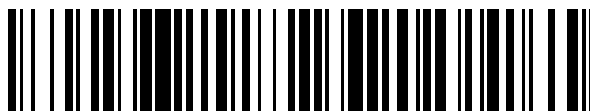


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 435 572**

51 Int. Cl.:

C12N 15/82 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 15/53 (2006.01)

C12P 7/64 (2006.01)

A01H 5/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.12.2009 E 09801425 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2013 EP 2376638**

54 Título: **Desaturasas y proceso para la producción de ácidos grasos poliinsaturados en organismos transgénicos**

30 Prioridad:

12.12.2008 EP 08171520

03.02.2009 EP 09151937

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

20.12.2013

73 Titular/es:

BASF PLANT SCIENCE GMBH (100.0%)
67056 Ludwigshafen, DE

72 Inventor/es:

NAPIER, JOHNATHAN A.;
SENGER, TORALF y
BAUER, JÖRG

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 435 572 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

Desaturasas y proceso para la producción de ácidos grasos poliinsaturados en organismos transgénicos

La presente invención se relaciona con polinucleótidos de *Cochliobolus heterostrophus* C5, *Cianotheca* sp. CCY0110, *Mycocentrospora acerina* y *Hyaloperonospora parasitica*, que codifican desaturasas y que se pueden emplear para la producción recombinante de ácidos grasos poliinsaturados. La invención adicionalmente se relaciona con vectores, células anfitrionas y organismos no humanos transgénicos que comprenden los polinucleótidos de acuerdo con la invención, y con los polipéptidos codificados por los polinucleótidos. La invención adicionalmente se relaciona con anticuerpos contra los polipéptidos de acuerdo con la invención. Finalmente, la invención también se relaciona con procesos de producción para los ácidos grasos poliinsaturados y para composiciones de aceite, lípido y ácido graso y con su uso como fármacos, cosméticos, alimentos, comida para animales, preferiblemente comida para peces, o suplementos alimenticios.

Los ácidos grasos y triacilglicéridos tienen una multiplicidad de aplicaciones en la industria alimenticia, en la nutrición animal, en cosméticos y en el sector farmacológico. Dependiendo de si son ácidos grasos insaturados o saturados libres o también triacilglicéridos con un contenido elevado de ácidos grasos saturados o insaturados, son adecuados para muchas aplicaciones diferentes. Los ácidos grasos poliinsaturados tales como ácido linoleico y ácido linolénico son esencialmente para mamíferos, ya que estos últimos no lo producen por sí mismos. Por lo tanto los ácidos ω 3-grasos y ω 6-grasos poliinsaturados son un constituyente importante en la nutrición animal y humana.

Los ácidos ω 3-grasos de cadena larga poliinsaturados tales como ácido eicosapentaenoico (= EPA, $C_{20}:5^{\Delta 5,8,11,14,17}$) o ácido docosahexaenoico (= DHA, $C_{22}:6^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$) son importantes componentes en la nutrición humana debido a sus diversas funciones en los aspectos de salud, que incluyen el desarrollo del cerebro del niño, la funcionalidad de los ojos, la síntesis de hormonas y otras sustancias de señal, y la prevención de trastornos cardiovasculares, cáncer y diabetes (Poulos, A Lípidos 30:1-14, 1995; Horrocks, LA and Yeo YK Pharmacol Res 40:211-225, 1999). Esto es por qué hay una demanda de la producción de ácidos grasos de cadena larga poliinsaturados.

Los ácidos ω 3-grasos, que se encuentran preferiblemente en aceites de pescado, al alimento es particularmente importante. Por lo tanto, por ejemplo, los ácidos grasos poliinsaturados tales como ácido docosahexaenoico (= DHA, $C_{22}:6^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$) o ácido eicosapentaenoico (= EPA, $C_{20}:5^{\Delta 5,8,11,14,17}$) se agrega a fórmula para bebés para mejorar el valor nutricional. Se dice que el ácido graso insaturado DHA tiene un efecto positivo sobre el desarrollo y mantenimiento de funciones cerebrales.

Aquí adelante, ácidos grasos poliinsaturados se refieren como PUFA, PUFAs, LCPUFA o LCPUFAs (ácidos grasos poliinsaturados, PUFA, ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, LCPUFA).

Los varios ácidos grasos y triglicéridos se obtienen principalmente a partir de microorganismos tales como *Mortierella* y *Schizochytrium* o a partir de plantas que producen aceite tales como soya, colza, algas tal como *Cryptocodinium* o *Phaeodactylum* y otros organismos, donde se obtienen, como una regla, en la forma de sus triacilglicéridos (= triglicéridos = triglicérols). Sin embargo, también se obtienen de animales, tales como, por ejemplo, pescado. Los ácidos grasos libres se preparan ventajosamente mediante hidrólisis. Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena muy larga tales como DHA, EPA, ácido araquidónico (= ARA, $C_{20}:4^{\Delta 5,8,11,14}$), ácido dihomo- γ -linolénico ($C_{20}:3^{\Delta 8,11,14}$) o ácido docosapentaenoico (DPA, $C_{22}:5^{\Delta 7,10,13,16,19}$) no se sintetizan en cultivos de aceite tales como colza, soya, girasol o cártamo. Las fuentes naturales convencionales de estos de estos ácidos grasos son pescado tal como arenque, salmón, sardinas, gallineta nórdica, anguila, carpa, trucha, mero, caballa, lucioperca o atún, o algas.

Dependiendo del uso destinado, se prefieren los aceites con ácidos grasos saturados o insaturados. En la nutrición humana, por ejemplo, lípidos con ácidos grasos insaturados, específicamente se prefieren los ácidos grasos poliinsaturados. Se dice que los ácidos ω 3-grasos poliinsaturados tienen un efecto positivo sobre el nivel de colesterol en la sangre y por lo tanto en la posibilidad de evitar enfermedades cardíacas. Se puede reducir notablemente el riesgo de enfermedad cardíaca, una apoplejía o hipertensión al agregar estos ácidos ω 3-grasos al alimento. También, los ácidos ω 3-grasos tienen un efecto positivo en enfermedades inflamatorias, específicamente sobre en enfermedades crónicamente inflamatorias, procesos en asociación con enfermedades inmunológicas tales como artritis reumatoide. Por lo tanto se agregan a los alimentos, específicamente a alimentos dietéticos, o se emplean en medicamentos. Los ácidos ω 6-grasos tales como ácido araquidónico tienden a tener un efecto negativo sobre estos trastornos en relación con enfermedades reumáticas por cuenta de nuestro consumo dietético usual.

Los ácidos ω 3- y ω 6-grasos son precursores de las hormonas de tejidos, conocidas como eicosanoides, tales como las prostaglandinas, que son derivadas de ácido dihomo- γ -linolénico, ácido araquidónico y ácido eicosapentaenoico, y de los tromboxanos y leucotrienos, que se derivan de ácido araquidónico y ácido eicosapentaenoico. Los eicosanoides que se forman a partir de ácidos ω 6-grasos (conocidos como la serie PG2) generalmente promueven

las reacciones inflamatorias, mientras que los eicosanoides de ácidos ω 3-grasos (conocidos como la serie PG3) tienen poco o no tienen efecto proinflamatorio.

Debido a sus características positivas, no han faltado intentos en el pasado para hacer disponibles los genes que están implicados en la síntesis de ácidos grasos o triglicéridos para la producción de aceites en diversos organismos con un contenido modificado de ácidos grasos insaturados. Así, el documento WO 91/13972 y su equivalente Estadounidense describe una Δ 9-desaturasa. El documento WO 93/11245 reivindica una Δ 15-desaturasa y el documento WO 94/11516 una Δ 12-desaturasa. Se describen desaturasas adicionales, por ejemplo, en los documentos EP-A-0 550 162, WO 94/18337, WO 97/30582, WO 97/21340, WO 95/18222, EP-A-0 794 250, Stukeley et al., J. Biol. Chem., 265, 1990: 20144-20149, Wada et al., Nature 347, 1990: 200-203 o Huang et al., Lípidos 34, 1999: 649-659. Sin embargo, la caracterización bioquímica de las diversas desaturasas hasta la fecha ha sido insuficiente debido a que las enzimas, que son proteínas unidas a membranas, presentan gran dificultad en su aislamiento y caracterización (McKeon et al., Methods in Enzymol. 71, 1981: 12141-12147, Wang et al., Plant Physiol. Biochem., 26, 1988: 777-792). Como una regla, las desaturasas unidas a membrana se caracterizan por estar introducidas en un organismo adecuado que posteriormente se analiza para actividad de enzima al analizar los materiales de partida y los productos. Se describen las Δ 6-Desaturasas en los documentos WO 93/06712, US 5,614,393, WO 96/21022, WO 00/21557 y WO 99/27111. Su aplicación para la producción en organismos transgénicos se describe, por ejemplo, en los documentos WO 98/46763, WO 98/46764 y WO 98/46765. En este contexto, también se describe y reivindica la expresión de diversas desaturasas y la formación de ácidos grasos poliinsaturados; véase, por ejemplo, los documentos WO 99/64616 o WO 98/46776. En cuanto a la eficacia de la expresión de las desaturasas y su efecto sobre la formación de ácidos grasos poliinsaturados, se debe notar que la expresión de una única desaturasa como se describe a la fecha solo ha resultado en contenidos bajos de ácidos grasos insaturados/lípidos tales como, por ejemplo, ácido γ -linolénico y ácido estearidónico. Más aún, s como una regla, se obtiene una mezcla de ácidos ω 3- y ω 6-grasos.

Los microorganismos especialmente adecuados para la producción de PUFAs son microalgas tales como *Phaeodactylum tricornutum*, *Porphyridium species*, *Thraustochytrium species*, *Schizochytrium species* o *Cryptothecodinium species*, ciliados tales como *Stylonychia* o *Colpidium*, hongos tales como *Mortierella*, *Entomofthora* o *Mucor* y/o musgos tales como *Physcomitrella*, preferiblemente *Physcomitrella patens*, *Ceratodon* y *Marchantia* (R. Vazhappilly & F. Chen (1998) *Botanica Marina* 41: 553-558; K. Totani & K. Oba (1987) *Lipids* 22: 1060-1062; M. Akimoto et al. (1998) *Appl. Biochemistry and Biotechnology* 73: 269-278). La selección de cepa ha resultado en el desarrollo de un número de cepas mutantes de los microorganismos en cuestión que producen una serie de compuestos deseables que incluyen PUFAs. Sin embargo, la mutación y selección de cepas con una producción mejorada de una molécula particular tal como los ácidos grasos poliinsaturados es un proceso difícil y que consume tiempo. Esto es porque se prefieren los métodos recombinantes como se describió anteriormente siempre que sea posible. Sin embargo, solo se pueden producir cantidades limitadas de los ácidos grasos poliinsaturados deseados tales como EPA, EPA o ARA con la ayuda de los microorganismos mencionados anteriormente. Más aún, dependiendo de los microorganismo utilizados, de manera general estos se generan COMO mezclas de ácidos grasos de, por ejemplo, EPA, DPA y ARA.

Una variedad de rutas sintéticas es la que se discute para la síntesis de ácido araquidónico, ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA). Por lo tanto, se producen EPA o DHA en bacterias marinas tales como *Vibrio sp.* o *Shewanella sp.* a través de la ruta policetida (Yu, R. et al. *Lipids* 35:1061-1064, 2000; Takeyama, H. et al. *Microbiology* 143:2725-2731, 1997).

Una estrategia alternativa es la actividad alterna de las desaturasas y elongasas (Zank, TK et al. *Plant Journal* 31:255-268, 2002; Sakuradani, E. et al. *Gene* 238:445-453, 1999). Una modificación de la ruta descrita en Zank et al. y en Sakuradani et al. a través Δ 6-desaturasa, Δ 6-elongasa, Δ 5-desaturasas, Δ 5-elongasa y Δ 4-desaturasas es la ruta de síntesis Sprecher (Sprecher 2000, *Biochim. Biophys. Acta* 1486:219-231) en los mamíferos. En lugar de la Δ 4-desaturación, una etapa de alargamiento adicional se efectúa aquí para dar C24, seguida por una más Δ 6-desaturación adicional, y finalmente β -oxidación para dar la longitud de cadena C₂₂. Lo que se conoce como la ruta de síntesis Sprecher, sin embargo, no es adecuado para la producción en plantas y microorganismos ya que todavía no se conocen los mecanismos de regulación.

Dependiendo de su patrón de desaturación, los ácidos grasos poliinsaturados se pueden dividir en dos grandes clases, a saber, ácidos ω 6- o ω 3-grasos, que difieren con respecto a sus actividades metabólicas y funcionales. El material de partida para la ruta metabólica ω 6 es el ácido linoleico de ácido graso (18:2 ^{Δ 9,12}), mientras que las rutas ω 3 proceden a través de ácido linolénico (18:3 ^{Δ 9,12,15}). El ácido linolénico se forma por la actividad de una Δ 15-desaturasa (Tocher et al. 1998, *Prog. Lipid Res.* 37, 73-117; Domergue et al. 2002, *Eur. J. Biochem.* 269, 4105-4113).

Los mamíferos, y por tanto, los humanos, no tienen actividad desaturasa correspondiente (Δ 12- y Δ 15-desaturasa) y deben tomar esos ácidos grasos (ácidos grasos esenciales) a través de los alimentos. Partiendo con estos precursores, los ácidos grasos poliinsaturados fisiológicamente importante, ácido araquidónico (= ARA, 20:4 ^{Δ 5,8,11,14}), un ácido ω 6-graso, y los dos ácidos ω 3-grasos ácido eicosapentaenoico (= EPA, 20:5 ^{Δ 5,8,11,14,17}) y ácido

docosahexaenoico (DHA, 22:6^{Δ4,7,10,13,17,19}) se sintetizan a través de la secuencia de reacciones desaturasa y elongasa. La aplicación de ácidos ω3-grasos muestra la actividad terapéutica descrita anteriormente en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares (Shimikawa 2001, World Rev. Nutr. Diet. 88, 100-108), inflamaciones (Calder, 2002, Proc. Nutr. Soc. 61, 345-358) y artritis (Cleland and James 2000, J. Rheumatol. 27, 2305-2307).

