Asn Gln His
 195 200 205

Ser Lys His His Ala Ala Pro Asn Arg Leu Glu His Asp Val Asp Leu
 210 215 220

Asn Thr Leu Pro Leu Val Ala Phe Asn Glu Arg Val Val Arg Lys Val
 225 230 235 240

Lys Pro Gly Ser Leu Leu Ala Leu Trp Leu Arg Val Gln Ala Tyr Leu
 245 250 255

Phe Ala Pro Val Ser Cys Leu Leu Ile Gly Leu Gly Trp Thr Leu Tyr
 260 265 270

Leu His Pro Arg Tyr Met Leu Arg Thr Lys Arg His Met Glu Phe Val
 275 280 285

Trp Ile Phe Ala Arg Tyr Ile Gly Trp Phe Ser Leu Met Gly Ala Leu
 290 295 300

Gly Tyr Ser Pro Gly Thr Ser Val Gly Met Tyr Leu Cys Ser Phe Gly
 305 310 315 320

Leu Gly Cys Ile Tyr Ile Phe Leu Gln Phe Ala Val Ser His Thr His
 325 330 335

Leu Pro Val Thr Asn Pro Glu Asp Gln Leu His Trp Leu Glu Tyr Ala
 340 345 350

Ala Asp His Thr Val Asn Ile Ser Thr Lys Ser Trp Leu Val Thr Trp
 355 360 365

Trp Met Ser Asn Leu Asn Phe Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Thr
 370 375 380

Ala Pro Gln Phe Arg Phe Lys Glu Ile Ser Pro Arg Val Glu Ala Leu
 385 390 395 400

Phe Lys Arg His Asn Leu Pro Tyr Tyr Asp Leu Pro Tyr Thr Ser Ala
 405 410 415

Val Ser Thr Thr Phe Ala Asn Leu Tyr Ser Val Gly His Ser Val Gly
 420 425 430

Ala Asp Thr Lys Lys Gln Asp
 435

<210> 15

<211> 1353

<212> ADN

<213> Acanthamoeba castellanii

<220>

5 <221> CDS

<222> (1)..(1353)

<223> Delta-5-Desaturasa

<400> 15

atg gcc acc gca tct gca tcc aac gtt ctc cgc ctg ccc gga gag gga	48
Met Ala Thr Ala Ser Ala Ser Asn Val Leu Arg Leu Pro Gly Glu Gly	
1 5 10 15	
ctc gcg act ggc ctc gag cag ctc gag tgg gcc gaa gtg cag aag cac	96
Leu Ala Thr Gly Leu Glu Gln Leu Glu Trp Ala Glu Val Gln Lys His	
20 25 30	
aac acg cgc gag agc tcg tgg ctg gtg att aac gac cag gtg tac gac	144
Asn Thr Arg Glu Ser Ser Trp Leu Val Ile Asn Asp Gln Val Tyr Asp	
35 40 45	
atc acc aac ttc ggc cgg cgc cat ccc ggt ggc aag gta atc tac cac	192
Ile Thr Asn Phe Gly Arg Arg His Pro Gly Gly Lys Val Ile Tyr His	
50 55 60	
tac gcg ggt caa gat gcc acg gac tcg ttt cgg gct ctt cac ccc gat	240
Tyr Ala Gly Gln Asp Ala Thr Asp Ser Phe Arg Ala Leu His Pro Asp	
65 70 75 80	
tcc gcc ctg gtg atg aag tat ctc aag ccc ctc ctc atc ggt caa gtg	288
Ser Ala Leu Val Met Lys Tyr Leu Lys Pro Leu Leu Ile Gly Gln Val	
85 90 95	
gca ccc ggc tca tcc acc gca gca tcg att gtt gat ggc gcc cgc ccg	336
Ala Pro Gly Ser Ser Thr Ala Ala Ser Ile Val Asp Gly Ala Arg Pro	
100 105 110	
gcg ccc tcg gca ttc gta gag gaa ttc aga cag gtg cgc aaa gaa ttc	384
Ala Pro Ser Ala Phe Val Glu Glu Phe Arg Gln Val Arg Lys Glu Phe	
115 120 125	
gag gag cag ggc ctg ttc gag gcc agc tgg tcc ttc ttc ggg atg	432
Glu Glu Gln Gly Leu Phe Glu Ala Ser Trp Ser Phe Phe Phe Gly Met	
130 135 140	

ES 2 380 052 T3

ctg gcc cac atc ttc ctg ctc gag gct gcc gcc tac tac agc atc aag 480
 Leu Ala His Ile Phe Leu Leu Glu Ala Ala Ala Tyr Tyr Ser Ile Lys
 145 150 155 160

ctg ctg ggc aac agt tgg ccc gtc tac ctc ctc gcc gtc ggc ctc ctc 528
 Leu Leu Gly Asn Ser Trp Pro Val Tyr Leu Leu Ala Val Gly Leu Leu
 165 170 175

gcc act gcc cag gca cag gcc ggc tgg ctc cag cac gat tgt ggg cac 576
 Ala Thr Ala Gln Ala Gln Ala Gly Trp Leu Gln His Asp Cys Gly His
 180 185 190

ttg tcc gtg ttc aag aag tcg aag tgg aac cat tgg atg cac tac atc 624
 Leu Ser Val Phe Lys Lys Ser Lys Trp Asn His Trp Met His Tyr Ile
 195 200 205

gtc atc tgc cac atc aag ggc gcc tcg cga gcc tgg tgg aac tgg cgt 672
 Val Ile Cys His Ile Lys Gly Ala Ser Arg Ala Trp Trp Asn Trp Arg
 210 215 220

cac ttt gag cac cac gca aag ccc aac gtg gtg cgc aag gac ccc gac 720
 His Phe Glu His His Ala Lys Pro Asn Val Val Arg Lys Asp Pro Asp
 225 230 235 240

atc acc ttc ccc aac ctc ttc ctt ctc ggc gac cac ctg acg cgc aag 768
 Ile Thr Phe Pro Asn Leu Phe Leu Leu Gly Asp His Leu Thr Arg Lys
 245 250 255

tgg gcc aag gcc aag aag gga gtg atg ccc tac aac aag cag cac ctc 816
 Trp Ala Lys Ala Lys Lys Gly Val Met Pro Tyr Asn Lys Gln His Leu
 260 265 270

tac tgg tgg gct ttc ccc ccg ctc ctg ctg ccc gtc tac ttc cac tac 864
 Tyr Trp Trp Ala Phe Pro Pro Leu Leu Leu Pro Val Tyr Phe His Tyr
 275 280 285

gac aac att cga tac gtc ttc cag cac aag cac tgg tgg gac ctc ttc 912
 Asp Asn Ile Arg Tyr Val Phe Gln His Lys His Trp Trp Asp Leu Phe
 290 295 300

tgg atc gcc acg ttc ttc gcg aag cac ttc acg ctc tac ggc ccg ctg 960
 Trp Ile Ala Thr Phe Phe Ala Lys His Phe Thr Leu Tyr Gly Pro Leu
 305 310 315 320

atg ggc ggc tgg ggc gcg ttc tgg ttc tac atg ctg gtg cgc acg gtc 1008
 Met Gly Gly Trp Gly Ala Phe Trp Phe Tyr Met Leu Val Arg Thr Val
 325 330 335

gag agc cac tgg ttc aca tgg gtg acc cag atg aac cac atc ccc atg 1056
 Glu Ser His Trp Phe Thr Trp Val Thr Gln Met Asn His Ile Pro Met
 340 345 350

cac gtc gac aac gac cgc gag ctg gac tgg ccc acc ctg cag ggt ctc 1104
 His Val Asp Asn Asp Arg Glu Leu Asp Trp Pro Thr Leu Gln Gly Leu
 355 360 365

gcc acg tgc aac gtc gag ggc agc ctc ttc aac gac tgg ttc acg ggc 1152
 Ala Thr Cys Asn Val Glu Gly Ser Leu Phe Asn Asp Trp Phe Thr Gly
 370 375 380

cac ctc aac tac cag atc gag cac cac ctc ttc ccc acc atg ccc cgc 1200
 His Leu Asn Tyr Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg
 385 390 395 400

cac aac tac gcg gtg gcc aac aag aag gtc cag gcc ctc tac aag aag 1248
 His Asn Tyr Ala Val Ala Asn Lys Lys Val Gln Ala Leu Tyr Lys Lys
 405 410 415

cac ggc gtg ccg atg cag acc aag ggc ctc atc gaa gcc ttc gcc gac 1296
 His Gly Val Pro Met Gln Thr Lys Gly Leu Ile Glu Ala Phe Ala Asp
 420 425 430

atc gtc aag tcg ctc gag cac tat ggt gag gtg tgg aag gag gcc tac 1344
 Ile Val Lys Ser Leu Glu His Tyr Gly Glu Val Trp Lys Glu Ala Tyr
 435 440 445

tac ggc taa 1353
 Tyr Gly

<210> 16

<211> 450

5 <212> PRT

ES 2 380 052 T3

<213> Acanthamoeba castellanii

<400> 16

Met Ala Thr Ala Ser Ala Ser Asn Val Leu Arg Leu Pro Gly Glu Gly
 1 5 10 15
 Leu Ala Thr Gly Leu Glu Gln Leu Glu Trp Ala Glu Val Gln Lys His
 20 25 30
 Asn Thr Arg Glu Ser Ser Trp Leu Val Ile Asn Asp Gln Val Tyr Asp
 35 40 45
 Ile Thr Asn Phe Gly Arg Arg His Pro Gly Gly Lys Val Ile Tyr His
 50 55 60
 Tyr Ala Gly Gln Asp Ala Thr Asp Ser Phe Arg Ala Leu His Pro Asp
 65 70 75 80
 Ser Ala Leu Val Met Lys Tyr Leu Lys Pro Leu Leu Ile Gly Gln Val
 85 90 95
 Ala Pro Gly Ser Ser Thr Ala Ala Ser Ile Val Asp Gly Ala Arg Pro
 100 105 110
 Ala Pro Ser Ala Phe Val Glu Glu Phe Arg Gln Val Arg Lys Glu Phe
 115 120 125
 Glu Glu Gln Gly Leu Phe Glu Ala Ser Trp Ser Phe Phe Phe Gly Met
 130 135 140
 Leu Ala His Ile Phe Leu Leu Glu Ala Ala Ala Tyr Tyr Ser Ile Lys
 145 150 155 160
 Leu Leu Gly Asn Ser Trp Pro Val Tyr Leu Leu Ala Val Gly Leu Leu
 165 170 175

ES 2 380 052 T3

Ala Thr Ala Gln Ala Gln Ala Gly Trp Leu Gln His Asp Cys Gly His
 180 185 190

Leu Ser Val Phe Lys Lys Ser Lys Trp Asn His Trp Met His Tyr Ile
 195 200 205

Val Ile Cys His Ile Lys Gly Ala Ser Arg Ala Trp Trp Asn Trp Arg
 210 215 220

His Phe Glu His His Ala Lys Pro Asn Val Val Arg Lys Asp Pro Asp
 225 230 240

Ile Thr Phe Pro Asn Leu Phe Leu Leu Gly Asp His Leu Thr Arg Lys
 245 250 255

Trp Ala Lys Ala Lys Lys Gly Val Met Pro Tyr Asn Lys Gln His Leu
 260 265 270

Tyr Trp Trp Ala Phe Pro Pro Leu Leu Leu Pro Val Tyr Phe His Tyr
 275 280 285

Asp Asn Ile Arg Tyr Val Phe Gln His Lys His Trp Trp Asp Leu Phe
 290 295 300

Trp Ile Ala Thr Phe Phe Ala Lys His Phe Thr Leu Tyr Gly Pro Leu
 305 310 315 320

Met Gly Gly Trp Gly Ala Phe Trp Phe Tyr Met Leu Val Arg Thr Val
 325 330 335

Glu Ser His Trp Phe Thr Trp Val Thr Gln Met Asn His Ile Pro Met
 340 345 350

His Val Asp Asn Asp Arg Glu Leu Asp Trp Pro Thr Leu Gln Gly Leu
 355 360 365

Ala Thr Cys Asn Val Glu Gly Ser Leu Phe Asn Asp Trp Phe Thr Gly
 370 375 380

His Leu Asn Tyr Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg
 385 390 395 400

His Asn Tyr Ala Val Ala Asn Lys Lys Val Gln Ala Leu Tyr Lys Lys
 405 410 415

His Gly Val Pro Met Gln Thr Lys Gly Leu Ile Glu Ala Phe Ala Asp
 420 425 430

Ile Val Lys Ser Leu Glu His Tyr Gly Glu Val Trp Lys Glu Ala Tyr
 435 440 445

Tyr Gly

450

<210> 17

<211> 1374

5 <212> ADN

<213> Perkinsus marinus

<220>

<221> CDS

ES 2 380 052 T3

<222> (1)..(1374)

<223> Delta-5-Desaturasa

<400> 17

atg Met 1	act Thr	act Thr	tca Ser	acc Thr	act Thr	act Thr	gtg Val	caa Gln	cta Leu	caa Gln	gaa Glu	gac Asp	ctg Leu	tca Ser	agt Ser	48
ggt Gly	gac Asp	cag Gln	aac Asn	gcc Ala	cac His	ccc Pro	agt Ser	cca Pro	agc Ser	cga Arg	gct Ala	act Thr	cct Pro	agt Ser	ggt Val	96
ggt Gly	gat Asp	act Thr	aag Lys	gag Glu	gat Asp	gcg Ala	agg Arg	ggt Val	ggt Val	atc Ile	aaa Lys	cta Leu	ttt Phe	ggt Gly	aca Thr	144
tgg Trp	ggt Val	gat Asp	ggt Val	aca Thr	gct Ala	tgg Trp	ttg Leu	aat Asn	gac Asp	cat His	cct Pro	ggt Gly	ggt Gly	tct Ser	aaa Lys	192
gtg Val	ctc Leu	aga Arg	gca Ala	ttc Phe	aac Asn	aag Lys	aag Lys	gac Asp	gcg Ala	act Thr	gat Asp	gct Ala	ggt Val	atg Met	gcc Ala	240
atg Met	cac His	act Thr	gat Asp	gaa Glu	gct Ala	atc Ile	aag Lys	cgc Arg	atc Ile	atc Ile	aga Arg	ttt Phe	tca Ser	aat Asn	gtg Val	288
gtc Val	tcc Ser	tcg Ser	gcc Ala	ccc Pro	atc Ile	aac Asn	gcc Ala	tct Ser	att Ile	ggt Gly	gat Asp	gtc Val	cag Gln	ggt Val	att Ile	336
gag Glu	aaa Lys	tct Ser	cta Leu	tcg Ser	aga Arg	gaa Glu	cag Gln	ttg Leu	atg Met	tat Tyr	tac Tyr	aag Lys	ctc Leu	cgc Arg	act Thr	384
ctt Leu	gct Ala	aga Arg	aac Asn	cag Gln	ggc Gly	tgg Trp	ttt Phe	caa Gln	agc Ser	aat Asn	cta Leu	tta Leu	tac Tyr	gaa Glu	gga Gly	432
gtg Val	aaa Lys	gca Ala	atg Met	ata Ile	gcc Ala	ttc Phe	ggt Gly	ttg Leu	ctc Leu	atc Ile	atc Ile	ggg Gly	ttt Phe	gct Ala	act Thr	480
ctc Leu	tac Tyr	ttc Phe	gac Asp	tat Tyr	ggt Gly	att Ile	tgg Trp	tca Ser	acc Thr	gca Ala	ctg Leu	ata Ile	ggt Gly	ttc Phe	gct Ala	528
tgg Trp	ttt Phe	cag Gln	ctg Ser	ggg Gly	tgg Trp	ttg Leu	gga Gly	cat His	gac Asp	tgg Trp	tct Ser	cat His	cat His	aca Glu	gct Thr	576

ES 2 380 052 T3

Trp	Phe	Gln	Leu	Gly	Trp	Leu	Gly	His	Asp	Trp	Ser	His	His	Thr	Ala	
			180					185					190			
cta	cca	aag	tct	act	act	aac	tgt	gcg	aac	tac	aat	gac	tat	ctt	ggc	624
Leu	Pro	Lys	Ser	Thr	Thr	Asn	Cys	Ala	Asn	Tyr	Asn	Asp	Tyr	Leu	Gly	
		195					200					205				
tgg	ctt	act	ggt	ttg	gct	aga	ggg	aat	aca	ctt	ctg	tgg	tgg	aaa	cta	672
Trp	Leu	Thr	Gly	Leu	Ala	Arg	Gly	Asn	Thr	Leu	Leu	Trp	Trp	Lys	Leu	
		210					215									
agg	cat	aat	act	cat	cac	gtg	ctg	acc	aat	cag	tac	gag	aat	gat	cct	720
Arg	His	Asn	Thr	His	His	Val	Leu	Thr	Asn	Gln	Tyr	Glu	Asn	Asp	Pro	
		225				230				235					240	
gat	ata	cta	act	caa	cca	ccg	ttg	cat	ttt	ttc	gag	gac	ttc	gat	gtt	768
Asp	Ile	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Leu	His	Phe	Phe	Glu	Asp	Phe	Asp	Val	
				245					250						255	
ggt	aat	gtg	aac	aga	tat	caa	gct	gtc	tac	tat	cta	cca	atg	cta	act	816
Gly	Asn	Val	Asn	Arg	Tyr	Gln	Ala	Val	Tyr	Tyr	Leu	Pro	Met	Leu	Thr	
			260					265					270			
cta	ctg	cat	cta	ttt	tgg	ttg	tac	gag	tcg	gta	ttg	gtt	tgc	ttg	aga	864
Leu	Leu	His	Leu	Phe	Trp	Leu	Tyr	Glu	Ser	Val	Leu	Val	Cys	Leu	Arg	
		275					280					285				
caa	agt	aag	tct	att	aat	aga	tac	aac	cgt	atg	cat	gcc	cgg	agg	gat	912
Gln	Ser	Lys	Ser	Ile	Asn	Arg	Tyr	Asn	Arg	Met	His	Ala	Arg	Arg	Asp	
		290				295					300					
acc	gta	gct	ttg	gta	ctt	cac	ata	ctc	att	gtt	ggc	atc	ata	tcg	tac	960
Thr	Val	Ala	Leu	Val	Leu	His	Ile	Leu	Ile	Val	Gly	Ile	Ile	Ser	Tyr	
					310					315					320	
acc	agt	ggt	aag	tat	ttg	ctc	atc	ctt	ctg	gcc	tac	atg	ctt	agt	ggc	1008
Thr	Ser	Gly	Lys	Tyr	Leu	Leu	Ile	Leu	Leu	Ala	Tyr	Met	Leu	Ser	Gly	
				325					330					335		
ttt	cta	act	gct	gtt	gtt	gta	ttt	gcc	agc	cac	tac	aac	gag	cct	agg	1056
Phe	Leu	Thr	Ala	Val	Val	Val	Phe	Ala	Ser	His	Tyr	Asn	Glu	Pro	Arg	
				340				345					350			
gta	gct	tct	ggt	gaa	tcc	tta	tca	ctc	gtt	cgt	cag	aca	ttg	tta	acc	1104
Val	Ala	Ser	Gly	Glu	Ser	Leu	Ser	Leu	Val	Arg	Gln	Thr	Leu	Leu	Thr	
			355				360					365				
act	atc	aat	ata	ggc	tca	ttc	agt	gat	act	cat	tgg	gag	aag	aag	ttg	1152
Thr	Ile	Asn	Ile	Gly	Ser	Phe	Ser	Asp	Thr	His	Trp	Glu	Lys	Lys	Leu	
				370			375				380					
tgg	ttc	tat	cta	act	ggt	ggt	ctt	aat	atg	caa	atc	gag	cat	cat	ctc	1200
Trp	Phe	Tyr	Leu	Thr	Gly	Gly	Leu	Asn	Met	Gln	Ile	Glu	His	His	Leu	
					390					395					400	
ttc	cca	aca	atg	ccc	cgc	cat	aat	ctt	ccg	aag	aca	act	ttt	ctg	gtc	1248
Phe	Pro	Thr	Met	Pro	Arg	His	Asn	Leu	Pro	Lys	Thr	Thr	Phe	Leu	Val	
				405					410					415		
aag	tca	cta	gcc	cag	gag	cta	gga	ctg	cca	tac	aag	gaa	acc	aac	att	1296
Lys	Ser	Leu	Ala	Gln	Glu	Leu	Gly	Leu	Pro	Tyr	Lys	Glu	Thr	Asn	Ile	
			420					425					430			
gtc	agt	tta	acc	aag	gcg	gcc	gtt	act	act	ttg	cat	cat	aat	gct	ctg	1344
Val	Ser	Leu	Thr	Lys	Ala	Ala	Val	Thr	Thr	Leu	His	His	Asn	Ala	Leu	
				435			440					445				
cg	aac	atc	gag	aga	ttg	ctt	gct	agg	tag							1374
Arg	Asn	Ile	Glu	Arg	Leu	Leu	Ala	Arg								

450

455

<210> 18

<211> 457

5 <212> PRT

<213> Perkinsus marinus

<400> 18

ES 2 380 052 T3

Met Thr Thr Ser Thr Thr Thr Val Gln Leu Gln Glu Asp Leu Ser Ser
1 5 10 15

Gly Asp Gln Asn Ala His Pro Ser Pro Ser Arg Ala Thr Pro Ser Val
20 25 30

Gly Asp Thr Lys Glu Asp Ala Arg Val Val Ile Lys Leu Phe Gly Thr
35 40 45

Trp Val Asp Val Thr Ala Trp Leu Asn Asp His Pro Gly Gly Ser Lys
50 55 60

Val Leu Arg Ala Phe Asn Lys Lys Asp Ala Thr Asp Ala Val Met Ala
65 70 75 80

Met His Thr Asp Glu Ala Ile Lys Arg Ile Ile Arg Phe Ser Asn Val
85 90 95

Val Ser Ser Ala Pro Ile Asn Ala Ser Ile Gly Asp Val Gln Val Ile
100 105 110

Glu Lys Ser Leu Ser Arg Glu Gln Leu Met Tyr Tyr Lys Leu Arg Thr
115 120 125

Leu Ala Arg Asn Gln Gly Trp Phe Gln Ser Asn Leu Leu Tyr Glu Gly
130 135 140

Val Lys Ala Met Ile Ala Phe Gly Leu Leu Ile Ile Gly Phe Ala Thr
145 150 155 160

Leu Tyr Phe Asp Tyr Gly Ile Trp Ser Thr Ala Leu Ile Gly Phe Ala
165 170 175

Trp Phe Gln Leu Gly Trp Leu Gly His Asp Trp Ser His His Thr Ala
180 185 190

Leu Pro Lys Ser Thr Thr Asn Cys Ala Asn Tyr Asn Asp Tyr Leu Gly
195 200 205

Trp Leu Thr Gly Leu Ala Arg Gly Asn Thr Leu Leu Trp Trp Lys Leu
210 215 220

ES 2 380 052 T3

Arg His Asn Thr His His Val Leu Thr Asn Gln Tyr Glu Asn Asp Pro
 225 230 235 240
 Asp Ile Leu Thr Gln Pro Pro Leu His Phe Phe Glu Asp Phe Asp Val
 245 250 255
 Gly Asn Val Asn Arg Tyr Gln Ala Val Tyr Tyr Leu Pro Met Leu Thr
 260 265 270
 Leu Leu His Leu Phe Trp Leu Tyr Glu Ser Val Leu Val Cys Leu Arg
 275 280 285
 Gln Ser Lys Ser Ile Asn Arg Tyr Asn Arg Met His Ala Arg Arg Asp
 290 295 300
 Thr Val Ala Leu Val Leu His Ile Leu Ile Val Gly Ile Ile Ser Tyr
 305 310 315 320
 Thr Ser Gly Lys Tyr Leu Leu Ile Leu Leu Ala Tyr Met Leu Ser Gly
 325 330 335
 Phe Leu Thr Ala Val Val Val Phe Ala Ser His Tyr Asn Glu Pro Arg
 340 345 350
 Val Ala Ser Gly Glu Ser Leu Ser Leu Val Arg Gln Thr Leu Leu Thr
 355 360 365
 Thr Ile Asn Ile Gly Ser Phe Ser Asp Thr His Trp Glu Lys Lys Leu
 370 375 380
 Trp Phe Tyr Leu Thr Gly Gly Leu Asn Met Gln Ile Glu His His Leu
 385 390 395 400
 Phe Pro Thr Met Pro Arg His Asn Leu Pro Lys Thr Thr Phe Leu Val
 405 410 415
 Lys Ser Leu Ala Gln Glu Leu Gly Leu Pro Tyr Lys Glu Thr Asn Ile
 420 425 430
 Val Ser Leu Thr Lys Ala Ala Val Thr Thr Leu His His Asn Ala Leu
 435 440 445
 Arg Asn Ile Glu Arg Leu Leu Ala Arg
 450 455