- 5 Las plantas superiores comprenden ácidos grasos poliinsaturados como el ácido linoleico (C18: 2) y ácido linolénico (C18: 3). El ARA, EPA y DHA no se encuentran en absoluto en el aceite de semilla de las plantas superiores, o sólo en cantidades minúsculas (E. Ucciani: Nouveau Dictionnaire des Huiles Végetales [Nuevo Diccionario de Aceites Vegetales] Technique & Documentation - Lavoisier, 1995 ISBN: 2-7430-0009-0). Sin embargo, la producción de LCPUFA en las plantas superiores (preferiblemente en cultivos oleaginosos tales como colza, linaza, girasol y soja)
- 10 sería ventajosa ya que se podrían obtener económicamente grandes cantidades de LCPUFAs de alta calidad para la industria alimenticia y nutrición animal, y propósitos farmacéuticos. Una ruta potencial es a través de métodos recombinantes, donde los genes que codifican las enzimas de la biosíntesis de LCPUFAs se introducen y se expresan en cultivos de aceite. Estos genes codifican, por ejemplo, Δ6-desaturasas, Δ6-elongasas, Δ5-desaturasas o Δ4-desaturasas. Estos genes ventajosamente se pueden aislar a de microorganismos y plantas inferiores que producen LCPUFA y que las incorporan en las membranas o triacilglicéridos. Por lo tanto, ya ha sido posible aislar
- 15 los genes Δ6-desaturasa del musgo *Physcomitrella patens* y los genes Δ6-elongasa de *P. patens* y del nematodo *C. elegans*. (Zank, TK et al. Plant Journal 31:255-268, 2002, Beaudoin et al. Biochem Soc Trans 28:661 - 663, 2000).

- Las primeras plantas transgénicas que comprenden y expresan genes que codifican enzimas de la biosíntesis de LCPUFA y que producen LCPUFA se describen, por ejemplo, en el documento DE-A-102 19 203 (proceso para la producción de ácidos grasos poliinsaturados en plantas). Sin embargo, estas plantas producen LCPUFA en
- 20 cantidades que requieren optimización adicional para procesar aceites que están presentes en las plantas.

Para asegurar el enriquecimiento de los alimentos y de la comida para animales con estos ácidos grasos poliinsaturados, por lo tanto subsiste una gran necesidad de medios y medidas para un proceso simple, de bajos costes para la producción de estos ácidos grasos poliinsaturados, específicamente en los sistemas eucariotas.

- 25 El objeto en el que se basa la presente invención es el suministro de dichos medios y medidas. Este objeto se alcanza mediante las realizaciones que se describen en las reivindicaciones de patente y adelante.

La presente invención por lo tanto se relaciona con un polinucleótido que comprende una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que consiste de:

- (a) secuencia de ácidos nucleicos como se muestra en cualquiera de la SEQ ID No. 1,2, 8, 9, 15, 16, 50 o 51;
- 30 (b) secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido que caracteriza una secuencia de aminoácidos como se muestra en cualquiera de la SEQ ID No. 3, 10, 17 o 52;
- (c) secuencia de ácidos nucleicos que tiene por lo menos 70% de identidad con una de las secuencias de ácidos nucleicos de (a) o (b), y que codifica un polipéptido con una actividad de desaturasa; y
- (d) secuencia de ácidos nucleicos para un fragmento de un ácido nucleico de (a), (b) o (c), en donde el fragmento
- 35 codifica un polipéptido con una actividad de desaturasa.

- La clase de los ácidos ω6-grasos se basa en el ácido graso ω6-graso ácido linoleico (18:2^{Δ9,12}), mientras que la clase de los ácidos ω3-grasos se basa en el ácido (3-graso ácido linolénico (18:3(9,12,15); véase la Figura 1. Estos dos ácidos grasos son los sustratos para la síntesis de (6- y (3-PUFA de cadena larga, respectivamente. El aumento del contenido en estos ácidos grasos de acuerdo con los genes que se introducen llevan a un aumento del contenido en PUFA de cadena larga.
- 40

La presente invención proporciona secuencias de polinucleótidos que llevan a un aumento de los sustratos 18:2 (9,12 y 18:3(9,12,15, respectivamente. Se han identificado secuencias de polinucleótidos que codifican enzimas con actividad (12-desaturasa, con actividad (15-desaturasa, con actividad (15-desaturasa o con actividad (3-desaturasa.

- 45 De acuerdo con la invención, el término "polinucleótido" se refiere a polinucleótidos que comprenden secuencias de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos con actividad de desaturasa. Las actividades de desaturasa preferiblemente se requieren para la biosíntesis de lípidos o ácidos grasos. Especialmente preferiblemente, toman la forma de las siguientes actividades de desaturasa: Δ12-desaturasa, Δ15-desaturasa, Δ12- y Δ15-desaturasa u actividad omega-3-desaturasa. Las desaturasas preferiblemente están involucradas en la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) y especialmente preferiblemente en la síntesis de PUFA de cadena larga (LCPUFAs). Se describen sistemas de detección adecuados para estas actividades de desaturasa en los ejemplos o en el documento WO 2005/083053. Las actividades de desaturasa de acuerdo con la invención especialmente
- 50

preferiblemente tienen especificidades de sustrato y/o índices de conversión que son comparables con aquellos de las enzimas de desaturasa homóloga respectivas de *Pythium irregulare*, *Ostreococcus tauri*, *Phytophthora sojae* o *Phytophthora infestans*. Los polinucleótidos específicos de acuerdo con la invención, es decir los polinucleótidos con una secuencia de ácidos nucleicos como se muestra en la SEQ ID No.: 1, 2, 8, 9, 15, 16, 50 o 51 se han obtenido de *Cochliobolus heterostrophus* C5, *Cyanotheca* sp. CCY0110, *Polaromonas* sp. JS666, *Prochlorococcus marinus* str. MIT 9313, *Synechococcus* sp. PCC 7335, *Mycocentrospora acerina* o *Hyaloperonospora parasitica*.

En particular, las secuencias de ácidos nucleicos de acuerdo con la SEQ ID No. 1 y 2 se originan de *Cochliobolus heterostrophus* C5, las secuencias de ácidos nucleicos de acuerdo con la SEQ ID No. 8 y 9 de *Cyanotheca* sp. CCY0110, las secuencias de ácidos nucleicos de acuerdo con la SEQ ID No. 15 y 16 de *Mycocentrospora acerina* y las secuencias de ácidos nucleicos de acuerdo con la SEQ ID No. 50 y 51 de *Hyaloperonospora parasitica*. Las SEQ ID No. 1, 8 y 50 son secuencias genómicas, la SEQ ID No. 15 es un transcrito de mRNA, mientras que la SEQ ID No. 2, 9, 16 y 51 son secuencias de codificación (cfs). Las SEQ ID No. 3, 10, 17 y 52 muestran las secuencias de aminoácidos correspondientes.

Por lo tanto, se prefieren especialmente los polinucleótidos de acuerdo con la invención:

polinucleótidos que codifican un polipéptido con actividad de $\Delta 15$ -desaturasa y que comprenden (i) una secuencia de ácidos nucleicos como se muestra en la SEQ ID No. 1 o 2, (ii) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido como se muestra en la SEQ ID No. 3, (iii) una secuencia de ácidos nucleicos que tiene por lo menos 70% de identidad con una de las secuencias de ácidos nucleicos de (i) o (ii), o (iv) una secuencia de ácidos nucleicos para un fragmento de un ácido nucleico de (i), (ii) o (iii), donde el fragmento codifica un polipéptido con una actividad de $\Delta 15$ -desaturasa.

Los polinucleótidos que codifican un polipéptido con actividad de $\Delta 15$ -desaturasa y que comprenden (i) una secuencia de ácidos nucleicos como se muestra en la SEQ ID No. 8 o 9, (ii) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido como se muestra en la SEQ ID No. 10, (iii) una secuencia de ácidos nucleicos que tiene por lo menos 70% de identidad con una de las secuencias de ácidos nucleicos de (i) o (ii), o (iv) una secuencia de ácidos nucleicos para un fragmento de un ácido nucleico de (i), (ii) o (iii), donde el fragmento codifica un polipéptido con una actividad de $\Delta 15$ -desaturasa.

Los polinucleótidos que codifican un polipéptido con actividad de $\Delta 12$ -desaturasa y que comprenden (i) una secuencia de ácidos nucleicos como se muestra en la SEQ ID No. 15 o 16, (ii) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido como se muestra en la SEQ ID No. 17, (iii) una secuencia de ácidos nucleicos que tiene por lo menos 70% de identidad con una de las secuencias de ácidos nucleicos de (i) o (ii), o (iv) una secuencia de ácidos nucleicos para un fragmento de un ácido nucleico de (i), (ii) o (iii), donde el fragmento codifica un polipéptido con una actividad de $\Delta 12$ -desaturasa.

Los polinucleótidos que codifican un polipéptido con actividad de $\omega 3$ -desaturasa y que comprenden (i) una secuencia de ácidos nucleicos como se muestra en la SEQ ID No. 50 o 51, (ii) una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido como se muestra en la SEQ ID No. 52, (iii) una secuencia de ácidos nucleicos que tiene por lo menos 70% de identidad con una de las secuencias de ácidos nucleicos de (i) o (ii), o (iv) una secuencia de ácidos nucleicos para un fragmento de un ácido nucleico de (i), (ii) o (iii), donde el fragmento codifica un polipéptido con una actividad de $\omega 3$ -desaturasa.

El término "delta-12-desaturasa (o $\Delta 12$ -desaturasa o d-12-desaturasa o d12-Des o d12Des)" o "actividad delta-12-desaturasa (o $\Delta 12$ -desaturasa o d-12-desaturasa o d12-Des o d12Des)" como se utiliza en el presente contexto se refiere a una enzima con la función enzimática para deshidrogenar ácidos grasos C_{18} que ya se deshidrogenan en el átomo de C 9-10. Aquí, los átomos de C C12 y C13 se deshidrogenan en cada caso en un átomo de hidrógeno, dando lugar a un enlace doble entre estos dos átomos de C.

El término "delta-15-desaturasa (o $\Delta 15$ -desaturasa o d-15-desaturasa o d15-Des o d15Des)" o "actividad de delta-15-desaturasa (o $\Delta 15$ -desaturasa o d-15-desaturasa o d15-Des o d15Des)" como se utiliza en el presente contexto se refiere a una enzima con la función enzimática para deshidrogenar ácidos grasos C_{18} y/o C_{20} que se deshidrogenan en los átomos de C 6-7, 8-9, 9-10, 12-13 y/o 13-14. Aquí, los átomos de C C15-16 y/o C17-18 se deshidrogenan en cada caso en un átomo de hidrógeno, dando lugar a un enlace doble entre los dos átomos de C.

El término "delta-12- y delta-15-desaturasa (o $\Delta 12$ - y $\Delta 15$ -desaturasa o como se escribió anteriormente)" o "actividad delta-12- y delta-15-desaturasa (o $\Delta 12$ - y $\Delta 15$ -desaturasa o como se escribió anteriormente)" como se utiliza en el presente contexto se refiere a una enzima con la función enzimática para deshidrogenar ácidos grasos C_{18} y/o C_{20} que se deshidrogenan en los átomos de C 6-7, 8-9, 9-10 y/o 13-14. Aquí, los átomos de C C12-13 y C15-16 y/o C17-18 se deshidrogenan en cada caso en un átomo de hidrógeno, dando lugar a un enlace doble entre los dos átomos de C.

El término “omega-3-desaturasa (o (3-desaturasa o (3-Des o (3Des o omega3 Des o o3Des) “ o “actividad de omega- 3-desaturasa (o (3-desaturasa o (3-Des o (3Des o omega3 Des o o3Des)” como se utiliza en el presente contexto se refiere a una enzima con la función enzimática para la deshidrogenación de ácidos grasos C₁₈-, C₂₀- y/o C₂₂ que se deshidrogenan en los átomos de C 4-5, 5-6, 6-7, 8-9, 9-10, 13-14 y/o 16-17. Aquí, los átomos de C C15-16 y/o C17-18 y/o C19-20 se deshidrogenan por en cada caso un átomo de hidrógeno, dando lugar a un enlace doble entre los dos átomos de C.

Las desaturasas de acuerdo con la invención especialmente preferiblemente caracterizan, en sucesión, el motivo de desaturasa 1 “GX10HX3HX13GX9PX3WX3H” (SEQ ID No. 46), el motivo de desaturasa 2 “PX14(H/Q)H “ (SEQ ID No. 47) y either el motivo de desaturasa 3 “HX2HHX5PXY” (SEQ ID No. 48) o el motivo de desaturasa 4 “HX2HHX6PXY” (SEQ ID No. 49), donde X es sinónimo de cualquier aminoácido. Ya sea que una Δ12-, Δ15- o omega3-desaturasa se pueda deducir del aminoácido en la posición variable 16 del motivo de desaturasa 2 (H o Q): Q = glutamina es indicadora de Δ12-desaturasas putativas, H = histidina es indicadora de Δ15- o omega3-desaturasas.

En este contexto, las secuencias de polinucleótidos o las secuencias de péptido de acuerdo con la invención preferiblemente se originan de los organismos mencionados anteriormente.

Es evidente que, a la luz de la degeneración del código genético, también se pueden modificar las secuencias específicas mencionadas anteriormente, donde los polinucleótidos modificados aún codifican polipéptidos con una secuencia de aminoácidos como se muestra en cualquiera de las SEQ ID No. 3, 10, 17 o 52 y que tienen las actividades de desaturasa mencionadas anteriormente.