<210> 19

<211> 1224

<212> ADN

5 <213> Acanthamoeba castellanii

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1224)

<223> Delta-12/Delta-15-Desaturasa

10 <400> 19

ES 2 380 052 T3

atg Met 1	act Thr	att Ile	act Thr	act Thr	acc Thr	cag Gln	acc Thr	ttg Leu	aac Asn 10	cag Gln	aag Lys	gct Ala	gct Ala	aag Lys 15	aag Lys	48
gga Gly	gga Gly	aag Lys	gag Glu 20	agg Arg	gct Ala	cca Pro	att Ile	att Ile 25	cca Pro	aag Lys	gag Glu	aac Asn	gct Ala 30	cca Pro	ttc Phe	96
act Thr	ttg Leu	gga Gly 35	cag Gln	atc Ile	aag Lys	gga Gly	gct Ala 40	atc Ile	cca Pro	cct Pro	cat His	ctc Leu 45	ttc Phe	aag Lys	cac His	144
tcc Ser	atg Met 50	ttg Leu	aag Lys	tct Ser	ttc Phe	tcc Ser 55	tac Tyr	ttg Leu	gga Gly	gtg Val	gat Asp 60	ttg Leu	ttg Leu	gag Glu	tct Ser	192
acc Thr 65	atc Ile	tgg Trp	ttg Leu	ttc Phe	ctc Leu 70	atc Ile	ttg Leu	tac Tyr	ttg Leu	gat Asp 75	gga Gly	ctc Leu	act Thr	aag Lys	gag Glu 80	240
aac Asn	acc Thr	ttg Leu	ttg Leu	aac Asn 85	tgg Trp	act Thr	tgc Cys	tgg Trp	ggt Val 90	gca Ala	tac Tyr	tgg Trp	ttg Leu	tac Tyr 95	caa Gln	288
gga Gly	ttg Leu	act Thr	tgg Trp 100	act Thr	gga Gly	att Ile	tgg Trp 105	gtg Val	ttg Leu	gct Ala	cat His	gag Glu	tgt Cys 110	gga Gly	cat His	336
gga Gly	gga Gly	ttc Phe 115	ggt Val	gct Ala	caa Gln	gag Glu	tgg Trp 120	ttg Leu	aac Asn	gat Asp	acc Thr	gtg Val 125	ggt Gly	ttc Phe	att Ile	384
ttc Phe 130	cat His	acc Thr	gtg Val	ctc Leu	tac Tyr	gtt Val 135	cca Pro	tac Tyr	ttc Phe	tcc Ser	tgg Trp 140	aag Lys	ttc Phe	tct Ser	cat His	432
gct Ala 145	aag Lys	cac His	cat His	cac His	tac Tyr 150	acc Thr	aac Asn	cac His	atg Met	act Thr 155	aag Lys	gat Asp	gag Glu	cca Pro	ttc Phe 160	480
gtg Val	cca Pro	cat His	aca Thr	atc Ile	act Thr	cca Pro	gag Glu	caa Gln	agg Arg 170	gct Ala	aaa Lys	gtg Val	gat Asp	caa Gln 175	gga Gly	528
gag Glu	ttg Leu	cca Pro	cat His 180	cca Pro	aac Asn	aag Lys	cca Pro	tcc Ser 185	ctc Leu	ttc Phe	gct Ala	ttc Phe	tac Tyr 190	gag Glu	aga Arg	576
tgg Trp	gtg Val	atc Ile 195	cca Pro	ttc Phe	gtg Val	atg Met	ttg Leu 200	ttc Phe	ttg Leu	gga Gly	tgg Trp	cca Pro 205	ctc Leu	tac Tyr	ttg Leu	624
tct Ser	atc Ile 210	aac Asn	gct Ala	tct Ser	gga Gly	cca Pro 215	cca Pro	aag Lys	aag Lys	gag Glu	ttg Leu 220	ggt Val	tcc Ser	cac His	tac Tyr	672

ES 2 380 052 T3

gat cca aag gct tcc atc ttc aac aag aaa gat tgg tgg aag atc ttg 720
 Asp Pro Lys Ala Ser Ile Phe Asn Lys Lys Asp Trp Trp Lys Ile Leu
 225 230 235

ctc tct gat ttg gga ttg gtt gct tgg act ttg gct ttg tgg aag ttg 768
 Leu Ser Asp Leu Gly Leu Val Ala Trp Thr Leu Ala Leu Trp Lys Leu
 245 250 255

gga gag act ttc gga ttc gga ttg gtg gct gct ctt tac att cca cca 816
 Gly Glu Thr Phe Gly Phe Gly Leu Val Ala Ala Leu Tyr Ile Pro Pro
 260 265 270

gtg ctc gtt acc aac tct tac ttg gtg gct atc acc ttc ttg caa cac 864
 Val Leu Val Thr Asn Ser Tyr Leu Val Ala Ile Thr Phe Leu Gln His
 275 280 285

acc gat gat atc ctc cca cat tac gat gct act gag tgg act tgg ttg 912
 Thr Asp Asp Ile Leu Pro His Tyr Asp Ala Thr Glu Trp Thr Trp Leu
 290 295 300

aga gga gct ttg tgc act gtg gat aga tct ttg gga tgg ttc gga gat 960
 Arg Gly Ala Leu Cys Thr Val Asp Arg Ser Leu Gly Trp Phe Gly Asp
 305 310 315 320

tac aag acc cat cac atc gtt gat act cat gtg acc cac cac atc ttc 1008
 Tyr Lys Thr His His Ile Val Asp Thr His Val Thr His His Ile Phe
 325 330 335

tct tac ctc cca ttc tat aac gct gag gag gct act aag gct att aag 1056
 Ser Tyr Leu Pro Phe Tyr Asn Ala Glu Glu Ala Thr Lys Ala Ile Lys
 340 345 350

cca gtg ttg aag gag tat cac tgc gag gat aag aga gga ttc ttc cac 1104
 Pro Val Leu Lys Glu Tyr His Cys Glu Asp Lys Arg Gly Phe Phe His
 355 360 365

ttc tgg tac ttg ttc ttc aag acc gct gct gag aac tct gtt gtg gat 1152
 Phe Trp Tyr Leu Phe Phe Lys Thr Ala Ala Glu Asn Ser Val Val Asp
 370 375 380

aac gag acc aac aag tcc cca gga atc ttc tac ttc ttc agg gag gag 1200
 Asn Glu Thr Asn Lys Ser Pro Gly Ile Phe Tyr Phe Phe Arg Glu Glu
 385 390 395 400

att aag cac gga aag gct cat tga 1224
 Ile Lys His Gly Lys Ala His
 405

<210> 20

<211> 407

<212> PRT

5 <213> Acanthamoeba castellanii

<400> 20

Met Thr Ile Thr Thr Thr Gln Thr Leu Asn Gln Lys Ala Ala Lys Lys
 1 5 10 15

Gly Gly Lys Glu Arg Ala Pro Ile Ile Pro Lys Glu Asn Ala Pro Phe
 20 25 30

ES 2 380 052 T3

Thr Leu Gly Gln Ile Lys Gly Ala Ile Pro Pro His Leu Phe Lys His
 35 40 45
 Ser Met Leu Lys Ser Phe Ser Tyr Leu Gly Val Asp Leu Leu Glu Ser
 50 55 60
 Thr Ile Trp Leu Phe Leu Ile Leu Tyr Leu Asp Gly Leu Thr Lys Glu
 65 70 75 80
 Asn Thr Leu Leu Asn Trp Thr Cys Trp Val Ala Tyr Trp Leu Tyr Gln
 85 90 95
 Gly Leu Thr Trp Thr Gly Ile Trp Val Leu Ala His Glu Cys Gly His
 100 105 110
 Gly Gly Phe Val Ala Gln Glu Trp Leu Asn Asp Thr Val Gly Phe Ile
 115 120 125
 Phe His Thr Val Leu Tyr Val Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Phe Ser His
 130 135 140
 Ala Lys His His His Tyr Thr Asn His Met Thr Lys Asp Glu Pro Phe
 145 150 155 160
 Val Pro His Thr Ile Thr Pro Glu Gln Arg Ala Lys Val Asp Gln Gly
 165 170 175
 Glu Leu Pro His Pro Asn Lys Pro Ser Leu Phe Ala Phe Tyr Glu Arg
 180 185 190
 Trp Val Ile Pro Phe Val Met Leu Phe Leu Gly Trp Pro Leu Tyr Leu
 195 200 205
 Ser Ile Asn Ala Ser Gly Pro Pro Lys Lys Glu Leu Val Ser His Tyr
 210 215 220
 Asp Pro Lys Ala Ser Ile Phe Asn Lys Lys Asp Trp Trp Lys Ile Leu
 225 230 235 240
 Leu Ser Asp Leu Gly Leu Val Ala Trp Thr Leu Ala Leu Trp Lys Leu
 245 250 255
 Gly Glu Thr Phe Gly Phe Gly Leu Val Ala Ala Leu Tyr Ile Pro Pro
 260 265 270
 Val Leu Val Thr Asn Ser Tyr Leu Val Ala Ile Thr Phe Leu Gln His
 275 280 285
 Thr Asp Asp Ile Leu Pro His Tyr Asp Ala Thr Glu Trp Thr Trp Leu
 290 295 300

ES 2 380 052 T3

Arg Gly Ala Leu Cys Thr Val Asp Arg Ser Leu Gly Trp Phe Gly Asp
 305 310 315 320
 Tyr Lys Thr His His Ile Val Asp Thr His Val Thr His His Ile Phe
 325 330 335
 Ser Tyr Leu Pro Phe Tyr Asn Ala Glu Glu Ala Thr Lys Ala Ile Lys
 340 345 350
 Pro Val Leu Lys Glu Tyr His Cys Glu Asp Lys Arg Gly Phe Phe His
 355 360 365
 Phe Trp Tyr Leu Phe Phe Lys Thr Ala Ala Glu Asn Ser Val Val Asp
 370 375 380
 Asn Glu Thr Asn Lys Ser Pro Gly Ile Phe Tyr Phe Phe Arg Glu Glu
 385 390 395 400
 Ile Lys His Gly Lys Ala His
 405

<210> 21

<211> 1224

<212> ADN

5 <213> Acanthamoeba castellanii

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1224)

<223> Delta-12/Delta-15-Desaturasa

10 <400> 21

atg acg atc acg acg acg cag aca ctg aat cag aag gca gcc aag aag	48
Met Thr Ile Thr Thr Thr Gln Thr Leu Asn Gln Lys Ala Ala Lys Lys	
1 5 10 15	
ggc gga aag gag cgc gct ccg atc att ccc aag gag aac gcc ccc ttc	96
Gly Gly Lys Glu Arg Ala Pro Ile Ile Pro Lys Glu Asn Ala Pro Phe	
20 25 30	
act ctg ggc cag atc aag ggc gcc att cct ccg cat ctc ttc aag cac	144
Thr Leu Gly Gln Ile Lys Gly Ala Ile Pro Pro His Leu Phe Lys His	
35 40 45	
agc atg ctc aaa tcc ttc agc tat ctg ggc gtg gat ctg ctg gag agc	192
Ser Met Leu Lys Ser Phe Ser Tyr Leu Gly Val Asp Leu Leu Glu Ser	
50 55 60	
acc atc tgg ctc ttc ctc atc ctc tac ctc gac ggc ctc acc aag gag	240
Thr Ile Trp Leu Phe Leu Ile Leu Tyr Leu Asp Gly Leu Thr Lys Glu	
65 70 75 80	

ES 2 380 052 T3

aac acg ctc ctc aac tgg act tgc tgg gtt gcg tac tgg ctc tac cag 288
 Asn Thr Leu Leu Asn Trp Thr Cys Trp Val Ala Tyr Trp Leu Tyr Gln
 85 90 95

ggt ctg acc tgg act ggc att tgg gtg ctg gcc cac gag tgt ggc cat 336
 Gly Leu Thr Phe Trp Thr Gly Ile Trp Val Leu Ala His Glu Cys Gly His
 100 105 110

ggc ggc ttc gtg gcg cag gag tgg ctc aac gac acg gtc ggc ttc atc 384
 Gly Gly Phe Val Ala Gln Glu Trp Leu Asn Asp Thr Val Gly Phe Ile
 115 120 125

ttc cac acc gtc ctc tac gtg ccc tac ttc tcg tgg aag ttc tcc cac 432
 Phe His Thr Val Leu Tyr Val Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Phe Ser His
 130 135 140

gcc aag cac cac cac tac acc aac cac atg aca aag gac gag ccc ttc 480
 Ala Lys His His His Tyr Thr Asn His Met Thr Lys Asp Glu Pro Phe
 145 150 155

gtg ccc cac acc atc acc cct gag cag agg gcc aag gtc gac cag ggc 528
 Val Pro His Thr Ile Thr Pro Glu Gln Arg Ala Lys Val Asp Gln Gly
 165 170 175

gag ctg ccc cac ccc aac aag ccc tcc ctc ttc gcc ttc tac gaa agg 576
 Glu Leu Pro His Pro Asn Lys Pro Ser Leu Phe Ala Phe Tyr Glu Arg
 180 185 190

tgg gtc atc ccc ttc gtc atg ctc ttc ctc gcc tgg ccg ctc tac ctg 624
 Trp Val Ile Pro Phe Val Met Leu Phe Leu Gly Trp Pro Leu Tyr Leu
 195 200 205

tcc atc aac gcc tct ggc cct ccc aag aag gag ctt gtg tcc cac tac 672
 Ser Ile Asn Ala Ser Gly Pro Pro Lys Lys Glu Leu Val Ser His Tyr
 210 215 220

gac ccc aaa gcc agc atc ttc aac aag aag gac tgg tgg aag atc ctt 720
 Asp Pro Lys Ala Ser Ile Phe Asn Lys Lys Asp Trp Trp Lys Ile Leu
 225 230 235 240

ctc tct gac ctc ggc ctt gtg gcg tgg acc ctg gcc ctc tgg aag ctg 768
 Leu Ser Asp Leu Gly Leu Val Ala Trp Thr Leu Ala Leu Trp Lys Leu
 245 250 255

ggc gag acc ttc ggc ttc ggt ctc gtg gcc gcc ctc tac att ccg ccc 816
 Gly Glu Thr Phe Gly Phe Gly Leu Val Ala Ala Leu Tyr Ile Pro Pro
 260 265 270

gtg ctg gtg acc aac tcc tac ctg gtg gcc atc acc ttc ctc cag cac 864
 Val Leu Val Thr Asn Ser Tyr Leu Val Ala Ile Thr Phe Leu Gln His
 275 280 285

acc gac gac att ctg ccc cac tac gac gcc acc gag tgg acc tgg ctc 912
 Thr Asp Asp Ile Leu Pro His Tyr Asp Ala Thr Glu Trp Thr Trp Leu
 290 295 300

agg ggt gct ctc tgc act gtt gat cgt tcg ctg gcc tgg ttc ggc gac 960
 Arg Gly Ala Leu Cys Thr Val Asp Arg Ser Leu Gly Trp Phe Gly Asp
 305 310 315 320

tac aag acg cac cac atc gtc gac acc cac gtg acg cac cac atc ttc 1008
 Tyr Lys Thr His His Ile Val Asp Thr His Val Thr His His Ile Phe
 325 330 335

tcg tac ctg ccg ttc tac aac gcc gag gag gcc acc aag gcc atc aag 1056
 Ser Tyr Leu Pro Phe Tyr Asn Ala Glu Glu Ala Thr Lys Ala Ile Lys
 340 345 350

ccc gtg ctc aag gag tac cac tgc gag gac aag cgt gcc ttc ttc cac 1104
 Pro Val Leu Lys Glu Tyr His Cys Glu Asp Lys Arg Gly Phe Phe His
 355 360 365

ttc tgg tat ctg ttc ttc aag acc gcc gcc gag aac agc gtt gtc gac 1152
 Phe Trp Tyr Leu Phe Phe Lys Thr Ala Ala Glu Asn Ser Val Val Asp
 370 375 380

aac gag acc aac aag agc ccc gcc atc ttc tac ttc ttc cgg gag gag 1200
 Asn Glu Thr Asn Lys Ser Pro Gly Ile Phe Tyr Phe Phe Arg Glu Glu
 385 390 395 400

atc aag cac ggc aag gcc cac tag 1224
 Ile Lys His Gly Lys Ala His
 405

<210> 22

<211> 407

ES 2 380 052 T3

<212> PRT

<213> Acanthamoeba castellanii

<400> 22

Met Thr Ile Thr Thr Thr Gln Thr Leu Asn Gln Lys Ala Ala Lys Lys
 1 5 10 15
 Gly Gly Lys Glu Arg Ala Pro Ile Ile Pro Lys Glu Asn Ala Pro Phe
 20 25 30
 Thr Leu Gly Gln Ile Lys Gly Ala Ile Pro Pro His Leu Phe Lys His
 35 40 45
 Ser Met Leu Lys Ser Phe Ser Tyr Leu Gly Val Asp Leu Leu Glu Ser
 50 55 60
 Thr Ile Trp Leu Phe Leu Ile Leu Tyr Leu Asp Gly Leu Thr Lys Glu
 65 70 75 80
 Asn Thr Leu Leu Asn Trp Thr Cys Trp Val Ala Tyr Trp Leu Tyr Gln
 85 90 95
 Gly Leu Thr Trp Thr Gly Ile Trp Val Leu Ala His Glu Cys Gly His
 100 105 110
 Gly Gly Phe Val Ala Gln Glu Trp Leu Asn Asp Thr Val Gly Phe Ile
 115 120 125
 Phe His Thr Val Leu Tyr Val Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Phe Ser His
 130 135 140
 Ala Lys His His His Tyr Thr Asn His Met Thr Lys Asp Glu Pro Phe
 145 150 155 160
 Val Pro His Thr Ile Thr Pro Glu Gln Arg Ala Lys Val Asp Gln Gly

ES 2 380 052 T3

atg Met 1	acc Thr	caa Gln	act Thr	gag Glu 5	gtc Val	caa Gln	gcc Ala	gga Gly 10	ccg Pro	tgt Cys	aga Arg	gat Asp	ggt Gly 15	agg Arg	aac Asn	48
ctc Leu	aag Lys	agt Ser	gag Glu 20	gct Ala	gat Asp	gtt Val	aaa Lys	ggc Gly 25	ttc Phe	act Thr	gcg Ala	gag Glu 30	gag Glu 30	ttt Phe	act Thr	96
aag Lys	ggt Val	ggg Gly 35	ccg Pro	tct Ser	gtg Val	tgt Cys	gct Ala 40	ata Ile	caa Gln	tca Ser	gct Ala	atc Ile 45	ccc Pro	atg Met	cac His	144
tgt Cys	cg Arg 50	gat Asp	agg Arg	agc Ser	ctg Leu	tca Ser 55	agg Arg	tct Ser	gtc Val	cta Leu	tgc Cys 60	gtc Val	atc Ile	agg Arg	gat Asp	192
ctc Leu 65	ctc Leu	tac Tyr	ata Ile	aca Thr	gca Ala 70	tgt Cys	gct Ala	gct Ala	gtg Val	cag Gln 75	tac Tyr	tct Ser	ctg Leu	ttg Leu	gcg Ala 80	240
tta Leu	gta Val	ccc Pro	ccg Pro	gac Asp 85	tca Ser	acc Thr	ctc Leu	ctg Leu	agg Arg 90	gca Ala	gtc Val	ctc Leu	tgg Trp 95	ggt Gly 95	gtt Val	288
tac Tyr	att Ile	ttc Phe	tgg Trp 100	caa Gln	ggc Gly	gtc Val	ttt Phe	ttt Phe 105	act Thr	ggt Gly	att Ile	tgg Trp 110	gtg Val 110	atg Met	ggc Gly	336
cac His	gag Glu 115	tgc Cys	ggc Gly	cat His	ggg Gly	gct Ala	ttt Phe 120	tcc Ser	cct Pro	tat Tyr	tct Ser	atg Met 125	ctg Leu	aac Asn	gat Asp	384
agt Ser	att Ile 130	ggt Gly	ttt Phe	gtc Val	ctc Leu	cac His 135	tcg Ser	gcc Ala	ctc Leu	ttg Leu	gta Val 140	ccc Pro	tac Tyr	ttc Phe	agc Ser	432
tgg Trp 145	cag Gln	tac Tyr	tcc Ser	cat His	gca Ala 150	agg Arg	cac His	cat His	aag Lys	ttc Phe 155	acc Thr	aac Asn	cac His	gct Ala	act Thr 160	480
aag Lys	ggt Gly	gag Glu	agc Ser	cat His 165	gtc Val	ccc Pro	agc Ser	ctg Leu	gaa Glu 170	agt Ser	gag Glu	atg Met	ggc Gly 175	gta Val 175	ttc Phe	528
agt Ser	cg Arg	ata Ile	cag Gln 180	aag Lys	gcc Ala	ctg Leu	gag Glu	ggt Gly 185	tat Tyr	ggt Gly	ctc Leu	gat Asp	gat Asp 190	gtc Val	ttc Phe	576
cca Pro	gtc Val	ttc Phe 195	cct Pro	ata Ile	gtg Val	atg Met 200	ctc Leu	ctg Leu	ggt Val	ggg Gly	tat Tyr	cct Pro 205	gtg Val	tat Tyr	ctc Leu	624
ttc Phe	tgg Trp	aat Asn	gca Ala	tca Ser	ggt Gly	ggg Gly	cg Arg	gtg Val	ggc Gly	tac Tyr	gat Asp	cg Arg	cg Arg	ccg Pro	tac Tyr	672