El término “polinucleótido” también comprende variantes de los polinucleótidos específicos mencionados anteriormente. Estos pueden tomar la forma de secuencias homólogas, ortólogas o parálogas. Dichas variantes comprenden secuencias de ácido nucleico que cuentan con por lo menos una sustitución de bases, una adición de base o una supresión de base, se pretende que las variantes aún codifiquen un polipéptido con la actividad biológica anteriormente mencionada de la secuencia de partida respectiva. Las variantes comprenden polinucleótidos que son capaces de hibridación con los polinucleótidos anteriormente mencionados, preferiblemente en condiciones rigurosas. Las condiciones rigurosas especialmente preferidas se conocen por el experto en la técnica y se pueden encontrar en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. Un ejemplo preferido de condiciones de hibridación rigurosas son hibridaciones en 6 x cloruro de sodio/citrato de sodio (= SSC) en aproximadamente 45° C, preferiblemente 50° C, 55° C, 60° C y más preferiblemente a 62° C, seguido por una o más etapas de lavado en 0.1 x SSC, 0.1% de SDS a 50 a 65° C, preferiblemente 55 a 65° C incluso más preferiblemente a 60 a 65° C. El experto sabe que estas condiciones de hibridación difieren en función del tipo de ácido nucleico y, por ejemplo cuando están presentes los solventes orgánicos, con respecto a la temperatura y la concentración de regulador. Bajo “condiciones de hibridación estándar”, la temperatura difiere como una función del tipo de ácido nucleico entre 42° C y 58° C en regulador acuoso con una concentración de 0.1 a 5 x SSC (pH 7.2). Si está presente el solvente orgánico en el regulador mencionado anteriormente, por ejemplo 50% de formamida, la temperatura bajo condiciones estándar es aproximadamente 42° C. Las condiciones de hibridación para híbridos de ADN:ADN so preferiblemente por ejemplo 0.1 x SSC y 20° C a 45° C, preferiblemente entre 30° C y 45° C. Las condiciones de hibridación para híbridos de ADN:ARN son preferiblemente por ejemplo 0.1 x SSC y 30° C a 55° C, preferiblemente entre 45° C y 55° C. Las temperatura de hibridación mencionada anteriormente se determinan por ejemplo para un ácido nucleico de aproximadamente 100 bp (= pares base) en longitud y un contenido G + C de 50% en la ausencia de formamida. El experto sabe cómo determinar las condiciones de hibridación requeridas con la ayuda de libros de texto, tales como el mencionado aquí anteriormente, o de los siguientes libros de texto: Sambrook et al., “Molecular Cloning”, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989; 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. Como una alternativa, también se pueden proporcionar las variantes de los polinucleótidos específicos de acuerdo con la invención mediante métodos con base en reacción de cadena de polimerasa (PCR). Para este fin, es posible primero derivar los cebadores a partir de secuencias conservadas (por ejemplo secuencias que codifican los dominios funcionales en el polipéptido). Se pueden determinar secuencias conservadas mediante comparaciones de secuencia con polinucleótidos que codifican polipéptidos con una actividad similar. La plantilla utilizada puede ser ADN o cADN de bacterias, hongos, plantas o animales. Los fragmentos de ADN obtenidos mediante PCR se pueden utilizar para detectar colecciones genómicas o colecciones de cADN con el fin de - si se requiere - aislar el marco de lectura abierta completo del polinucleótido y determinarlo mediante secuenciación. Las variantes preferidas comprenden polinucleótidos que comprenden una secuencia de ácidos nucleicos con por lo menos 50%, por lo menos 55%, por lo menos 60%, por lo menos 65%, por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 81%, por lo menos 82%, por lo menos 83%, por lo menos 84%, por lo menos 85%, por lo menos 86%, por lo menos 87%, por lo menos 88%, por lo menos 89%, por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% de identidad (o un porcentaje diferente a los mencionados aquí) con una de las secuencias de ácidos nucleicos específicas anteriormente mencionadas y se codifica un polipéptido con la actividad biológica respectiva. Igual y preferiblemente comprenden polinucleótidos que comprenden secuencias de ácidos nucleicos que codifican

un polipéptido con una secuencia de aminoácidos con por lo menos 50%, por lo menos 55%, por lo menos 60%, por lo menos 65%, por lo menos 70%, por lo menos 75%, por lo menos 80%, por lo menos 81%, por lo menos 82%, por lo menos 83%, por lo menos 84%, por lo menos 85%, por lo menos 86%, por lo menos 87%, por lo menos 88%, por lo menos 89%, por lo menos 90%, por lo menos 91%, por lo menos 92%, por lo menos 93%, por lo menos 94%, por lo menos 95%, por lo menos 96%, por lo menos 97%, por lo menos 98% o por lo menos 99% de identidad (o un porcentaje diferente a aquel mencionado aquí) con una de las secuencias de aminoácidos específicas mencionadas anteriormente y donde el polipéptido tiene la actividad biológica respectiva de la secuencia de partida.

El porcentaje de nucleótidos o aminoácidos idénticos preferiblemente se relaciona con un segmento de secuencia de por lo menos 50% de las secuencias que se van a comparar, y especialmente preferiblemente sobre la longitud competa de las secuencias que se van a comparar. Se describe una multiplicidad de programas que implementan algoritmos para dichas comparaciones en la técnica anterior y comercialmente disponible. En particular, se puede hacer referencia a los algoritmos de Needleman y Wunsch o Smith y Waterman, que proporcionan resultados particularmente confiables. Estos algoritmos preferiblemente se pueden implementar mediante los siguientes programas: PileUp (J. Mol. Evolution., 25, 351-360, 1987, Higgins 1989, CABIOS, 5: 151-153), Gap y BestFit (Needleman y Wunsch (J. Mol. Biol. 48; 443-453 (1970) y Smith y Waterman (Adv. Appl. Math. 2; 482-489(1981))), as part of the GCG software (Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711, 1991). Para los propósitos de la presente invención, se prefiere especialmente determinar el porcentaje (%) de la identidad de secuencia con el programa GAP sobre la secuencia completa, con los siguientes parámetros establecidos: peso de Gap: 50, Peso de Longitud: 3, Emparejamiento Promedio: 10.000 y Emparejamiento Incorrecto promedio: 0.000.

Un polinucleótido que solo comprende un fragmento de las secuencias de ácidos nucleicos mencionadas anteriormente también es un polinucleótido de acuerdo con la invención. Aquí, se entiende que el fragmento codifica un polipéptido que caracteriza la actividad biológica de la secuencia de partida, o del polipéptido que codifica el último. Por lo tanto los polipéptidos que se codifican por dichos polinucleótidos comprenden, o consisten de, dominios de los polipéptidos específicos mencionados anteriormente (partiendo de polipéptidos) que confieren la actividad biológica. Un fragmento para los propósitos de la invención preferiblemente comprende por lo menos 50, por lo menos 100, por lo menos 250 o por lo menos 500 nucleótidos consecutivos de las secuencias específicas mencionadas anteriormente o codifica una secuencia de aminoácidos que comprende por lo menos 20, por lo menos 30, por lo menos 50, por lo menos 80, por lo menos 100 o por lo menos 150 aminoácidos consecutivos de una de las secuencias de aminoácidos específicas mencionadas anteriormente, y confiere actividad biológica, preferiblemente actividad de desaturasa, como se describió anteriormente.

Las variantes de polinucleótido de acuerdo con la invención preferiblemente caracterizan por lo menos 10%, por lo menos 20%, por lo menos 30%, por lo menos 40%, por lo menos 50%, por lo menos 60%, por lo menos 70%, por lo menos 80% o por lo menos 90% de la actividad biológica respectiva del polipéptido que se codifica por la secuencia de partida. Es decir los polipéptidos que se codifican por los polinucleótidos de acuerdo con la invención pueden participar en el metabolismo de compuestos requeridos para la síntesis de ácidos grasos, ésteres de ácido graso tales como diacilglicéridos y/o triacilglicéridos en un organismo, preferiblemente en una planta o célula de planta, o puede participar en el transporte de moléculas a través de membranas, que significa cadenas de carbono C₁₈-, C₂₀- o C₂₂-en la molécula de ácido graso con enlaces dobles en por lo menos dos, ventajosamente tres, cuatro, cinco o seis posiciones.

Los polinucleótidos de acuerdo con la invención comprenden cualquiera de las secuencias de ácidos nucleicos específicas mencionadas anteriormente o consisten de las mismas. Es decir, que los polinucleótidos de acuerdo con la invención, en principio, también comprenden nucleótidos adicionales. Preferiblemente estos puede ser regiones 3' y 5' no traducidas de la secuencia genómica de ácidos nucleicos. Preferiblemente consisten de por lo menos 100, 200 o 500 nucleótidos en el terminal 5' y de por lo menos 20, 50 o 100 nucleótidos en el terminal 3' de la región de codificación. Los polinucleótidos adicionales que comprenden secuencias de ácidos nucleicos adicionales son aquellos que codifican proteínas de fusión. Dichas proteínas de fusión codifican polipéptidos adicionales o porciones de polipéptido, además de los polipéptidos mencionados anteriormente. El polipéptido adicional o porción de polipéptido puede tomar la forma de enzimas adicionales de biosíntesis de lípido o ácido graso. Otros que son factibles son los polipéptidos que pueden actuar como marcadores de expresión (proteínas verdes, amarillas, rojas, azules fluorescentes, fosfatasa alcalina y otros) o denominadas "etiquetas" como marcadores o como una ayuda para purificación (por ejemplo etiquetas FLAG, etiquetas 6-histidina, etiquetas MYC y otros).

Se pueden aislar variantes de polinucleótido a partir de diferentes fuentes naturales o artificiales. Por ejemplo, se pueden generar artificialmente mediante mutagenia in-vitro o in-vivo. Se pueden obtener homólogos u ortólogos de las secuencias específicas de una amplia variedad de animales, plantas y microorganismos. Se obtienen preferiblemente a partir de algas. Las algas tales como Isochrysis, Euglena o Cryptocodinium, algas/diatomeas tales como Thalassiosira, Phaeodactylum o Thraustochytrium, Pythium, musgos tales como Physcomitrella, preferiblemente Physcomitrella patens o Ceratodon, se prefieren muy especialmente las algas del género Euglena o las diatomeas de la clase Oomycota tales como los géneros Pythium o Phytophthora u hongos tales como Postia placenta o Microdochium nivale, o desde la división Zygomycota de los géneros Rhizopus, Aspergillus, Thraustochytrium, Phytophthora, Entomophthora, Mucor o Mortierella. También se pueden obtener polinucleótidos a

partir de plantas, preferiblemente de la familia Selaginellaceae, tales como *Selaginella Moellendorffii*, o de plantas superiores, tales como Primulaceae tales como *Aleuritia*, *Calendula stellata*, *Osteospermum spinescens* o *Osteospermum hyoseroides*, bacterias tales como *Shewanella*, cianobacterias tales como *Synechococcus*, levaduras o animales tales como nematodos, por ejemplo, *Caenorhabditis molluses*, insectos o peces. Las variantes de polinucleótidos también se derivan preferiblemente de un animal del orden de los vertebrados. Especialmente preferiblemente, se derivan polinucleótidos de la clase Vertebrata; Euteleostomi, Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Euteleostei, Protacanthopterygii, Salmoniformes; Salmonidae o Oncorhynchus y, muy especialmente preferiblemente, a partir del orde Salmoniformes orden tales como la familia de Salmonidae, tal como el género *Salmo*, por ejemplo de los géneros y especies *Oncorhynchus mykiss*, *Trutta trutta* y *Salmo trutta fario*. Aquí, los polinucleótidos de acuerdo con la invención se pueden aislar por medio de técnicas estándar de biología molecular y de la información de secuencia proporcionada aquí. También, es posible, con la ayuda de algoritmos comparativos, para identificar, por ejemplo, una secuencia homóloga u homólogos, regiones de secuencias conservadas en el ADN o el nivel de aminoácidos. Estos se pueden emplear como técnicas de sonda de hibridación e hibridación estándar (tal como, por ejemplo, los descritos en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) para aislar nuevas secuencias de ácidos nucleicos que son útiles en el proceso. Más aún, es posible aislar polinucleótidos o fragmentos de los mismos por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), donde se emplean los cebadores de oligonucleótidos que se basan en 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 reacción en cadena de polimerasa utilizando cebadores de oligonucleótidos que se han generado sobre la base de esta misma secuencia). Por ejemplo, es posible aislar MARN a partir de células (por ejemplo por el método de tiocianato de guanidinio extractor por Chirgwin et al. (1979) *Biochemistry* 18:5294-5299), y el cADN se pueden generar por medio de la transcriptasa inversa (por ejemplo, transcriptasa inversa Moloney MLV, obtenible de Gibco/BRL, Bethesda, MD, o transcriptasa inversa AMV, obtenible de Seikagaku America, Inc., San Petersburgo, FL). Los cebadores de oligonucleótidos sintéticos para la amplificación por medio de la reacción en cadena de polimerasa se pueden generar sobre la base de las secuencias de polinucleótidos y aminoácidos que se muestran en los números de SEQ ID (SEQ ID NR:). Se puede amplificar un ácido nucleico de acuerdo con la invención utilizando ADN genómico o cADN, de forma alternativa, como la plantilla y cebadores de oligonucleótidos adecuados, siguiendo las técnicas estándar de amplificación por PCR. El ácido nucleico amplificado por lo tanto se puede clonar en un vector adecuado y caracterizado por medio de análisis de secuencia de ADN. Se pueden generar oligonucleótidos que corresponden a una secuencia de nucleótidos desaturada mediante métodos estándar de síntesis, por ejemplo, utilizando un sintetizador de ADN automático.

Se pueden proporcionar polinucleótidos de acuerdo con la invención en la forma de polinucleótidos aislados (es decir aislados de su origen natural, por ejemplo los sitios genómico) o también en la forma modificada genéticamente (es decir los polinucleótidos también pueden estar presentes en su sitio genético natural, pero, en dicho un caso, se deben modificar genéticamente). Un polinucleótido aislado preferiblemente comprende menor de 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0.5 kb o 0.1 kb de secuencia de ácidos nucleicos que ocurre naturalmente en su ambiente. El polinucleótido de acuerdo con la invención puede estar presente como una molécula de ácido nucleico de cadena sencilla o de doble cadena o y puede y tomar la forma de ADN, cADN o ARN. Preferiblemente, el polinucleótido de acuerdo con la invención consiste de ARN o ADN. Los polinucleótidos de acuerdo con la invención comprenden todas las orientaciones de las secuencias muestran en la números SEQ ID, es decir también cepas complementarias y orientaciones inversas o complementarias inversas. El término adicionalmente también comprende ácidos nucleicos químicamente modificado, tales como las moléculas de ADN metiladas de ocurrencia natural o ácidos nucleicos artificiales, por ejemplo ácidos nucleicos biotinilados.