ES 2 380 052 T3

210	215	220		
agc gac act aag cca tct cat ttc aat ccc aac ggt ggc ctt ttc cct				720
Ser Asp Thr Lys Pro Ser His Phe Asn Pro Asn Gly Gly Leu Phe Pro				
225	230	235	240	
cct tat atg aga gag aaa gtc ctc ctt agt gga gtt ggc tgt agc ata				768
Pro Tyr Met Arg Glu Lys Val Leu Leu Ser Gly Val Gly Cys Ser Ile				
245	250	255		
acc ctc ctt att ttg gcc tat tgt gct ggg agg gta ggc ctt agc agt				816
Thr Leu Leu Ile Leu Ala Tyr Cys Ala Gly Arg Val Gly Leu Ser Ser				
260	265	270		
gta ttg ttg tgg tat ggt tgt ccc tac ctt atg acc aac gcc tgg cta				864
Val Leu Leu Trp Tyr Gly Cys Pro Tyr Leu Met Thr Asn Ala Trp Leu				
275	280	285		
acg ctg tat acc tcc cta cag cac acg cat gaa gga gtc ccc cat tat				912
Thr Leu Tyr Thr Ser Leu Gln His Thr His Glu Gly Val Pro His Tyr				
290	295	300		
ggc gat gag gct ttc acc ttc atc aga ggt gcc tta gct tct atc gat				960
Gly Asp Glu Ala Phe Thr Phe Ile Arg Gly Ala Leu Ala Ser Ile Asp				
305	310	315	320	
cgt cca ccg tat ggc att ttc tct acg cat ttt cac cac gaa att ggc				1008
Arg Pro Pro Tyr Gly Ile Phe Ser Thr His Phe His His Glu Ile Gly				
325	330	335		
acc act cat gtt ctg cac cac att gat tct agg atc ccc tgt tac cat				1056
Thr Thr His Val Leu His His Ile Asp Ser Arg Ile Pro Cys Tyr His				
340	345	350		
gct aga gaa gcc act gat gct atc aag cct att ctg ggg gat tac tat				1104
Ala Arg Glu Ala Thr Asp Ala Ile Lys Pro Ile Leu Gly Asp Tyr Tyr				
355	360	365		
agg gag gat ggt act cct ata gta aag gca ttt ttg aag gtc cac aga				1152
Arg Glu Asp Gly Thr Pro Ile Val Lys Ala Phe Leu Lys Val His Arg				
370	375	380		
gag tgc aag ttc atc gga ggc ctc aac ggc gtc cag ttt tac cgt cct				1200
Glu Cys Lys Phe Ile Gln Gly Gly Leu Asn Gly Val Gln Phe Tyr Arg Pro				
385	390	395	400	
ggg cag cgg ccg cag cag cag ccc tgc ggc agc aac gct cgc act tct				1248
Gly Gln Arg Pro Gln Gln Gln Pro Cys Gly Ser Asn Ala Arg Thr Ser				
405	410	415		
cgt tag				1254
Arg				

<210> 24

<211> 417

<212> PRT

5 <213> Perkinsus marinus

<400> 24

Met	Thr	Gln	Thr	Glu	Val	Gln	Ala	Gly	Pro	Cys	Arg	Asp	Gly	Arg	Asn
1				5					10					15	

ES 2 380 052 T3

Leu Lys Ser Glu Ala Asp Val Lys Gly Phe Thr Ala Glu Glu Phe Thr
 20 25 30
 Lys Val Gly Pro Ser Val Cys Ala Ile Gln Ser Ala Ile Pro Met His
 35 40 45
 Cys Arg Asp Arg Ser Leu Ser Arg Ser Val Leu Cys Val Ile Arg Asp
 50 55 60
 Leu Leu Tyr Ile Thr Ala Cys Ala Ala Val Gln Tyr Ser Leu Leu Ala
 65 70 75 80
 Leu Val Pro Pro Asp Ser Thr Leu Leu Arg Ala Val Leu Trp Gly Val
 85 90 95
 Tyr Ile Phe Trp Gln Gly Val Phe Phe Thr Gly Ile Trp Val Met Gly
 100 105 110
 His Glu Cys Gly His Gly Ala Phe Ser Pro Tyr Ser Met Leu Asn Asp
 115 120 125
 Ser Ile Gly Phe Val Leu His Ser Ala Leu Leu Val Pro Tyr Phe Ser
 130 135 140
 Trp Gln Tyr Ser His Ala Arg His His Lys Phe Thr Asn His Ala Thr
 145 150 155 160
 Lys Gly Glu Ser His Val Pro Ser Leu Glu Ser Glu Met Gly Val Phe
 165 170 175
 Ser Arg Ile Gln Lys Ala Leu Glu Gly Tyr Gly Leu Asp Asp Val Phe
 180 185 190
 Pro Val Phe Pro Ile Val Met Leu Leu Val Gly Tyr Pro Val Tyr Leu
 195 200 205
 Phe Trp Asn Ala Ser Gly Gly Arg Val Gly Tyr Asp Arg Arg Pro Tyr
 210 215 220
 Ser Asp Thr Lys Pro Ser His Phe Asn Pro Asn Gly Gly Leu Phe Pro
 225 230 235 240
 Pro Tyr Met Arg Glu Lys Val Leu Leu Ser Gly Val Gly Cys Ser Ile
 245 250 255
 Thr Leu Leu Ile Leu Ala Tyr Cys Ala Gly Arg Val Gly Leu Ser Ser
 260 265 270
 Val Leu Leu Trp Tyr Gly Cys Pro Tyr Leu Met Thr Asn Ala Trp Leu
 275 280 285

ES 2 380 052 T3

Thr Leu Tyr Thr Ser Leu Gln His Thr His Glu Gly Val Pro His Tyr
 290 295 300
 Gly Asp Glu Ala Phe Thr Phe Ile Arg Gly Ala Leu Ala Ser Ile Asp
 305 310 315 320
 Arg Pro Pro Tyr Gly Ile Phe Ser Thr His Phe His His Glu Ile Gly
 325 330 335
 Thr Thr His Val Leu His His Ile Asp Ser Arg Ile Pro Cys Tyr His
 340 345 350
 Ala Arg Glu Ala Thr Asp Ala Ile Lys Pro Ile Leu Gly Asp Tyr Tyr
 355 360 365
 Arg Glu Asp Gly Thr Pro Ile Val Lys Ala Phe Leu Lys Val His Arg
 370 375 380
 Glu Cys Lys Phe Ile Gly Gly Leu Asn Gly Val Gln Phe Tyr Arg Pro
 385 390 395 400
 Gly Gln Arg Pro Gln Gln Gln Pro Cys Gly Ser Asn Ala Arg Thr Ser
 405 410 415

Arg

<210> 25

<211> 31

<212> ADN

5 <213> desconocido

<220>

<223> secuencia artificial

<220>

<221> misc_feature

10 <222> (1)..(31)

<223>

<400> 25

ggtaccatgg cgatcaccgac gacgcagaca c 31

<210> 26

15 <211> 34

<212> ADN

<213> desconocido

<220>

<223> secuencia artificial

20 <220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(34)

<223>

<400> 26
 gagctcctag tgggccttgc cgtgcttgat ctcc 34
 <210> 27
 <211> 30
 5 <212> ADN
 <213> desconocido
 <220>
 <223> secuencia artificial
 <220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (1)..(30)
 <223>
 <400> 27
 ggtaccatgg tcctcacaac cccggccctc 30
 15 <210> 28
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> desconocido
 <220>
 20 <223> secuencia artificial
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(29)
 <223>
 25 <400> 28
 ggagctctca gttctcagca cccatcttc 29
 <210> 29
 <211> 26
 <212> ADN
 30 <213> desconocido
 <220>
 <223> secuencia artificial
 <220>
 <221> misc_feature
 35 <222> (1)..(26)
 <223>
 <400> 29

ggtaccatgg ccaccgcatc tgcac 26
 <210> 30
 <211> 27
 <212> ADN
 5 <213> desconocido
 <220>
 <223> secuencia artificial
 <220>
 <221> misc_feature
 10 <222> (1)..(27)
 <223>
 <400> 30
 ggagctttag ccgtagtagg cctcct 27
 <210> 31
 15 <211> 26
 <212> ADN
 <213> desconocido
 <220>
 <223> secuencia artificial
 20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(26)
 <223>
 <400> 31
 25 ggtaccatgg cggctgcgac ggcgac 26
 <210> 32
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> desconocido
 30 <220>
 <223> secuencia artificial
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(27)
 35 <223>
 <400> 32
 ggagctttag tcgtgctcc tctggg 27

<210> 33
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> desconocido
 5 <220>
 <223> secuencia artificial
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(26)
 10 <223>
 <400> 33
 ggtaccatga cccaaactga ggtcca 26
 <210> 34
 <211> 26
 15 <212> ADN
 <213> desconocido
 <220>
 <223> secuencia artificial
 <220>
 20 <221> misc_feature
 <222> (1)..(26)
 <223>
 <400> 34
 ggagctctaa cgagaagtgc gagcgt 26
 25 <210> 35
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> desconocido
 <220>
 30 <223> secuencia artificial
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(26)
 <223>
 35 <400> 35
 ggtaccatgt cttctttac cctcta 26
 <210> 36

<211> 26
 <212> ADN
 <213> desconocido
 <220>
 5 <223> secuencia artificial
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(26)
 <223>
 10 <400> 36
 ggagctctat tcactatgg caacag 26
 <210> 37
 <211> 26
 <212> ADN
 15 <213> desconocido
 <220>
 <223> secuencia artificial
 <220>
 <221> misc_feature
 20 <222> (1)..(26)
 <223>
 <400> 37
 ggtaccatga ctactcaac cactac 26
 <210> 38
 25 <211> 26
 <212> ADN
 <213> desconocido
 <220>
 <223> secuencia artificial
 30 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(26)
 <223>
 <400> 38
 35 ggagctctac ctagcaagca atctct 26
 <210> 39
 <211> 34

<212> ADN
 <213> desconocido
 <220>
 <223> secuencia artificial
 5 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(34)
 <223>
 <400> 39
 10 ggatccacca tggcgatcac gacgacgcag acac 34
 <210> 40
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> desconocido
 15 <220>
 <223> secuencia artificial
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(36)
 20 <223>
 <400> 40
 ggtctagact agtgggcctt gccgtgcttg atctcc 36
 <210> 41
 <211> 33
 25 <212> ADN
 <213> desconocido
 <220>
 <223> secuencia artificial
 <220>
 30 <221> misc_feature
 <222> (1)..(33)
 <223>
 <400> 41
 ggatccagga tggctctcac aaccccgcc ctc 33
 35 <210> 42
 <211> 30
 <212> ADN

<213> desconocido
 <220>
 <223> secuencia artificial
 <220>
 5 <221> misc_feature
 <222> (1)..(30)
 <223>
 <400> 42
 ggcttagatc agttctcagc acccatctc 30
 10 <210> 43
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> desconocido
 <220>
 15 <223> secuencia artificial
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(26)
 <223>
 20 <400> 43
 ggatccatgg ccaccgcatc tgcac 26
 <210> 44
 <211> 29
 <212> ADN
 25 <213> desconocido
 <220>
 <223> secuencia artificial
 <220>
 <221> misc_feature
 30 <222> (1)..(29)
 <223>
 <400> 44
 ggtctagatt agccgtagta ggcctcct 29
 <210> 45
 35 <211> 26
 <212> ADN
 <213> desconocido

<220>
 <223> secuencia artificial
 <220>
 <221> misc_feature
 5 <222> (1)..(26)
 <223>
 <400> 45
 ggatccatgg cggctgcgac ggcgac 26
 <210> 46
 10 <211> 29
 <212> ADN
 <213> desconocido
 <220>
 <223> secuencia artificial
 15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(29)
 <223>
 <400> 46
 20 ggtctagatt agtcgtgctt cctcttggg 29
 <210> 47
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> desconocido
 25 <220>
 <223> secuencia artificial
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(26)
 30 <223>
 <400> 47
 ggatccatga cccaaactga ggtcca 26
 <210> 48
 <211> 28
 35 <212> ADN
 <213> desconocido
 <220>

<223> secuencia artificial
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(28)
 5 <223>
 <400> 48
 ggtctagact aacgagaagt gcgagcgt 28
 <210> 49
 <211> 26
 10 <212> ADN
 <213> desconocido
 <220>
 <223> secuencia artificial
 <220>
 15 <221> misc_feature
 <222> (1)..(26)
 <223>
 <400> 49
 ggatccatgt ctctcttac cctcta 26
 20 <210> 50
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> desconocido
 <220>
 25 <223> secuencia artificial
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(28)
 <223>
 30 <400> 50
 ggtctagact attccactat ggcaacag 28
 <210> 51
 <211> 26
 <212> ADN
 35 <213> desconocido
 <220>
 <223> secuencia artificial

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(26)

<223>

5 <400> 51

ggatccatga ctactcaac cactac 26

<210> 52

<211> 28

<212> ADN

10 <213> desconocido

<220>

<223> secuencia artificial

<220>

<221> misc_feature

15 <222> (1)..(28)

<223>

<400> 52

ggcttagact acctagcaag caatctct 28

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la producción de ácido araquidónico o ácido eicosapentanoico o ácido araquidónico y ácido eicosapentanoico en plantas transgénicas que producen semillas maduras con un contenido de por lo menos 1 % en peso de dichos compuestos denominados como el contenido total de lípidos de dicho organismo que comprende las siguientes etapas:
- 5 a) introducción de por lo menos una secuencia de ácidos nucleicos en dicha planta transgénica, que codifica un polipéptido que tiene una actividad A-1 2-desaturasa- y Δ -15-desaturasa, y
- 10 b) introducción de por lo menos una segunda secuencia de ácidos nucleicos en dicha planta transgénica, que codifica un polipéptido que tiene una actividad Δ -9-elongasa, y
- c) introducción de por lo menos una tercera secuencia de ácidos nucleicos en dicha planta transgénica, que codifica un polipéptido que tiene una actividad A-8-desaturasa, y
- d) introducción de por lo menos una cuarta secuencia de ácidos nucleicos, que codifica un polipéptido que tiene una actividad Δ -5- desaturasa, y
- 15 e) cultivo y cosecha de dicha planta transgénica, en donde las secuencias de ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos tienen actividad Δ -12-desaturasa y Δ -15-desaturasa, actividad Δ -8-desaturasa, Δ -9-elongasa o Δ -5-desaturasa se seleccionan del grupo que consiste de
- i) una secuencia de ácidos nucleicos descrita en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 21, y
- 20 ii) una secuencia de ácidos nucleicos, que, como resultado de la degeneración del código genético, se puede derivar de un secuencia de polipéptido como se describe en la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 20 o SEQ ID NO: 22 de acuerdo con la degeneración del código genético,
- iii) derivados de las secuencias de ácidos nucleicos descritas en la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 21 que codifican los polipéptidos tienen por lo menos 70 % de homología con la secuencia como se describe en la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 20 o SEQ ID NO: 22 y cuyos polipéptidos tienen actividad Δ -12-desaturasa y Δ -15-desaturasa, actividad Δ -8-desaturasa, Δ -9- elongasa o Δ -5-desaturasa.
- 25
2. El proceso como se reivindica en la reivindicación 1, en donde la planta transgénica que produce semillas maduras es una planta oleaginosa.
- 30
3. El proceso como se reivindica en la reivindicación 1, en donde la planta transgénica que produce semillas maduras se selecciona del grupo que consiste de las familias de la planta de Anacardiáceas, Asteráceas, Apiáceas, Boragináceas, Brasicáceas, Cannabáceas, Elaeagnáceas, Euphorbiáceas, Fabáceas, Geraniáceas, Gramináceas, Juglandáceas, Leguminosáceas, Lináceas, Litrarieáceas, Malváceas, Onagráceas, Palmáceas, Poáceas, Rubiáceas, Escrofulariáceas, Solanáceas, Esterculiáceas y Teáceas.
- 35
4. El proceso como se reivindica en la reivindicación 1, en donde la planta transgénica que produce semillas maduras se selecciona del grupo que consiste del género de planta de Pistacia, Mangifera, Anacardium, Caléndula, Carthamus, Centaurea, Cichorium, Cynara, Helianthus, Lactuca, Locusta, Caléndula, Valeriana, Borago, Daucus, Brassica, Camelina, Melanosinapis, Sinapis, Arabadopsis, Orychophragmus, Cannabis, Elaeagnus, Manihot, Janipha, Jatropha, Ricinus, Pisum, Albizia, Cathormion, Feuillea, Inga, Pithecolobium, Acacia, Mimosa, Medicago, Glycine, Dolichos, Phaseolus, Pelargonium, Cocos, Oleum, Juglans, Wallia, Arachis, Linum, Granada, Gossypium, Camissonia, Oenothera, Elaeis, Hordeum, Secale, Avena, Sorghum, Andropogon, Holcus, Panicum, Oryza, Zea, Triticum, Coffea, Mitrún, Capsicum, Nicotiana, Solanum, Lycopersicon, Theobroma y Camellia.
- 40
5. El proceso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la planta transgénica se selecciona del grupo que consiste de colza, amapola, mostaza, cáñamo, grano de ricino, sésamo, oliva, caléndula, granada, avellana, maíz, almendra, macadamia, algodón, aguacate, calabaza, nuez, laurel, pistacho, primavera, canola, onagra, aceite de palma, cacahuete, semilla de lino, soja, alazor, caléndula, café, tabaco, cacao, girasol y borraja.
- 45
6. El proceso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el ácido araquidónico o ácido eicosapentanoico o ácido araquidónico y ácido eicosapentanoico se aísla en la forma de sus aceites, lípidos de ácidos grasos libres.
- 50
7. El proceso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde ácido araquidónico y ácido eicosapentanoico se produce en por lo menos una relación 1:2.

8. El proceso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el ácido araquidónico y ácido eicosapentanoico se producen en un contenido de por lo menos 5 % en peso denominados como el contenido total de lípidos.
- 5 9. El proceso como se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la Δ -12-desaturasa- y Δ -15-desaturasa utilizadas en el proceso desatura los ácidos grasos C16 o C18 que tienen un enlace doble en la cadena de ácido graso o los ácidos grasos C16 y C18 que tienen un enlace doble en la cadena de ácido graso.
10. Una secuencia de ácidos nucleicos aislada que codifica un polipéptido que tiene una actividad Δ -12-desaturasa y Δ -15-desaturasa seleccionada del grupo que consiste de
- i) una secuencia de ácidos nucleicos descrita en la SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 21;
- 10 ii) una secuencia de ácidos nucleicos, que, como resultado de la degeneración del código genético, se puede derivar de un secuencia de polipéptido como se describe en la SEQ ID NO: 20 o SEQ ID NO: 22;
- iii) derivados de la secuencia de ácidos nucleicos descrita en la SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 22 que codifican los polipéptidos que tienen por lo menos 70% de homología con la secuencia como se describe en la SEQ ID NO: 20 o SEQ ID NO: 22 y cuyos polipéptidos tienen actividad Δ -12-desaturasa y Δ -15-desaturasa.
- 15 11. Un polipéptido codificado por una secuencia de ácidos nucleicos aislada como se reivindica en la reivindicación 10.
12. Una construcción de gen que comprende un ácido nucleico aislado que tiene la secuencia SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 21 como se reivindica en la reivindicación 10, en donde el ácido nucleico se liga funcionalmente a una o más señales reguladoras.
- 20 13. Una construcción de gen como se reivindica en la reivindicación 12, cuya expresión de gen se aumenta por las señales reguladoras.
14. Un vector que comprende un ácido nucleico como se reivindica en la reivindicación 10 o una construcción de gen como se reivindica en la reivindicación 13.
- 25 15. Una planta transgénica que comprende por lo menos un ácido nucleico como se reivindica en la reivindicación 10, una construcción de gen como se reivindica en la reivindicación 13 o un vector como se reivindica en la reivindicación 14.
16. La planta transgénica como se reivindica en la reivindicación 15, en donde la planta es una planta oleaginosa.

Figura 1: Ruta de biosíntesis para ARA y/o EPA

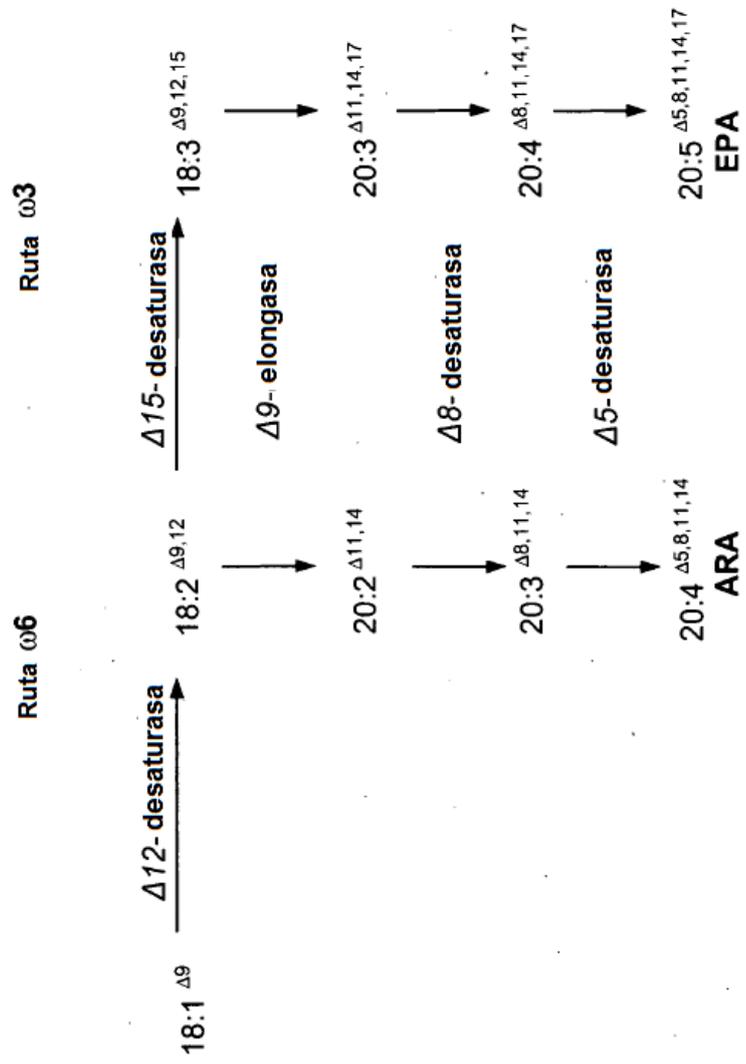


Figura 2A: Comparación del perfil de ácido graso de levadura transformada con las construcciones pYES2 (2A) como control y construcción pYES2-12Ac (2B). Se marcan los ácidos grasos. Los nuevos ácidos grasos sintetizados son en el caso de construcción de pYES2-12Ac (2B) de los ácidos grasos C16:2, C16:3, C18:2 y C18:3.