La invención también comprende oligonucleótidos de por lo menos 15 bp, preferiblemente por lo menos 20 bp, por lo menos 25 bp, por lo menos 30 bp, por lo menos 35 bp o por lo menos 50 bp, que son capaces de hibridar específicamente bajo condiciones rigurosas con uno los polinucleótidos anteriormente mencionados. Los oligonucleótidos pueden consistir de ADN o ARN o ambos. Se pueden emplear dichos oligonucleótidos como cebadores para el PCR, como oligonucleótidos antisentido inhibidor de expresión, para métodos de interferencia ARN (ARNi) o para métodos quimeroplásticos o genoplásticos. Los métodos ARNi se describen por ejemplo en Fire et al., *Nature* (1998) 391:806-811; Fire, *Trends Genet.* 15, 358-363 (1999); Sharp, *RNA interference* 2001. *Genes Dev.* 15,485-490 (2001); Hammond et al. *Nature Rev. Genet.* 2, 1110-1119 (2001); Tuschl, *Chem. Biochem.* 2, 239-245 (2001); Hamilton et al., *Science* 286, 950-952 (1999); Hammond et al., *Nature* 404, 293-296 (2000); Zamore et al., *Cell* 101,25-33 (2000); Bernstein et al., *Nature* 409, 363-366 (2001); Elbashir et al., *Genes Dev.* 15, 188-200 (2001); WO 01/29058; WO 99/32619; o Elbashir et al., 2001 *Nature* 411: 494-498 y sirven para inhibir la expresión de gen al degradar el mARN. Los métodos quimeroplásticos o genolástico sirven la modificación in-vivo (por ejemplo la introducción de mutaciones de punto) en genes en sus sitios endógenas. Se describen los métodos correspondientes en los documentos US5,565,350, US5,756,325, US5,871,984, US5,731,181, US5,795,972, US6,573,046, US6,211,351, US6,586,184, US6,271,360 y US6,479,292.

Ventajosamente, se ha comprobado que los polinucleótidos de acuerdo con la invención se pueden emplear particularmente eficientemente para la producción recombinante de ácidos grasos poliinsaturados en células anfitrionas y en organismos transgénicos. En particular, los polipéptidos que se codifican por los polinucleótidos de

acuerdo con la invención y que tienen actividad de $\Delta 12$ - desaturasa, $\Delta 15$ -desaturasa, $\Delta 12$ - y $\Delta 15$ -desaturasa o omega-3-desaturasa son capaces de convertir ácidos grasos C_{18} -, C_{20} - y C_{22} con una, dos, tres, cuatro o cinco enlaces dobles y preferiblemente ácidos grasos poliinsaturados C_{18} con uno, dos o tres enlaces dobles tales como ácidos grasos $C_{18}:1(9)$, $C_{18}:2(9,12)$ o $C_{18}:3(6,9,12)$, poliinsaturados C_{20} con tres o cuatro enlaces dobles tales como ácidos grasos $C_{20}:3(8,11,14)$, $C_{20}:4(5,8,11,14)$ o $C_{20}:4(8,11,14,17)$ o poliinsaturados C_{22} con cuatro o cinco enlaces dobles tales como $C_{22}:4(7,10,13,16)$ o $C_{22}:5(7,10,13,16,19)$. Especialmente preferiblemente, el polinucleótido y secuencias de aminoácidos de acuerdo con la invención llevan a un aumento en los ácidos $18:2(9,12)$ - o $18:3(9,12,15)$ - grasos. La Figura 1 muestra donde estas desaturasas de acuerdo con la invención enganchan en la biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados cadena larga y/o cómo se pueden utilizar para producir estos ácidos grasos.

En este contexto, especialmente se prefiere para emplear la $\Delta 6$ -desaturasa codificada por la secuencia de polinucleótido con la SEQ ID No. 22 (d6Des(Pir)), la $\Delta 6$ -elongasa codificada por la secuencia de polinucleótido con la SEQ ID No. 31 (d6Elo (Pp)), la $\Delta 5$ -desaturasa, codificada mediante la secuencia de polinucleótido con la SEQ ID No. 25 (d5Des(Tc)), la $\Delta 15$ -elongasa codificada por la secuencia de polinucleótido con la SEQ ID No. 34 (d5Des(Ot)), la $\Delta 14$ -desaturasa codificada mediante la secuencia de polinucleótido con la SEQ ID No. 37 (d4Des(Tc)), la $\Delta 6$ -elongasa codificada mediante la secuencia de polinucleótido con la SEQ ID No. 40 (d6Elo(Tp)); la $\Delta 6$ -desaturasa mediante las secuencias de polinucleótidos con la SEQ ID No. 41 (d6Des (Tc)) con una o más de las desaturasas de acuerdo con la invención con el fin de sintetizar ácidos grasos poliinsaturados cadena larga; véase en este contexto W02006/100241. Alternativamente, también es posible emplear una $\Delta 9$ -elongasa y una $\Delta 8$ - desaturasa en lugar de la $\Delta 6$ -desaturasa y la $\Delta 6$ -elongasa anteriormente mencionadas como se describe en el documento W02004/057001. Dependiendo del ácido graso que se va a preparar, es posible coexpresar, en las células anfitrionas u organismos transgénicos descritos aquí adelante, o para utilizar en los métodos de acuerdo con la invención, una variedad de combinaciones de los polinucleótidos de acuerdo con la invención con las desaturasas o elongasas anteriormente mencionadas. Especialmente combinaciones preferidas para la producción de ácido eicosapentaenoico se muestran en las tablas 5 y 8 y para ácido docosahexaenoico en la tabla 6 aquí adelante. Por ejemplo, es posible utilizar una $\Delta 12$ -desaturasa, $\Delta 15$ -desaturasa, $\Delta 12$ - y $\Delta 15$ -desaturasa, o omega-3-desaturasa de acuerdo con la invención, solo o en una combinación adecuada (por ejemplo una $\Delta 12$ -desaturasa y una $\Delta 15$ -desaturasa), junto con d6Des(Pir) y/o d6Des(Ot), d6Elo(Pp), d5Des(Tc) y $\omega 3$ Des(Pi) para la producción de EPA. Igualmente, una $\Delta 12$ -desaturasa, $\Delta 15$ -desaturasa, $\Delta 12$ - y $\Delta 15$ -desaturasa, o omega-3-desaturasa de acuerdo con la invención, solo o en una combinación adecuada, se puede utilizar junto con d6Des(Pir) y/o d6Des(Ot), d6Elo(Pp), d5Des(Tc), $\omega 3$ Des(Pi), d5Elo(Ot), d4Des(Tc) para la producción de ácido docosahexaenoico.

Preferiblemente, los ácidos grasos en fosfolípidos o ésteres de ácido graso CoA que se desaturan, ventajosamente en los ésteres de ácido graso CoA. Por lo tanto, es posible una producción no costosa, simple de estos ácidos grasos poliinsaturados, específicamente en los sistemas eucariotas sistemas eucarióticos. Los ácidos grasos insaturados producidos por medio de los polinucleótidos de acuerdo con la invención entonces se pueden formular como composiciones de aceite, lípido y ácido graso y en una manera adecuada.

La presente invención adicionalmente se relaciona con un vector que comprende el polinucleótido de acuerdo con la invención.

El término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico que es capaz de transportar otra molécula de ácido nucleico, tal como los polinucleótidos de acuerdo con la invención, a la cual se une. Un tipo de vector es un plásmido, un bucle de ADN de doble cadena circular en el que se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Un tipo adicional del vector es un vector vírico, es posible para se ligan segmentos de ADN adicionales en el genoma vírico. Algunos vectores son capaces de replicación autónoma en la célula anfitriona en la que se han introducido (por ejemplo vectores bacterianos con origen de replicación bacteriano). Se integran otros vectores ventajosamente en el genoma de una célula anfitriona cuando se introducen en la célula anfitriona, y de esta manera se replican juntos con el genoma anfitrión. Más aún, determinados vectores pueden regir la expresión de genes con la cual están en ligador operable. Estos vectores se denominan en el presente contexto como vectores de expresión. Usualmente, los vectores de expresión que son adecuados para técnicas de recombinación de ADN toman la forma de plásmidos. En la presente descripción, "plásmido" y "vector" se pueden utilizar de forma intercambiable ya que el plásmido es la forma de vector que se utiliza más frecuentemente. Sin embargo, la invención también está destinada a comprender otras formas de vectores de expresión, tales como vectores víricos, que ejercen funciones similares. Adicionalmente, el término "vector" también se destina a comprender otros vectores con los que el experto está familiarizado, tales como fagos, virus tales como SV40, CMV, TMV, transposones, elementos IS, fasmidos, fagémidos, cósmidos, ADN lineal o circular, cromosomas artificiales. Finalmente, el término también comprende construcciones para el objetivo, es decir, homóloga, recombinación, o la inserción heteróloga de polinucleótidos.

Se pueden introducir los vectores en células procariotas y eucariotas a través de la transformación convencional o técnicas de transfección. Los términos "transformación" y "transfección", conjugación y transducción, como se utiliza en el presente contexto, están destinados a comprender una multiplicidad de métodos conocidos en la técnica anterior para la introducción de ácido nucleico externo (por ejemplo ADN) en una célula anfitriona, que incluye coprecipitación con fosfato de calcio o cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección,

competencia natural, transferencia mediada químicamente, electroporación o bombardeo de partículas. Los métodos adecuados para la transformación o transfección de células anfitrionas, que incluyen células vegetales, se pueden encontrar en Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) y otros libros de texto de laboratorio tales como

5 Methods in Molecular Biology, 1995, vol. 44, Agrobacterium protocols, Ed.: Gartland and Davey, Humana Press, Totowa, New Jersey.

Los vectores de clonación adecuados en general son conocidos por el experto. En particular, se incluyen vectores que se pueden replicar en sistemas microbianos, que es principalmente vectores que aseguran la clonación eficiente en levaduras u hongos y que hacen posible la transformación estable de plantas. Aquellos que se deben mencionar son, en particular, diversos sistemas de vectores binarios y cointegrados que son adecuados para la transformación mediada por T-ADN. Dichos sistemas de vectores son, por regla general, caracterizadas porque comprenden por lo menos genes vir, que son necesarios para la transformación mediada por Agrobacterium, y las secuencias de límite de T-ADN (límite de T-ADN). Preferiblemente, estos sistemas de vectores también comprenden regiones cis-reguladoras, tales como promotoras y terminadores y/o marcadoras de selección, por medio de las cuales se pueden identificar organismos adecuadamente transformados. Mientras que en el caso de sistemas de vectores cointegrados de genes vir y secuencias de T-ADNT se disponen en el mismo vector, los sistemas binarios se basan en por lo menos dos vectores, uno de los cuales lleva los genes vir, pero no de ADN-T, y la otra osos T-ADN, pero ningún gen vir. Como resultado, los últimos vectores mencionados son relativamente pequeños, fáciles de manipular y de replicar tanto en E. coli y en Agrobacterium. Estos vectores incluyen vectores binarios de la serie pB1HYG, la serie pPZP, la serie pBecks y la serie pGreen. Preferiblemente de acuerdo con la invención se utilizan Bin19, pBI101, pBinAR, pGPTV y pCambia. Una visión general de los vectores binarios y su uso se encuentra en Hellens et al, Trends in Plant Science (2000) 5, 446-451. Los vectores con los polinucleótidos insertados de acuerdo con la invención se pueden propagar de forma estable bajo condiciones selectivas en microorganismos, en particular Escherichia coli y Agrobacterium tumefaciens, y hacen posible una transferencia de ADN heterólogo en plantas o microorganismos. Los polinucleótidos de acuerdo con la invención se pueden introducir en organismos tales como microorganismos o plantas por medio de vectores de clonación y, por lo tanto se utilizan para transformar plantas. Los vectores que son adecuados para este propósito se publican 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: Transgenic Plants, vol. 1, Engineering and Utilización, eds.: Kung and R. Wu, Academic Press, 1993, 15-38; B. Jené et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, vol. 1, Engineering and Utilización, eds.: Kung and R. Wu, Academic Press (1993), 128-143; Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225.

El vector es preferiblemente un vector de expresión. El polinucleótido está presente en el vector de expresión de acuerdo con la invención en enlace operativo (es decir, funcionales) con una secuencia de control de expresión. La secuencia de control de expresión junto con el polinucleótido y opcionalmente elementos de secuencia adicionales del vector también se refiere como el casete de expresión. La secuencia de control de expresión asegura que, después de la transformación o transfección en una célula anfitriona, se puede expresar el polinucleótido. La secuencia de control de expresión que se va a utilizar preferiblemente comprende elementos cis-reguladores tales como promotor y/o potenciador de secuencias de ácidos nucleicos, que son reconocidos por la maquinaria de transcripción de las células anfitrionas. El término adicionalmente comprende otros elementos de control de expresión, por ejemplo, señales de poliadenilación y secuencias de estabilización de ARN. Se describen estas secuencias reguladoras, por ejemplo, en Goeddel: Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990) o véase: Gruber y Crosby, en: Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, CRC Press, Boca Raton, Florida, eds.: Glick and Thompson, Métodos en Biología Molecular de Plantas y Biotecnología, CRC Press, Boca Raton, Florida, eds.: Glick and Thompson, en el capítulo 7, 89 a 108, que incluye la bibliografía citada aquí. Las secuencias de control de expresión comprenden aquellas que rigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de células anfitrionas, y las que rigen la expresión directa de la secuencia de nucleótidos sólo en ciertas células anfitrionas bajo determinadas condiciones. El experto sabe que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula anfitriona que se va a transformar, la extensión de la expresión de la proteína deseada, y similares. Los polinucleótidos de acuerdo con la invención pueden estar presentes en una o más copias en el casete de expresión o en el vector de expresión de acuerdo con la invención (por ejemplo, en la forma de diversos casetes de expresión). Aquí, las secuencias reguladoras o factores pueden tener preferiblemente un efecto positivo sobre la expresión génica de los genes introducidos, como se describió anteriormente, y por lo tanto incrementarla. Por lo tanto, es posible mejorar los elementos reguladores ventajosamente en el nivel de transcripción mediante el uso de señales de transcripción fuertes, tales como promotores y/o "mejoradores". Además, también es posible mejorar la traducción, por ejemplo al mejorar la estabilidad del mRNA. Las secuencias de control de expresión adicionales dentro del significado de la presente invención son terminadores de traducción en el extremo 3' de los polinucleótidos a traducir. Un ejemplo que se puede utilizar aquí es el terminador OCS1. Como en el caso de los promotores, se debe utilizar una secuencia de terminador diferente para cada polinucleótido que se va a expresar.

Las secuencias de control de expresión preferidos o secuencias reguladoras están presentes en los promotores tales como los promotores cos, tac, trp, tet, trp-tet, lpp, lac, lpp-lac, lacIq, T7, T5, T3, gal, trc, ara, SP6, λ λ-PR o λ-PL

y se emplean ventajosamente en bacterias Gram-negativas. Otras secuencias reguladoras ventajosas están, por ejemplo, presente en 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 plantas CaMV/35S [Franck et al., Cell, 21 (1980) 285-294], PRP1 [Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993)], SSU, OCS, lib4, usp, STLS1, B33, nos o en el promotor de ubiquitina o faseolina. También son ventajosos en este contexto los promotores inducibles, tales como los promotores descritos en el documento EP-A- 0 388 186 (inducible por bencenosulfonamida), Plant J. 2, 1992:397-404 (Gatz et al., inducible por tetraciclina), EP-A- 0 335 528 (inducible por ácido abscísico) o el documento WO 93/21334 (inducible por etanol o ciclohexenol). Los promotores de plantas adecuados adicionales son el promotor de FBPasa citosólico o el promotor ST-LSI de papa (Stockhaus et al., EMBO J. 8, 1989, 2445), promotro glicina max fosforribosil-pirofosfato amidotransferasa (No. de Acceso Genbank U87999) o el promotor específico del nodo se describe en el documento EP-A-0 249 676. Los promotores especialmente ventajosos son los promotores que hacen posible la expresión en tejidos que están implicados en la biosíntesis de ácidos grasos. Muy especialmente ventajoso son los promotores específicos de semillas, tales como el promotor de USP, sino también otros promotores tales como el promotor de LeB4, DC3, faseolina o napina. Los promotores especialmente ventajosos adicionales son promotores específicos de semillas que pueden ser utilizados para plantas monocotiledóneas o dicotiledóneas y que se describen en la US 5,608,152 (promotor de napina de colza), el documento WO 98/45461 (promotor de oleosina Arabidopsis), US 5,504.200 (promotor de faseolina de Phaseolus vulgaris), documento WO 91/13980 (promotor de Brassica Bce4), por Baeumlein et al., Plant J., 2, 2, 1992:233-239 (promotor LeB4 de una leguminosa), estos promotores son adecuados para dicotiledóneas. Ejemplos de promotores que son adecuados para monocotiledóneas son el promotor lpt-2 o lpt-1 de cebada (documentos WO 95/15389 y WO 95/23230), promotor de hordeína de cebada y otros promotores adecuados descritos en el documento WO 99/16890. En principio, es posible utilizar todos los promotores naturales junto con sus secuencias reguladoras, tales como aquellos mencionados anteriormente, como secuencias de control de expresión. También es posible utilizar promotores sintéticos, ya sea en adición o solo, en particular cuando media la expresión específica de semilla, como se describe, por ejemplo, en el documento WO 99/16890.

Con el fin de lograr un contenido particularmente alto dePUFA, especialmente en plantas transgénicas, preferiblemente se deben expresar los polinucleótidos de la presente invención en cultivos de aceite de una manera específica a semilla. Para este fin, se pueden utilizar promotores específicos de semilla, o promotores que son activos en el embrión y/o en el endospermo. En principio, se pueden aislar los promotores específicos a semillas a partir de plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas. Los romotores preferidos ventajosos se enumeran aquí adelantw: USP (= proteína de semilla desconocida) y vicilina (Vicia faba) [Bäumlein et al., Mol. Gen Genet., 1991, 225 (3)], napina (colza) [US 5,608,152], proteína portadora de acilo (colza) [US 5,315.001 y documento WO 92/18634], oleosina (Arabidopsis thaliana) [documentos WO 98/45461 y WO 93/20216], faseolina (Phaseolus vulgaris) [US 5,504,200], Bce4 [documento WO 91/13980], leguminosas B4 (promotor LegB4) [Bäumlein et al., Plant J., 2, 2, 1,992], LPT2 y lpt1 (cebada) [WO 95/15389 y WO 95/23230], promotores específicos de semillas de arroz, maíz y trigo [documento WO 99/16890], Amy32b, Amy 6-6 y aleuraína [US 5,677,474], Bce4 (colza) [US 5,530,149], glicina (soja) [EP 571 741], fosfoenol piruvato carboxilasa (soja) [documento JP 06/62870], ADR12 - 2 (soja) [documento WO 98/08962], isocitrato liasa (colza) [US 5,689,040] o α -amilasa (cebada) [documento EP 781 849].

La expresión génica de la planta también se puede facilitar a través de un promotor inducible químicamente (véase una revisión en Gatz 1997, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 48:89-108). Los promotores inducibles químicamente son especialmente adecuados cuando se desea que la expresión génica debiera tener lugar en una forma específica a tiempo. Ejemplos de dichos promotores son un promotor inducible por ácido salicílico (documento WO 95/19443), un promotor inducible por tetraciclina (Gatz et al. (1992) Plant J. 2, 397-404) y un promotor inducible por etanol.

Para asegurar la integración estable de los diversos genes de biosíntesis en la planta transgénica sobre una pluralidad de generaciones, se debe expresar cada uno de los polinucleótidos de acuerdo con la invención bajo el control de un promotor separado, preferiblemente un promotor que difiere de los otros promotores, ya que repetir la secuencia de motivos puede conducir a la inestabilidad del T-ADN, o para los eventos de recombinación. En este contexto, el casete de expresión se construye ventajosamente de tal manera que un promotor está seguido por un sitio de división adecuado (ventajosamente en un poliligador) para la inserción del ácido nucleico que se va a expresar y, si es apropiado, un terminador luego se coloca detrás del poliligador. Esta secuencia se repite varias veces, preferiblemente tres, cuatro o cinco veces, de tal manera que hasta cinco genes se pueden combinar en una construcción y se introduce en la planta transgénica con el fin de ser expresados. Ventajosamente, la secuencia se repite hasta tres veces. Para expresar las secuencias de ácidos nucleico, los últimos se insertan detrás del promotor a través de un sitio de división adecuado, por ejemplo en el poliligador. Ventajosamente, cada secuencia de ácidos nucleicos tiene su propio promotor y, si es apropiado, su propio terminador. Dichas construcciones ventajosas se describen, por ejemplo, en el documento DE 101 02 337 o DE 101 02 338. Sin embargo, también es posible insertar una pluralidad de secuencias de ácidos nucleicos detrás de un promotor y, si es apropiado, en frente de un terminador. Aquí, el sitio de inserción, o la secuencia, de los ácidos nucleicos insertados en el casete de expresión no es de importancia crítica, es decir, una secuencia de ácidos nucleicos se puede insertar en la primera o última posición en la casete sin su expresión que es sustancialmente influida por el mismo. Ventajosamente, diferentes promotores tales como, por ejemplo, promotores USP, LegB4 o DC3, terminadores y diferentes se pueden utilizar en

el casete de expresión. Sin embargo, también es posible utilizar sólo un tipo de promotor en el casete. Esto, sin embargo, puede dar lugar a eventos de recombinación no deseados.

Los vectores de expresión recombinantes utilizados se pueden diseñar para la expresión en células procariotas o eucariotas. Esto es ventajoso ya que las etapas intermedias de la construcción del vector se llevan a cabo con frecuencia en los microorganismos en aras de simplicidad. Por ejemplo, los genes de $\Delta 12$ -desaturasa, $\Delta 15$ -desaturasa, $\Delta 12$ - y $\Delta 15$ -desaturasas, $\omega 3$ -desaturasa, $\Delta 6$ -desaturasa, $\Delta 6$ -elongasa, $\Delta 9$ -elongasa, $\Delta 8$ -desaturasa, $\Delta 5$ -desaturasa, $\Delta 5$ -elongasa y/o $\Delta 4$ -desaturasa se pueden expresar en células bacterianas, células de insecto (utilizando vectores de expresión de baculovirus), "células de levadura y otras células fúngicas (véase Romanos, M.A., et al. (1992) "Foreign gene expression in yeast: a review", *Yeast* 8:423-488; van den Hondel, C.A.M.J.J., et al. (1991) "Heterologous gene expression in filamentous fungi"; en: *More Gene Manipulations in Fungi*, J.W. Bennet & L.L. Lasure, Eds., pp. 396-428: Academic Press: San Diego; y 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*, Peberdy, J.F., et al., Eds., pp. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge), algas (Falcatore et al., 1999, *Marine Biotechnology* 1, 3:239-251), ciliados de los tipos: Holotrichia, Peritrichia, Spirotrichia, Suctorina, Tetrahymena, Paramecium, Colpidium, Glaucoma, Platyophrya, Potomacus, Desaturapseudocohnlembus, Euplotes, Engelmaniella y Stylonychia, en particular del género Stylonychia lemnae, utilizando vectores en un método de transformación como se describe en el documento WO 98/01572 y, preferiblemente, en las células de plantas multicelulares (véase Schmidt, R. and Willmitzer, L. (1988) "High efficiency Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of Arabidopsis thaliana leaf and cotyledon explants" *Plant Cell Rep.*:583-586; *Plant Molecular Biology and Biotechnology*, C Press, Boca Raton, Florida, Chapter 6/7, pp.71-119 (1993); F.F. White, B. Jenes et al., *Techniques for Gene Transfer*, in: *Transgenic Plants*, Vol. 1, Engineering and Utilización, Eds.: Kung and R. Wu, Academic Press (1993), 128-43; Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225 (y referencias citadas en los mismos)). Las células anfitrionas adecuadas se discuten además en Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Como una alternativa, el vector de expresión recombinante se puede transcribir y traducir in vitro, por ejemplo utilizando secuencias reguladoras del promotor T7 y polimerasa T7.

En la mayoría de los casos, la expresión de proteínas en procariotas implica el uso de vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles que rigen la expresión de proteínas de fusión o no fusión. Los vectores de expresión de fusión típicos son, entre otras cosas, pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, DB, and Johnson, KS (1988) *Gene* 67:31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) y pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ), donde la glutatión S-transferasa (GST), proteína de unión de maltosa E y proteína A, respectivamente, se fusionan con la proteína objetivo recombinante. Ejemplos de vectores de expresión de no fusión de *E. coli* inducibles adecuados son, entre otros, pTrc (Amann et al. (1988) *Gene* 69:301-315.) y pET 11d (Studier et al., *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 60-89). La expresión del gen objetivo del vector pTrc se basa en la transcripción de un promotor de fusión trp-lac híbrido por la polimerasa ARN anfitriona. La expresión del gen objetivo del vector pET 11 d se basa en la transcripción de un promotor de fusión T7-gn10-la, que está mediada por una ARN polimerasa vírica (T7 gn1), que se coexpresa. Esta polimerasa vírica se proporciona por las cepas anfitrionas BL21 (DE3) o HMS174 (DE3) de un λ -profágeno residente que alberga un gen gn1 de T7 bajo el control transcripcional del promotor lacUV 5. Otros vectores que son adecuados para los organismos procariotas son conocidos por el experto, estos vectores son, por ejemplo, en *E. coli* pLG338, pACYC₁₈₄, la serie pBR, tal como pBR322, la serie pUC tal como pUC₁₈ o pUC19, la serie M13mp, pKC30, pRep4, pHS1, pHS2, pPLC236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-11113-B1, λ gt11 o pBdCl, in *Streptomyces* pIJ101, pIJ364, pIJ702 o pIJ361, en *Bacillus* pUB110, pC194 o pBD214, en *Corynebacterium* pSA77 o pAJ667.

En una realización adicional, el vector de expresión es un vector de expresión de levadura. Ejemplos de vectores para la expresión en la levadura *S. cerevisiae* comprenden pYeDesaturasac1 (Baldari et al. (1987) *EMBO J.* 6:229-234), pMFa (Kurjan and Herskowitz (1982) *Cell* 30:933-943), pJRY88 (Schultz et al. (1987) *Gene* 54:113-123) y pYES2 (Invitrogen Corporación, San Diego, CA). Los vectores y procedimientos para la construcción de vectores que son adecuados para su uso en otros hongos, tales como los hongos filamentosos, comprenden aquellos que se describen en detalle 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., Ed., pp. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge, or in: *More Gene Manipulations in Fungi* [J.W. Bennet & L.L. Lasure, Eds., pp. 396-428: Academic Press: San Diego]. Otros vectores de levaduras adecuados son, por ejemplo, pAG- 1, YEpl3, YEpl3 o pEMBLYe23.

Como una alternativa, los polinucleótidos de la presente invención también se pueden expresar en células de insecto utilizando vectores de expresión de Baculovirus. Los vectores de Baculovirus que están disponibles para la expresión de proteínas en células de insecto cultivadas (por ejemplo, células Sf9) comprenden la serie pAc (Smith et al. (1983) *Mol. Cell Biol.* 3:2156-2165) y la serie pVL (Lucklow and Summers (1989) *Virology* 170:31-39).

Los vectores de expresión de plantas preferidos comprenden aquellos que se describen en detalle en: Becker, D., Kemper, E., Schell, J., and Masterson, R. (1992) "New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border", *Plant Mol. Biol.* 20:1195-1197; y Bevan, M.W. (1984) "Binary Agrobacterium vectors for plant

transformation", Nucl. Acids Res. 12:8711-8721; vectores de transferencia de genes en plantas superiores, en: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilización, Eds.: Kung and R. Wu, Academic Press, 1993, p. 15-38. Un casete de expresión de planta comprende preferiblemente secuencias de control de expresión que son capaces de regir la expresión de genes en células de plantas y que se ligan operativamente de tal manera que cada secuencia puede cumplir su función, tal como terminación de transcripción, por ejemplo, señales de poliadenilación. Las señales de poliadenilación preferidas son aquellas que se derivan de *Agrobacterium tumefaciens* T-ADN, tales como el gen 3 del plásmido Ti pTiACH5 (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984) 835 et seq.), que se conoce como octopina sintasa, o equivalentes funcionales de las mismas, pero todos los otros terminadores que son funcionalmente activos en plantas también son adecuados. En razón a que la expresión de genes de plantas muy a menudo no se limita a niveles transcripcionales, un casete de expresión de planta comprende preferiblemente otras secuencias que se ligan operativamente, tales como mejoradores de traducción, por ejemplo, la secuencia de sobreexcitación, que comprende la secuencia líder 5'-no traducida del virus mosaico del tabaco, lo que aumenta la elación de proteína/ARN (Gallie et al., 1987, Nucl. Acids Research 15:8693-8711). Como se describió anteriormente, la expresión de genes de plantas se debe ligar operativamente con un promotor adecuado que activa la expresión de genes con la sincronización correcta o en una forma específica a células o tejido. Los promotores utilizables también son promotores constitutivos (Benfey et al, EMBO J. 8 (1989) 2195-2202.), tal como aquellos que se derivan de virus de plantas, tales como 35S CAMV (Franck et al., Cell 21 (1980) 285-294), 19S CaMV (véase también documentos US 5352605 y WO 84/02913), o promotores de plantas, tales como el promotor de la subunidad pequeña de Rubisco, que se describe en el documento US 4,962,028. Otras secuencias preferidas para uso en el ligdo operable n casetes de expresión de genes de plantas con las secuencias objetivo, que son necesarias para dirigir el producto génico en su compartimiento celular correspondiente (véase una revisión en Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996) 285-423 y las referencias citadas en la misma), por ejemplo en la vacuola, en el núcleo, todos los tipos de plástidos, tales como amiloplastos, cloroplastos, cromoplastos, el espacio extracelular, la mitocondria, el retículo endoplasmático, cuerpos de aceite, peroxisomas y otros compartimientos de células de plantas.