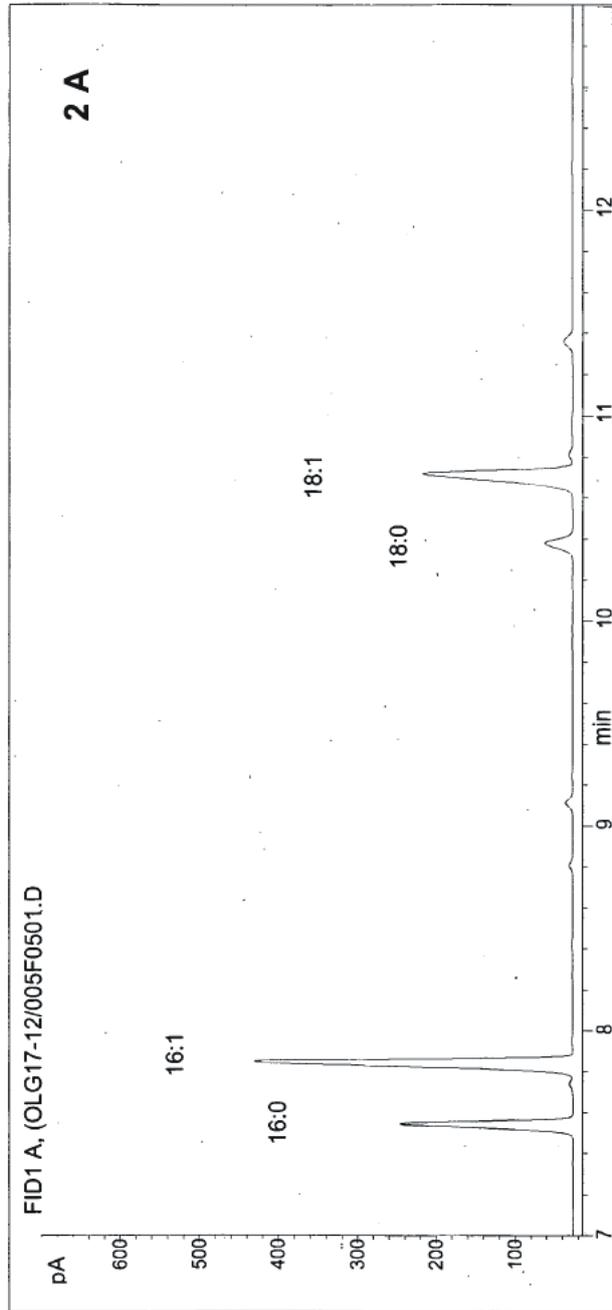


Figura 2A: Comparación del perfil de ácido graso de levadura transformada con las construcciones pYES2 (2A) como control y construcción pYES2-12Ac (2B). Se marcan los ácidos grasos. Los nuevos ácidos grasos sintetizados son en el caso de construcción de pYES2-12Ac (2B) de los ácidos grasos C16:2, C16:3, C18:2 y C18:3.

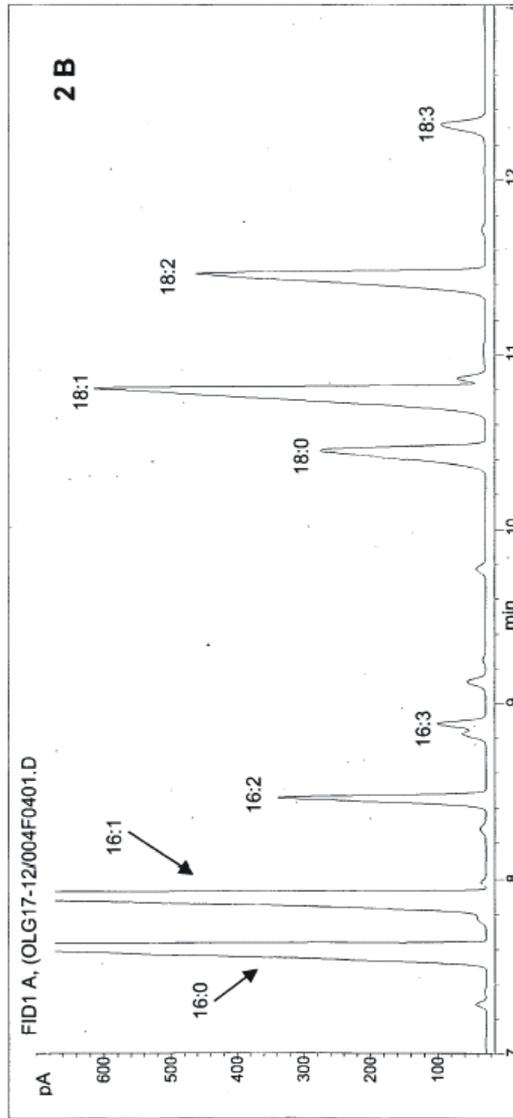


Figura 2B: Comparación del perfil de ácido graso de levadura transformada con las construcciones pYES2 (2A) como control y construcción pYES2-12Ac (2B). Se marcan los ácidos grasos. Los nuevos ácidos grasos sintetizados son en el caso de construcción de pYES2-12Ac (2B) de los ácidos grasos C16:2, C16:3, C18:2 y C18:3.

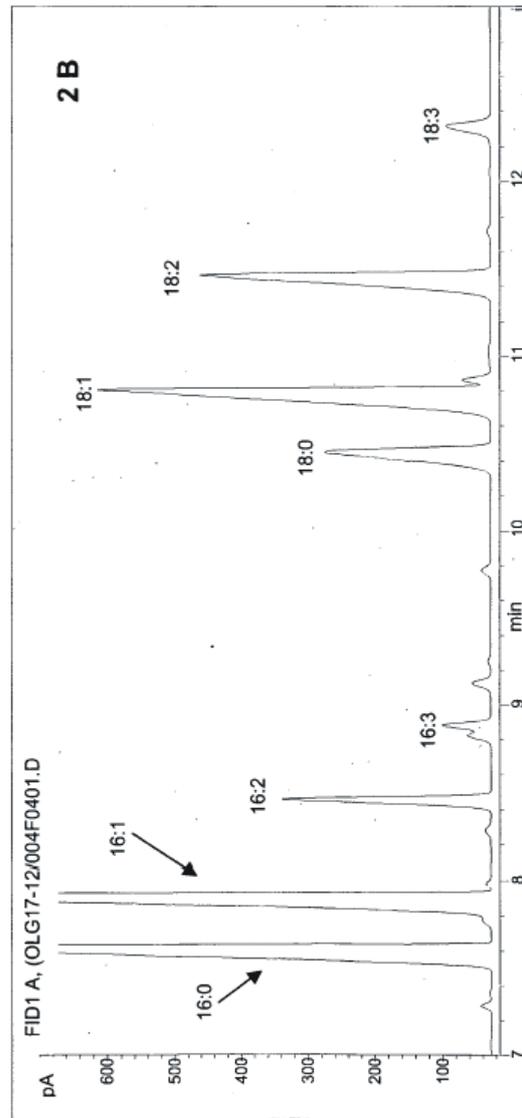


Figura 3A: Perfil de ácidos grasos de levaduras transformadas con la construcción pYES2 como control (Figura 3A) y pYES2-8Ac (Figura 3B) y se carga con el ácido graso C20:2Δ11,14. Se marcan los ácidos grasos respectivos.

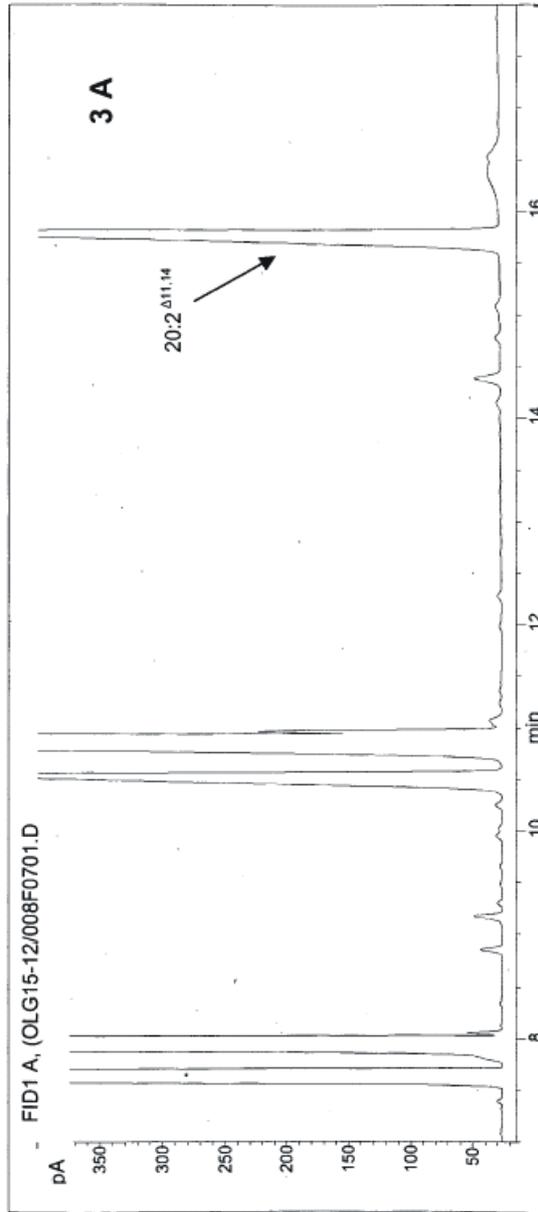


Figura 3B: Perfil de ácidos grasos de levaduras transformadas con la construcción pYES2 como control (Figura 3A) y pYES2-8Ac (Figura 3B) y se carga con el ácido graso C20:2Δ11,14. Se marcan los ácidos grasos respectivos.

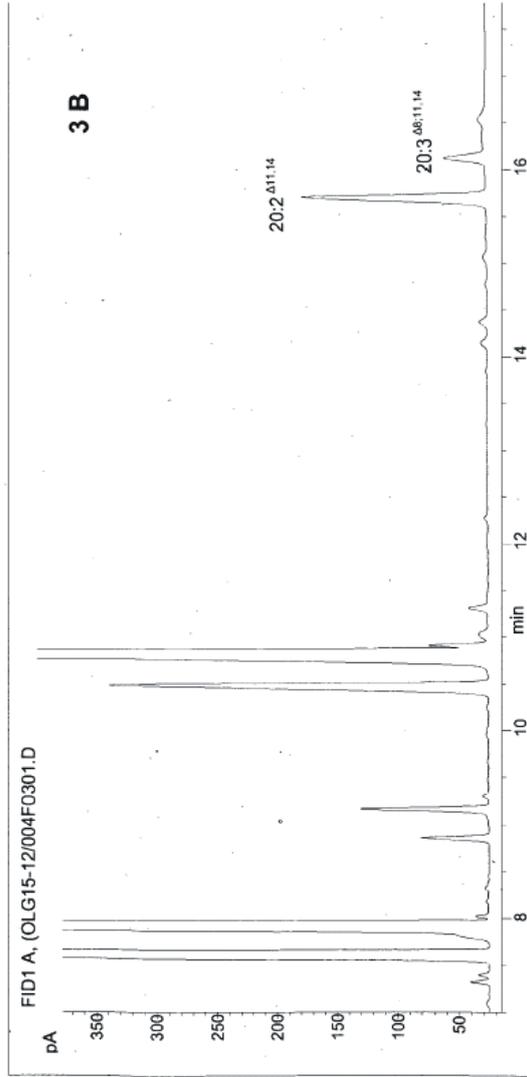


Figura 4A: Perfil de ácidos grasos de levaduras transformadas con la construcción pYES2 como control (Figura 4A) y pYES2-8Ac (Figura 4B) y se carga con el ácido graso C20:2 Δ 11,14,17. Se marcan los ácidos grasos respectivos.

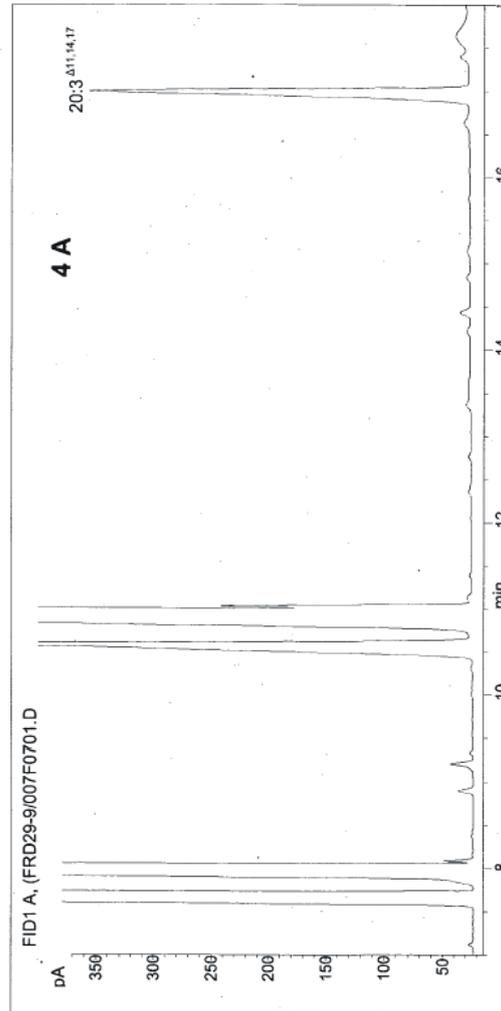


Figura 5A: Comparación del perfil de ácidos grasos de levaduras transformadas con la construcción pYES2 como control y se carga con el ácido graso C20:3n-6 (Figura 5A) y la construcción pYES2-6P, cargado con el ácido graso C20:3n-6 (Figura 5B). Los ácidos grasos se marcan. El nuevo ácido graso sintetizado es C20:4n-6 (ácido araquidónico).

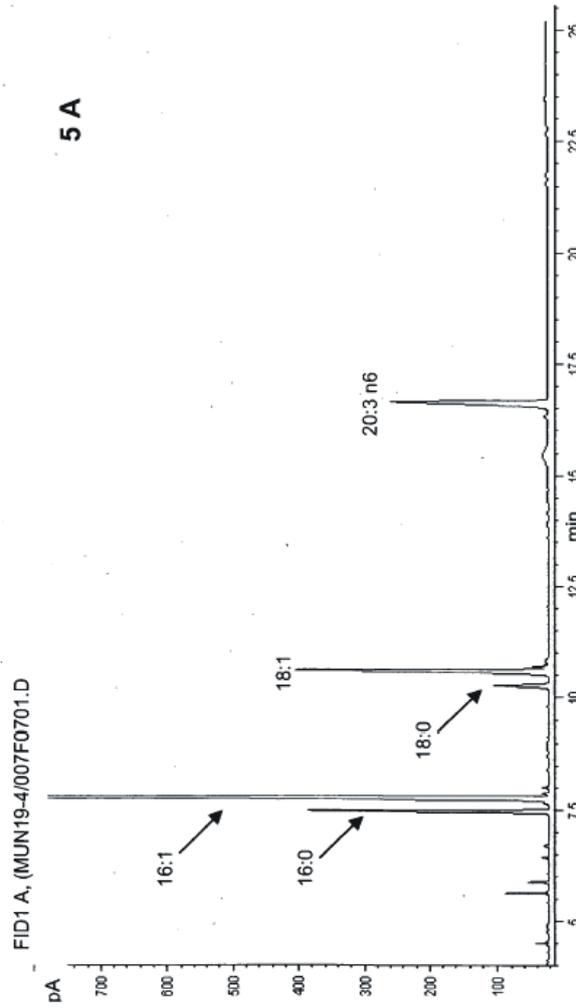


Figura 5B: Comparación del perfil de ácidos grasos de levaduras transformadas con la construcción pYES2 como control y se carga con el ácido graso C20:3n-6 (Figura 5A) y la construcción pYES2-5P, cargado con el ácido graso C20:3n-6 (Figura 5B). Los ácidos grasos se marcan. El nuevo ácido graso sintetizado es C20:4n-6 (ácido araquidónico).

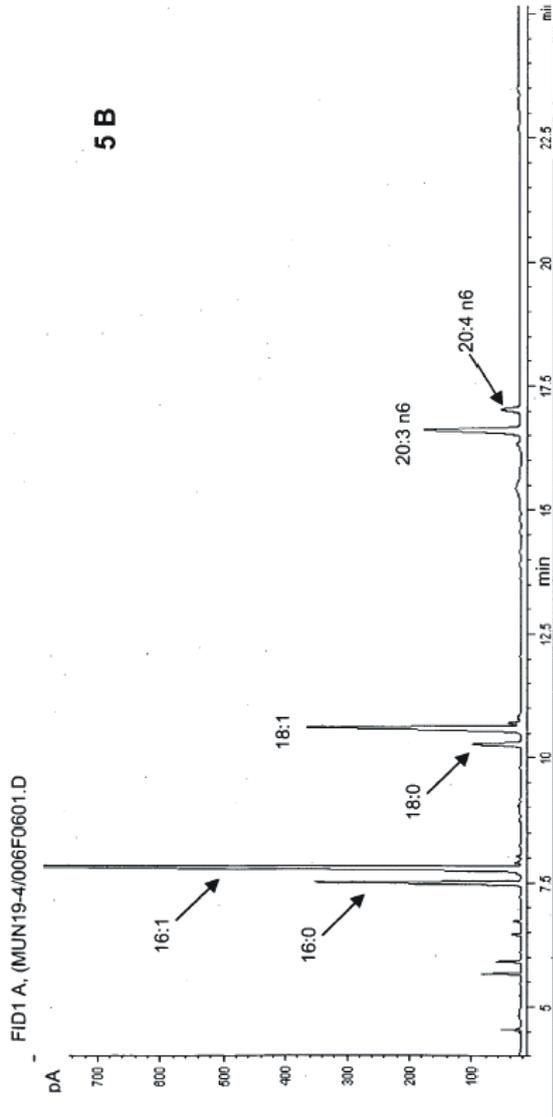


Figura 6: Expresión del AcD8 en Arabidopsis transgénica doble

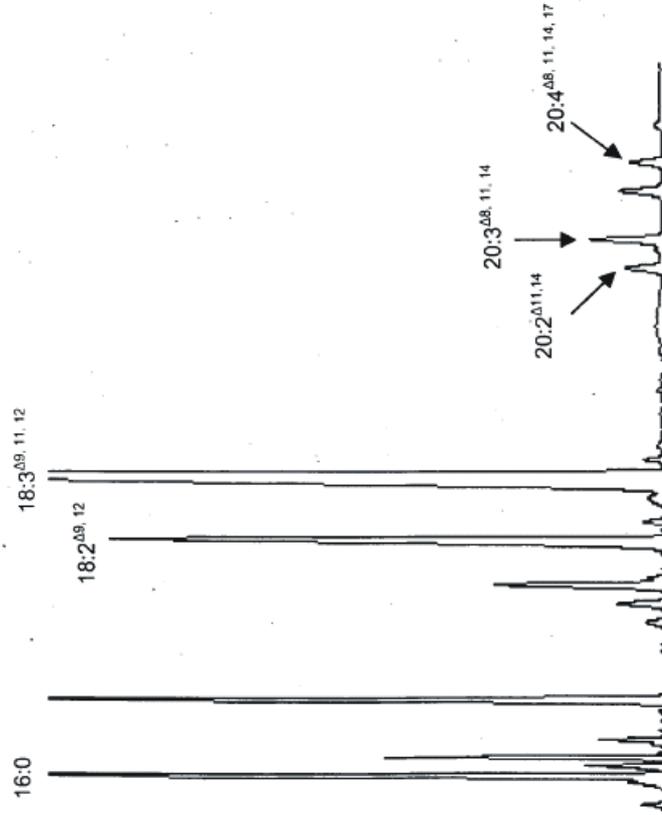


Figura 7A: Expresión de la Δ -9-elongasa o Δ -9-elongasa y Δ -8-desaturasa en Arabidopsis transgénica

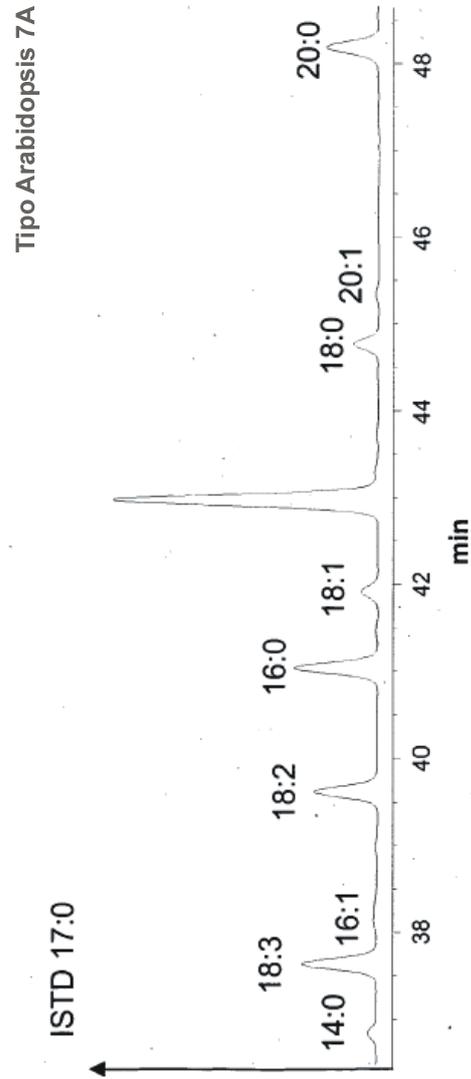


Figura 7B: Expresión de la Δ -9-elongasa o Δ -9-elongasa y Δ -8-desaturasa en Arabidopsis transgénica

7 B) Arabidopsis Δ 9elo

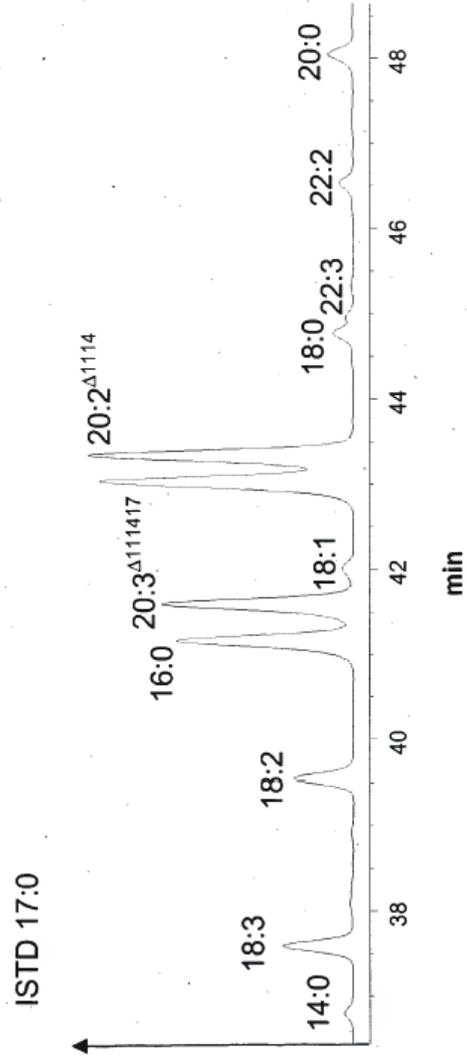


Figura 7C: Expresión de la Δ -9-elongasa o Δ -9-elongasa y Δ -8-desaturasa en Arabidopsis transgénica

7 C) Arabidopsis Δ 9elo Δ 8des