Como se describió anteriormente, la expresión génica de la planta también se puede facilitar a través de un promotor inducible químicamente (véase revisión en Gatz 1997, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 48:89-108). Los promotores químicamente inducibles son especialmente adecuados cuando se desea que la expresión génica se lleve a cabo en una forma específica a tiempo. Ejemplos de dichos promotores son un promotor inducible por ácido salicílico (documento WO 95/19443), un promotor inducible por tetraciclina (Gatz et al. (1992) Plant J. 2, 397-404) y un promotor inducible por etanol. Los promotores que responden a condiciones de estrés bióticas o abióticas también son adecuados, por ejemplo promotor del gen PRP1 inducido por patógenos (Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993) 361-366), promotor hsp80 del tomate inducido por calor (US 5,187,267), promotor alfa - amilasa de papa inducido por el frío (documento WO 96/12814) o el promotor pinll inducible por lesión (documento EP-A - 0 375 091).

Se prefieren especialmente aquellos promotores que dan lugar a la expresión génica en tejidos y órganos en los que la biosíntesis de ácidos grasos, lípidos y aceites se lleva a cabo, en células de semillas, tales como las células del endosperma y del embrión en desarrollo. Los promotores adecuados son el promotor del gen de napina de colza (US 5,608,152), el promotor USP de Vicia faba (Baeumlein et al., Mol Gen Genet, 1991, 225 (3): 459 - 67), el promotor oleosina de Arabidopsis (documento WO 98/45461), el promotor faseolina de Phaseolus vulgaris (US 5,504,200), el promotor Bce4 de Brassica (documento WO 91/13980) o el promotor B4 legumine (LeB4 ; Baeumlein et al, 1992, Plant Journal, 2 (2):233 - 9), y promotores que dan lugar a la expresión específica a semilla en plantas monocotiledóneas como el maíz, cebada, trigo, centeno, arroz y similares. Los promotores adecuados notables son promotor de gen de cebada lpt2 o lpt1 (documentos WO 95/15389 y WO 95/23230) o los promotores del gen hordeína de la cebada, gen glutelina del arroz, gen orizina del arroz, gen prolamina del arroz, gen gliadina del trigo, gen glutelina del trigo, gen zeína del maíz, gen glutelina de avena, gen kasirina del sorgo o gen secalina del centeno, que se describen en el documento WO 99/16890. Promotores especialmente adecuados son también los que producen la expresión específica a plástidos, ya que los plástidos son el compartimiento en el que se sintetizan los precursores y algunos de los productos finales de la biosíntesis de lípidos. Los promotores adecuados, tales como el promotor de polimerasa de ARN vírica, se describen en los documentos WO 95/16783 y WO 97/06250, y el promotor clpP de Arabidopsis, se describe en el documento WO 99/46394.

Los vectores mencionados anteriormente son sólo una pequeña visión general de posibles vectores que son adecuados. Se conocen plásmidos adicionales por el experto y se describen por ejemplo en: Cloning Vectors (eds. Pouwels, P.H., et al., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018). Para sistemas de expresión adecuados adicionales para las células procariotas y eucariotas, véase capítulos 16 y 17 de Sambrook, J., Fritsch, EF, y Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor. Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

Como se describió anteriormente, el vector de expresión, además de los polinucleótidos de acuerdo con la invención, también pueden contener genes adicionales que se van a introducir en los organismos. Es posible y se prefiere introducir en los organismos anfitriones, y expresar en los mismos, genes reguladores, tales como genes para inductores, represores o enzimas que, como resultado de su actividad enzimática, se involucran en la regulación de uno o más genes de un ruta biosintética. Estos genes pueden ser de origen heterólogo u homólogo. Los genes o polinucleótidos heterólogos se derivan de un organismo de origen que difiere de los organismos

objetivo en el que los genes o polinucleótidos se van a introducir. En el caso de genes o polinucleótidos homólogos, el organismo objetivo y organismo de origen son idénticos. Por lo tanto, el vector comprende preferiblemente por lo menos polinucleótido adicional que codifica una enzima adicional que está implicada en la biosíntesis de lípidos o ácidos grasos. La enzima se selecciona preferiblemente del grupo que consiste de: acil-CoA deshidrogenasa, acil-ACP [= proteína portadora de acilo] desaturasa, acil- ACP tiésterasa, ácido graso aciltransferasa, acil- CoA: aciltransferasa, lisofosfolípido, ácido graso sintasa, ácido graso hidroxilasa, acetil - coenzima A carboxilasa, acil-coenzima A oxidasa, ácido graso desaturasa, ácidos grasos acetilenasa, lipoxigenasa, triacilglicerol lipasa, sintasa(s) de óxido de aleno, hidroperóxido liasa, ácido graso elongasa, $\Delta 4$ -desaturasa, $\Delta 5$ -desaturasa, $\Delta 6$ -desaturasa, $\Delta 8$ -desaturasa, $\Delta 9$ -desaturasa, $\Delta 12$ -desaturasa, $\Delta 15$ -desaturasa, $\Delta 12$ - y $\Delta 15$ -desaturasa, $\omega 3$ -desaturasa, $\Delta 5$ -elongasa, $\Delta 6$ -elongasa y $\Delta 9$ -elongasa. Combinaciones de genes especialmente preferidas se enumeran en las tablas 5 y 6 en los ejemplos que siguen.

La invención también se relaciona con una célula anfitriona que comprende el polinucleótido de acuerdo con la invención o el vector de acuerdo con la invención.

En principio, las células anfitrionas para los propósitos de la presente invención pueden ser todas células eucariotas o procariotas. Pueden ser células primarias de animales, plantas o microorganismos multicelulares, por ejemplo, de aquellos que se mencionan en otro lugar en la descripción. El término adicionalmente también comprende estirpes celulares que se pueden obtener a partir de estos organismos.

Sin embargo, las células anfitrionas para los propósitos de la invención también pueden ser de microorganismos unicelulares, por ejemplo bacterias u hongos. Microorganismos especialmente preferidos son hongos seleccionados del grupo de las familias Chaetomiaceae, Choanephoraceae, Cryptococcaceae, Cunninghamellaceae, Dematiaceae, Hydnangiaceae (género *Laccaria*), Moniliaceae, Mortierellaceae, Mucoraceae, Pythiaceae, Saccharomycetaceae, Saprolegniaceae, Schizosaccharomycetaceae, Sodariaceae o Tuberculariaceae. Microorganismos preferidos adicionales se seleccionan del grupo: Choanephoraceae, tales como los géneros *Blakeslea*, *Choanephora*, por ejemplo los géneros y especies *Blakeslea trispora*, *Choanephora cucurbitarum*, *Choanephora infundibulifera* var. *cucurbitarum*, Hydnangiaceae (por ejemplo género *Laccaria*, en particular especie *Laccaria bicolor*), Mortierellaceae, tal como el género *Mortierella*, por ejemplo los géneros y especies *Mortierella isabellina*, *Mortierella polycephala*, *Mortierella ramanniana*, *Mortierella vinacea*, *Mortierella zonata*, la familia Mucorales, tales como los géneros y especies *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus stolonifer*, *Fusarium graminearum*, Pythiaceae, tal como los géneros *Pythium*, *Phytophthora*, por ejemplo los géneros y especies *Pythium debaryanum*, *Pythium intermedium*, *Pythium irregulare*, *Pythium megalacanthum*, *Pythium paroecandrum*, *Pythium sylvaticum*, *Pythium ultimum*, *Phytophthora cactorum*, *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora citricola*, *Phytophthora citroftora*, *Phytophthora cryptogea*, *Phytophthora drechsleri*, *Phytophthora erythroseptica*, *Phytophthora lateralis*, *Phytophthora megasperma*, *Phytophthora nicotianae*, *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*, *Phytophthora palmivora*, *Phytophthora parasitica*, *Phytophthora syringae*, Saccharomycetaceae, tal como los géneros *Hansenula*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Yarrowia*, por ejemplo los géneros y especies *Hansenula anomala*, *Hansenula californica*, *Hansenula canadensis*, *Hansenula capsulata*, *Hansenula ciferrii*, *Hansenula glucozyma*, *Hansenula henricii*, *Hansenula holstii*, *Hansenula minuta*, *Hansenula nonfermentans*, *Hansenula philodendri*, *Hansenula polymorpha*, *Hansenula saturnus*, *Hansenula subpelliculosa*, *Hansenula wickerhamii*, *Hansenula wingei*, *Pichia alcoholophila*, *Pichia angusta*, *Pichia anomala*, *Pichia bisporea*, *Pichia burtonii*, *Pichia canadensis*, *Pichia capsulata*, *Pichia carsonii*, *Pichia cellobiosa*, *Pichia ciferrii*, *Pichia farinosa*, *Pichia fermentans*, *Pichia finlandica*, *Pichia glucozyma*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia haplophila*, *Pichia henricii*, *Pichia holstii*, *Pichia jadinii*, *Pichia lindnerii*, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia methanolica*, *Pichia minuta* var. *minuta*, *Pichia minuta* var. *nonfermentans*, *Pichia norvegensis*, *Pichia ohmeri*, *Pichia pastoris*, *Pichia philodendri*, *Pichia pini*, *Pichia polimorpha*, *Pichia quercuum*, *Pichia rhodanensis*, *Pichia sargentensis*, *Pichia stipitis*, *Pichia strasburgensis*, *Pichia subpelliculosa*, *Pichia toletana*, *Pichia trehalophila*, *Pichia vini*, *Pichia xylosa*, *Saccharomyces aceti*, *Saccharomyces bailii*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces bisporeus*, *Saccharomyces capensis*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*, *Saccharomyces chevalieri*, *Saccharomyces delbrueckii*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces drosophilorum*, *Saccharomyces elegans*, *Saccharomyces ellipsoideus*, *Saccharomyces fermentati*, *Saccharomyces florentinus*, *Saccharomyces fragilis*, *Saccharomyces heterogenicus*, *Saccharomyces hienpiensis*, *Saccharomyces inusitatus*, *Saccharomyces italicus*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces krusei*, *Saccharomyces lactis*, *Saccharomyces marxianus*, *Saccharomyces microellipsoideus*, *Saccharomyces montanus*, *Saccharomyces norbensis*, *Saccharomyces oleaceus*, *Saccharomyces paradoxus*, *Saccharomyces pastorianus*, *Saccharomyces pretoriensis*, *Saccharomyces rosei*, *Saccharomyces rouxii*, *Saccharomyces uvarum*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Yarrowia lipolytica*, Schizosaccharomycetaceae tal como los géneros *Schizosaccharomyces* por ejemplo la especie *Schizosaccharomyces japonicus* var. *japonicus*, *Schizosaccharomyces japonicus* var. *versatilis*, *Schizosaccharomyces malidevorans*, *Schizosaccharomyces octosporus*, *Schizosaccharomyces pombe* var. *malidevorans*, *Schizosaccharomyces pombe* var. *pombe*, Thraustochytriaceae tal como los géneros *Althornia*, *Aplanochytrium*, *Japonochytrium*, *Schizochytrium*, *Thraustochytrium* por ejemplo la especie *Schizochytrium aggregatum*, *Schizochytrium limacinum*, *Schizochytrium mangrovei*, *Schizochytrium minutum*, *Schizochytrium octosporum*, *Thraustochytrium aggregatum*, *Thraustochytrium amoeboides*, *Thraustochytrium antacticum*, *Thraustochytrium arudimentale*, *Thraustochytrium aureum*, *Thraustochytrium benthicola*, *Thraustochytrium globosum*, *Thraustochytrium indicum*, *Thraustochytrium kerguelense*, *Thraustochytrium kinnei*, *Thraustochytrium*

motivum, *Thraustochytrium multirudimentale*, *Thraustochytrium pachydermum*, *Thraustochytrium proliferum*, *Thraustochytrium roseum*, *Thraustochytrium rossii*, *Thraustochytrium striatum* o *Thraustochytrium visurgense*.

Igualmente se prefieren como microorganismos bacterias seleccionadas del grupo de las familias Bacillaceae, Enterobacteriaceae o Rhizobiaceae. Se prefiere especialmente para mencionar las siguientes bacterias seleccionadas del grupo: Bacillaceae, tal como el género *Bacillus*, por ejemplo los géneros y especies *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus amylolyticus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus sphaericus* subsp. *fusiformis*, *Bacillus galactophilus*, *Bacillus globisporus*, *Bacillus globisporus* subsp. *marinus*, *Bacillus halophilus*, *Bacillus lentimorbus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus psychrosaccharolyticus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* o *Bacillus thuringiensis*; Enterobacteriaceae tal como los géneros *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella* o *Serratia*, por ejemplo los géneros y especies *Citrobacter amalonaticus*, *Citrobacter diversus*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter genomospecies*, *Citrobacter gillenii*, *Citrobacter intermedium*, *Citrobacter koseri*, *Citrobacter murlinae*, *Citrobacter* sp., *Edwardsiella hoshinae*, *Edwardsiella ictaluri*, *Edwardsiella tarda*, *Erwinia alni*, *Erwinia amylovora*, *Erwinia ananatis*, *Erwinia aphidicola*, *Erwinia billingiae*, *Erwinia cacticida*, *Erwinia cancerogena*, *Erwinia carnegieana*, *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, *Erwinia carotovora* subsp. *betavascularum*, *Erwinia carotovora* subsp. *odorifera*, *Erwinia carotovora* subsp. *wasabiae*, *Erwinia chrysanthemi*, *Erwinia cypripedii*, *Erwinia dissolvens*, *Erwinia herbicola*, *Erwinia mallotivora*, *Erwinia milletiae*, *Erwinia nigrifluens*, *Erwinia nimipressuralis*, *Erwinia persicina*, *Erwinia psidii*, *Erwinia pyrifoliae*, *Erwinia quercina*, *Erwinia rhapontici*, *Erwinia rubrifaciens*, *Erwinia salicis*, *Erwinia stewartii*, *Erwinia tracheiphila*, *Erwinia uredovora*, *Escherichia adecarboxilata*, *Escherichia anindolica*, *Escherichia aurescens*, *Escherichia blattae*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* var. *communior*, *Escherichia coli*-mutabile, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii*, *Escherichia* sp., *Escherichia vulneris*, *Klebsiella aerogenes*, *Klebsiella edwardsii* subsp. *atlantae*, *Klebsiella ornithinolytica*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella planticola*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *Klebsiella* sp., *Klebsiella terrigena*, *Klebsiella trevisanii*, *Salmonella abony*, *Salmonella arizonae*, *Salmonella bongori*, *Salmonella choleraesuis* subsp. *arizonae*, *Salmonella choleraesuis* subsp. *bongori*, *Salmonella choleraesuis* subsp. *choleraesuis*, *Salmonella choleraesuis* subsp. *diarizonae*, *Salmonella choleraesuis* subsp. *houtenae*, *Salmonella choleraesuis* subsp. *indica*, *Salmonella choleraesuis* subsp. *salamae*, *Salmonella daressalaam*, *Salmonella enterica* subsp. *houtenae*, *Salmonella enterica* subsp. *salamae*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella gallinarum*, *Salmonella heidelberg*, *Salmonella panama*, *Salmonella senftenberg*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia entomophila*, *Serratia ficaria*, *Serratia fonticola*, *Serratia grimesii*, *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens*, *Serratia marcescens* subsp. *marcescens*, *Serratia marinorubra*, *Serratia odorifera*, *Serratia plymuthensis*, *Serratia plymuthica*, *Serratia proteamaculans*, *Serratia proteamaculans* subsp. *quinovora*, *Serratia quinivorans* o *Serratia rubidaea*; Rhizobiaceae, tal como los géneros *Agrobacterium*, *Carbophilus*, *Chelatobacter*, *Ensifer*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, por ejemplo los géneros y especies *Agrobacterium atlanticum*, *Agrobacterium ferrugineum*, *Agrobacterium gelatinovorum*, *Agrobacterium larrymoorei*, *Agrobacterium meteori*, *Agrobacterium radiobacter*, *Agrobacterium rhizogenes*, *Agrobacterium rubi*, *Agrobacterium stellulatum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium vitis*, *Carbophilus carboxidus*, *Chelatobacter heintzii*, *Ensifer adhaerens*, *Ensifer arboris*, *Ensifer fredii*, *Ensifer kostiensis*, *Ensifer kummerowiae*, *Ensifer medicae*, *Ensifer meliloti*, *Ensifer sahelii*, *Ensifer terangae*, *Ensifer xinjiangensis*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium etli*, *Rhizobium fredii*, *Rhizobium galegae*, *Rhizobium gallicum*, *Rhizobium giardinii*, *Rhizobium hainanense*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium huautlense*, *Rhizobium indigoferae*, *Rhizobium japonicum*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium loessense*, *Rhizobium loti*, *Rhizobium lupini*, *Rhizobium mediterraneum*, *Rhizobium meliloti*, *Rhizobium mongolense*, *Rhizobium phaseoli*, *Rhizobium radiobacter*, *Rhizobium rhizogenes*, *Rhizobium rubi*, *Rhizobium sullae*, *Rhizobium tianshanense*, *Rhizobium trifolii*, *Rhizobium tropici*, *Rhizobium undicola*, *Rhizobium vitis*, *Sinorhizobium adhaerens*, *Sinorhizobium arboris*, *Sinorhizobium fredii*, *Sinorhizobium kostiense*, *Sinorhizobium kummerowiae*, *Sinorhizobium medicae*, *Sinorhizobium meliloti*, *Sinorhizobium morelense*, *Sinorhizobium sahelii* o *Sinorhizobium xinjiangense*.

Células anfitrionas que se pueden utilizar adicionales se detallan en: Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Las cepas de expresión que se pueden utilizar, por ejemplo, aquellas con una menor actividad de proteasa, se describen en: Gottesman, S., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 119-128. Estas incluyen las células de plantas y de ciertos tejidos, órganos y partes de plantas, en todas sus formas fenotípicas como anteras, fibras, pelos de raíz, tallos, embriones, callos, cotiledones, pecíolos, material cosechado, tejido vegetal, tejidos reproductores y cultivos celulares que se derivan de la planta transgénica real y/o se pueden utilizar para llevar sobre la planta transgénica.

se pueden introducir polinucleótidos o vectores en la célula anfitriona como se describió anteriormente por medio de métodos de transformación o transfección que se conocen en la técnica anterior. También se conocen las condiciones y medios para el cultivo de las células anfitrionas por el experto.

La célula anfitriona de acuerdo con la invención preferiblemente comprende adicionalmente por lo menos una enzima adicional que está implicada en la biosíntesis de lípidos o ácidos grasos. Las enzimas preferidas se han mencionado ya en otro lugar en la descripción. La enzima puede estar presente en la célula anfitriona en forma endógena, es decir, la célula hospedadora ya expresa naturalmente un gen que codifica una enzima

correspondiente. Alternativamente, también es posible introducir, en la célula anfitriona, un polinucleótido heterólogo que codifica la enzima. Métodos y medios adecuados para la expresión de un polinucleótido heterólogo se conocen en la técnica anterior y se describen aquí en relación con los polinucleótidos, vectores y células anfitrionas de acuerdo con la invención.

- 5 La invención también se relaciona con un método para generar un polipéptido con actividad de desaturasa, que comprende las etapas:

(a) expresar un polinucleótido de acuerdo con la invención como se define anteriormente en una célula anfitriona, y

(b) obtener, a partir de la célula anfitriona, el polipéptido que se codifica por el polinucleótido en (a).

- 10 En este contexto, el polipéptido se puede obtener o aislar por todos los métodos de purificación de proteínas actuales. Los métodos comprenden, por ejemplo, cromatografía de afinidad, cromatografía de tamiz molecular, cromatografía líquida de alta presión o también precipitación de proteínas, si es apropiado con anticuerpos específicos. Aunque esto se prefiere, el proceso no necesita necesariamente proporcionar una preparación de polipéptido puro.

- 15 Por lo tanto la invención también relaciona con un polipéptido que se codifica por el polinucleótido de acuerdo con la invención o que se puede obtener por el método anteriormente mencionado de acuerdo con la invención.

- 20 El término "polipéptido" se refiere a un polipéptido esencialmente puro, y también a una preparación de polipéptido que comprende adicionalmente otros componentes o impurezas. El término también se utiliza para las proteínas de fusión y agregados de proteínas que comprenden el polipéptido de acuerdo con la invención y adicionalmente otros componentes. El término también se refiere a polipéptidos químicamente modificados. En este contexto, las modificaciones químicas comprenden modificaciones artificiales o modificaciones que ocurren naturalmente, por ejemplo, modificaciones postraduccionales tales como fosforilación, miristilación, glicosilación y similares. Los términos polipéptido, péptido y proteína son intercambiables y se utilizan de acuerdo con lo anterior en la descripción y en la técnica anterior. Los polipéptidos de acuerdo con la invención tienen las actividades biológicas mencionadas anteriormente, es decir, las actividades de desaturasa, y pueden influir en la biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), preferiblemente los PUFA de cadena larga (LCPUFA), como se describen aquí.

La invención también comprende un anticuerpo que reconoce específicamente el polipéptido de acuerdo con la invención.

- 30 Los anticuerpos contra el polipéptido de acuerdo con la invención se pueden preparar por medio de métodos conocidos, en donde el polipéptido purificado o fragmentos del mismo con epítopos adecuados se utilizan como el antígeno. Los epítopos adecuados se pueden determinar por medio de algoritmos conocidos para la determinación de la antigenicidad, con base en las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos de acuerdo con la invención proporcionados aquí. Los polipéptidos o fragmentos pertinentes luego se pueden sintetizar u obtener mediante técnicas recombinantes. Después que se han inmunizado los animales adecuados, preferiblemente mamíferos, por ejemplo, liebres, ratas o ratones, luego se pueden obtener los anticuerpos a partir del suero, utilizando métodos conocidos. Alternativamente, los anticuerpos monoclonales o fragmentos de anticuerpos se pueden proporcionar con los métodos conocidos, véase, por ejemplo, Harlow and Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988 o Köhler and Milstein, Nature 256 (1975), 495, y Galfré, Meth. Enzymol. 73 (1981), 3.

- 40 Los anticuerpos preferiblemente toman la forma de anticuerpos monoclonales o policlonales, anticuerpos de cadena sencilla o anticuerpos quiméricos, y fragmentos de éstos, tales como Fab, Fv o scFv. Los anticuerpos adicionales dentro del significado de la invención son anticuerpos biespecíficos, anticuerpos sintéticos o sus derivados modificados químicamente.

- 45 Los anticuerpos de acuerdo con la invención reconocen específicamente los polipéptidos de acuerdo con la invención, es decir, no reaccionan de forma cruzada significativamente con otras proteínas. Por ejemplo, un anticuerpo de acuerdo con la invención que se une específicamente a una $\Delta 12$ -desaturasa no va a reaccionar con una $\Delta 6$ -desaturasa. Esto se puede probar por medio de métodos conocidos en la técnica anterior. Por ejemplo, se pueden emplear los anticuerpos para los propósitos de reacciones de detección, inmunoprecipitación, inmunohistoquímica o purificación de proteína (por ejemplo, cromatografía de afinidad).

- 50 La invención adicionalmente se relaciona con un organismo transgénico no humano que comprende el polinucleótido, vector o célula anfitriona de la presente invención. El organismo no humano transgénico toma preferiblemente la forma de un animal, una planta o un microorganismo multicelular.

Se entiende que el término "transgénico" significa que un polinucleótido heterólogo, es decir un polinucleótido que no se produce naturalmente en el organismo respectivo, se introduce en el organismo. Esto se puede lograr ya sea

mediante inserción aleatoria del polinucleótido o mediante recombinación homóloga. Naturalmente, también es posible introducir el vector de acuerdo con la invención, en lugar del polinucleótido. Los métodos para introducir polinucleótidos o vectores para los propósitos de inserción aleatoria o recombinación homóloga se conocen en la técnica anterior y también se describen en mayor detalle adelante. Las células anfitrionas que comprenden el polinucleótido o el vector también se pueden introducir en un organismo y por lo tanto generan un organismo transgénico. En dicho caso, dicho organismo toma la forma de un organismo quimérico, donde sólo aquellas células que se derivan de las células introducidas son transgénicos, es decir, comprenden el polinucleótido heterólogo.

Los organismos no humanos transgénicos preferiblemente son organismos productores de aceite, lo que significa que los organismos se utilizan para la producción de aceites, por ejemplo, hongos tales como *Rhizopus* o *Thraustochytrium*, algas, tales como *Euglena*, *Nephroselmis*, *Pseudoscurfieldia*, *Prasinococcus*, *Scherffelia*, *Tetraselmis*, *Mantoniella*, *Ostreococcus*, *Cryptocodinium*, *Phaeodactylum* o diatomeas como *Pythium* y *Phytophthora* o plantas.

Las plantas transgénicas que se pueden utilizar son, en principio, todas las plantas, es decir plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas. Preferiblemente, toman la forma de las plantas de cultivo de aceite que contienen grandes cantidades de compuestos lipídicos, tales como maní, colza, canola, girasol, cártamo (*Carthamus tinctoria*), amapola, mostaza, cáñamo, planta de aceite de ricino, oliva, sésamo, Caléndula, Púncia, onagra, verbascum, cardo, rosas silvestres, avellanas, almendras, macadamia, aguacate, laurel, calabaza/ ahuyama, linaza, soja, pistachos, borraja, árboles (palma, coco o nuez) o los cultivos herbáceos tales como maíz, trigo, centeno, avena, triticale, arroz, cebada, algodón, yuca, pimienta, tagetes, plantas solanáceas tales como patata, tabaco, berenjena y tomate, especies de Vicia, guisante, alfalfa o plantas de arbusto (café, cacao, té), especies de *Salix* y pastos perennes y cultivos forrajeros. Las plantas preferidas de acuerdo con la invención son plantas oleaginosas de cultivos tales como maní, colza, canola, girasol, cártamo, amapola, mostaza, cáñamo, ricino, oliva, caléndula, Púncia, onagra, zapallo/calabaza, linaza, soja, borraja, árboles (palma, coco). Se prefieren especialmente las plantas que tienen un alto contenido en ácidos C₁₈ : 2- y/ o C₁₈:3- grasos, como el girasol, tabaco, verbascum, sésamo, algodón, zapallo/calabaza, amapola, onagra, nueces, linaza, cáñamo, cardo o cártamo. Se prefieren muy especialmente las plantas como el cártamo, girasol, amapola, onagra, nuez, linaza o cáñamo. En principio, sin embargo, todas las plantas que son capaces de sintetizar ácidos grasos son adecuadas, tales como todas las plantas dicotiledóneas o monocotiledóneas, algas o musgos. Las plantas ventajosas se seleccionan del grupo de las familias de plantas Adoltheciaceae, Anacardiaceae, Asteraceae, Apiaceae, Betulaceae, Boraginaceae, Brassicaceae, Bromeliaceae, Caricaceae, Cannabaceae, Convolvulaceae, Chenopodiaceae, Cryptocodiniaceae, Cucurbitaceae, Ditrichaceae, Elaeagnaceae, Ericaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Geraniaceae, Gramineae, Juglandaceae, Lauraceae, Leguminosae, Linaceae, Prasinophyceae o plantas vegetales o plantas ornamentales como Tagetes.

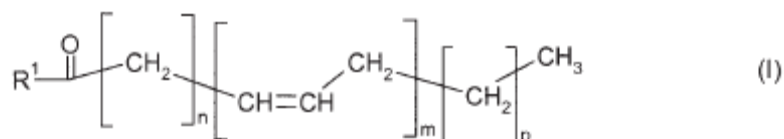
Los ejemplos que se pueden mencionar especialmente preferiblemente son las siguientes plantas seleccionadas del grupo que consiste de: Adoltheciaceae tal como los géneros *Physcomitrella*, por ejemplo, el género y la especie *Physcomitrella patens*, Anacardiaceae, tales como los géneros *Pistacia*, *Mangifera*, *Anacardium*, por ejemplo el género y la especie *Pistacia vera* [pistacho], *Mangifera indica* [mango] o *Anacardium occidentale* [marañón], Asteraceae, tales como los géneros *Calendula*, *Carthamus*, *Centaurea*, *Cichorium*, *Cynara*, *Helianthus*, *Lactuca*, *Locusta*, *Tagetes*, *Valeriana*, por ejemplo, el género y la especie *Calendula officinalis* [caléndula común], *Carthamus tinctorius* [cártamo], *Centaurea cyanus* [flor de maíz], *Cichorium intybus* [achicoria], *Cynara scolymus* [alcachofa], *Helianthus annuus* [girasol], *Lactuca sativa*, *Lactuca crista*, *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* [verduras para ensalada], *Tagetes lucida*, *Tagetes erecta* o *Tagetes tenuifolia* [caléndula africana o francesa], Apiaceae, tales como el género *Daucus*, por ejemplo, el género y la especie *Daucus carota* [zanahoria], Betulaceae, tales como el género *Corylus*, por ejemplo los géneros y especies de *Corylus avellana* o *Corylus Columa* [avellana], Boraginaceae, tales como el género *Borago*, por ejemplo, el género y la especie *Borago officinalis* [borraja], Brassicaceae, como por ejemplo los géneros *Brassica*, *camelina*, *Melanosinapis*, *Sinapis*, *Arabidopsis*, por ejemplo, los géneros y especies de *Brassica napus*, *Brassica rapa* ssp. [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*, Bromeliaceae, tal como los géneros *Ananas*, *Bromelia* (piña), por ejemplo, los géneros y especies *Ananas comosus*, *Ananas ananas* o *Bromelia comosus* [piña], Caricaceae, tales como el género *Carica*, tales como el género y la especie *Carica papaya* [papaya], Cannabaceae, tales como el género *Cannabis*, tales como el género y la especie de *cannabis Sativa* [cáñamo], Convolvulaceae, tales como los géneros *Ipomoea*, *Convolvulus*, por ejemplo, los géneros y especies de *Ipomoea batatas*, *Ipomoea pandurata*, *Convolvulus batatas*, *Convolvulus tiliaceus*, *Ipomoea fastigiata*, *Ipomoea tiliacea*, *Ipomoea triloba* o *Convolvulus panduratus* [papa, batata], Chenopodiaceae, tal como el género *Beta*, tales como los géneros y especies de *Beta vulgaris*, *Beta vulgaris* var. *altissima*, *Beta vulgaris* var. *vulgaris*, *Beta maritima*, *Beta vulgaris* var. *perennis*, *Beta vulgaris* var. *conditiva* o *Beta vulgaris* var. *esculenta* [remolacha], Cryptocodiniaceae, tales como el género *Cryptocodinium*, por ejemplo, el género y especie *Cryptocodinium cohnii*, Cucurbitáceas, tales como el género *Cucurbita*, por ejemplo, los géneros y especies *Cucurbita maxima*, *Cucurbita mixta*, *Cucurbita pepo* o *Cucurbita moschata* [zapallo/calabaza], Cymbellaceae, tal como los géneros *Amphora*, *Cymbella*, *Okedenia*, *Phaeodactylum*, *Reimeria*, por ejemplo el género y especie *Phaeodactylum tricornutum*, Ditrichaceae, tal como los géneros

Ditrichaceae, Astomiopsis, Ceratodon, Chrysoblastella, Ditrichum, Distichium, Eccremidium, Lophidion, Philibertiella, Pleuridium, Saelania, Trichodon, Skottsbergia, por ejemplo los géneros y especies Ceratodon antarcticus, Ceratodon columbiae, Ceratodon heterophyllus, Ceratodon purpurascens, Ceratodon purpureus, Ceratodon purpureus ssp. convolutus, Ceratodon purpureus ssp. stenocarpus, Ceratodon purpureus var. rotundifolius, Ceratodon ratodon, Ceratodon stenocarpus, Chrysoblastella chilensis, Ditrichum ambiguum, Ditrichum brevisetum, Ditrichum crispatisimum, Ditrichum difficile, Ditrichum falcifolium, Ditrichum flexicaule, Ditrichum giganteum, Ditrichum heteromallum, Ditrichum lineare, Ditrichum montanum, Ditrichum pallidum, Ditrichum punctulatum, Ditrichum pusillum, Ditrichum pusillum var. tortile, Ditrichum rhyrachostegium, Ditrichum schimperii, Ditrichum tortile, Distichium capillaceum, Distichium hagenii, Distichium inclinatum, Distichium macounii, Eccremidium floridanum, Eccremidium whiteleggei, Lophidion strictus, Pleuridium acuminatum, Pleuridium altemifolium, Pleuridium holdridgei, Pleuridium mexicanum, Pleuridium ravenelii, Pleuridium subulatum, Saelania glaucescens, Trichodon borealis, Trichodon cylindricus o Trichodon cylindricus var. oblongus, Elaeagnaceae, tal como el género Elaeagnus, por ejemplo el género y especie Olea europaea [oliva], Ericaceae, tal como el género Kalmia, por ejemplo los géneros y especies Kalmia latifolia, Kalmia angustifolia, Kalmia microphylla, Kalmia polifolia, Kalmia occidentalis, Cistus chamaerhodendros o Kalmia lucida [mountain laurel], Euphorbiaceae, tal como los géneros Manihot, Janipha, Jatropha, Ricinus, por ejemplo los géneros y especies Manihot utilissima, Janipha manihot, Jatropha manihot, Manihot aipilo, Manihot dulcis, Manihot manihot, Manihot melanobasis, Manihot esculenta [yuca] o Ricinus communis [planta de aceite de ricino], Fabaceae, tal como los géneros Pisum, Albizia, Cathormion, Feuillea, Inga, Pithecolobium, Acacia, Mimosa, Medicago, Glycine, Dolichos, Phaseolus, soya, por ejemplo los géneros y especies Pisum sativum, Pisum arvense, Pisum humile [guisante], Albizia berteriana, Albizia julibrissin, Albizia lebbeck, Acacia berteriana, Acacia littoralis, Albizia berteriana, Albizzia berteriana, Cathormion berteriana, Feuillea berteriana, Inga fragrans, Pithecellobium berterianum, Pithecellobium fragrans, Pithecolobium berterianum, Pseudalbizzia berteriana, Acacia julibrissin, Acacia nemu, Albizia nemu, Feuillea julibrissin, Mimosa julibrissin, Mimosa speciosa, Sericandra julibrissin, Acacia lebbeck, Acacia macrophylla, Albizia lebbeck, Feuillea lebbeck, Mimosa lebbeck, Mimosa speciosa [árbol de seda], Medicago sativa, Medicago falcata, Medicago varia [alfalfa] Glycine max Dolichos soja, Glycine gracilis, Glycine hispida, Phaseolus max, Soja hispida o Soja max [soya], Funariaceae, tal como los géneros Aphanorrhagma, Entosthodon, Funaria, Physcomitrella, Physcomitrium, por ejemplo los géneros y especies Aphanorrhagma serratum, Entosthodon attenuatus, Entosthodon bolanderi, Entosthodon bonplandii, Entosthodon californicus, Entosthodon drummondii, Entosthodon jamesonii, Entosthodon leibergii, Entosthodon neoscoticus, Entosthodon rubrisetus, Entosthodon spathulifolius, Entosthodon tucsoni, Funaria americana, Funaria bolanderi, Funaria calcarea, Funaria californica, Funaria calvescens, Funaria convoluta, Funaria flavicans, Funaria groutiana, Funaria hygrometrica, Funaria hygrometrica var. arctica, Funaria hygrometrica var. calvescens, Funaria hygrometrica var. convoluta, Funaria hygrometrica var. muralis, Funaria hygrometrica var. utahensis, Funaria microstoma, Funaria microstoma var. obtusifolia, Funaria muhlenbergii, Funaria orcuttii, Funaria plano-convexa, Funaria polaris, Funaria ravenelii, Funaria rubriseta, Funaria serrata, Funaria sonora, Funaria sublimbatus, Funaria tucsoni, Physcomitrella californica, Physcomitrella patens, Physcomitrella readeri, Physcomitrium australe, Physcomitrium californicum, Physcomitrium collenchymatum, Physcomitrium coloradense, Physcomitrium cupuliferum, Physcomitrium drummondii, Physcomitrium eurystomum, Physcomitrium flexifolium, Physcomitrium hookeri, Physcomitrium hookeri var. serratum, Physcomitrium immersum, Physcomitrium kellermanii, Physcomitrium megalocarpum, Physcomitrium pyriforme, Physcomitrium pyriforme var. serratum, Physcomitrium rufipes, Physcomitrium sandbergii, Physcomitrium subsphaericum, Physcomitrium washingtonense, Geraniaceae, tal como los géneros Pelargonium, Cocos, Oleum, por ejemplo los géneros y especies Cocos nucifera, Pelargonium grossularioides o Oleum cocois [coco], Graminaeae, tal como el género Saccharum, por ejemplo el género y especie Saccharum officinarum, Juglandaceae, tal como los géneros Juglans, Wallia, por ejemplo los géneros y 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], Lauraceae, tal como los géneros Persea, Laurus, por ejemplo los géneros y especies Laurus nobilis [bay], Persea americana, Persea gratissima o Persea persea [avocado], Leguminosae, tal como el género Arachis, por ejemplo el género y especie Arachis hypogaea [maní], Linaceae, tal como los géneros Linum, Adenolinum, por ejemplo los géneros y especies Linum usitatissimum, Linum humile, Linum austriacum, Linum bienne, Linum angustifolium, Linum catharticum, Linum flavum, Linum grandiflorum, Adenolinum grandiflorum, Linum lewisii, Linum narbonne, Linum perenne, Linum perenne var. lewisii, Linum pratense o Linum trigynum [linaza], Lythraeae, tal como el género Punica, por ejemplo el género y especie Punica granatum [granada], Malvaceae, tal como el género Gossypium, por ejemplo los géneros y especies Gossypium hirsutum, Gossypium arboreum, Gossypium barbadense, Gossypium herbaceum o Gossypium thurberi [algodón], Marchantiaceae, tal como el género Marchantia, por ejemplo los géneros y especies Marchantia berteriana, Marchantia foliacea, Marchantia macropora, Musaceae, tal como el género Musa, por ejemplo los géneros y especies Musa nana, Musa acuminata, Musa paradisiaca, Musa spp. [banana], Onagraceae, tal como los géneros Camissonia, Oenothera, por ejemplo los géneros y especies Oenothera biennis o Camissonia brevipes [onagra], Palmae, tal como el género Elaeis, por ejemplo el género y especie Elaeis guineensis [palma de aceite], Papaveraceae, tal como el género Papaver, por ejemplo los géneros y especies Papaver orientale, Papaver rhoeas, Papaver dubium [amapola], Pedaliaceae, tal como el género Sesamum, por ejemplo el género y especie Sesamum indicum [sésamo], Piperaceae, tal como los géneros Piper, Artanthe, Peperomia, Steffensia, por ejemplo los géneros y especies Piper aduncum, Piper amalago, Piper angustifolium, Piper auritum, Piper betel, Piper cubeba, Piper longum, Piper nigrum, Piper retrofractum, Artanthe adunca, Artanthe elongata, Peperomia elongata, Piper elongatum, Steffensia elongata [cayenne pepper], Poaceae, tal como los géneros Hordeum, Secale, Avena, Sorghum, Andropogon, Holcus, Panicum, Oryza, Zea (maíz), Triticum, por ejemplo los géneros y 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 cereale* [centeno], *Avena sativa*, *Avena fatua*, *Avena byzantina*, *Avena fatua* var. *sativa*, *Avena hybrida* [avena], *Sorghum bicolor*, *Sorghum halepense*, *Sorghum saccharatum*, *Sorghum vulgare*, *Andropogon drummondii*, *Holcus bicolor*, *Holcus sorghum*, *Sorghum aetiopicum*, *Sorghum arundinaceum*, *Sorghum cafferum*, *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* [wheat], *Porphyridiaceae*, tal como los géneros *Chrootheca*, *Flintiella*, *Petrovanella*, *Porphyridium*, *Rhodella*, *Rhodorus*, *Vanhoeffenia*, por ejemplo el género y especie *Porphyridium cruentum*, *Proteaceae*, tal como el género *Macadamia*, por ejemplo el género y especie *Macadamia intergrifolia* [macadamia], *Prasinophyceae*, tal como los géneros *Nephroselmis*, *Prasinococcus*, *Scherffelia*, *Tetraselmis*, *Mantoniella*, *Ostreococcus*, por ejemplo los géneros y especies *Nephroselmis olivacea*, *Prasinococcus capsulatus*, *Scherffelia dubia*, *Tetraselmis chui*, *Tetraselmis suecica*, *Mantoniella squamata*, *Ostreococcus tauri*, *Rubiaceae*, tal como el género *Coffea*, por ejemplo los géneros y especies *Coffea* spp., *Coffea arabica*, *Coffea canephora* o *Coffea liberica* [café], *Scrophulariaceae*, tal como el género *Verbascum*, por ejemplo los géneros y 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* [verbascum], *Solanaceae*, tal como los géneros *Capsicum*, *Nicotiana*, *Solanum*, *Lycopersicon*, por ejemplo los géneros y especies *Capsicum annuum*, *Capsicum annuum* var. *glabriusculum*, *Capsicum frutescens* [pimienta], *Capsicum annuum* [páprika], *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana alata*, *Nicotiana attenuata*, *Nicotiana glauca*, *Nicotiana langsdorffii*, *Nicotiana obtusifolia*, *Nicotiana quadrivalvis*, *Nicotiana repanda*, *Nicotiana rustica*, *Nicotiana sylvestris* [tabaco], *Solanum tuberosum* [patata], *Solanum melongena* [berenjena], *Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon lycopersicum*, *Lycopersicon pyriforme*, *Solanum integrifolium* o *Solanum lycopersicum* [tomate], *Sterculiaceae*, tal como el género *Theobroma*, por ejemplo el género y especie *Theobroma cacao* [cacao] o *Theaceae*, tal como el género *Camellia*, por ejemplo el género y especie *Camellia sinensis* [té].

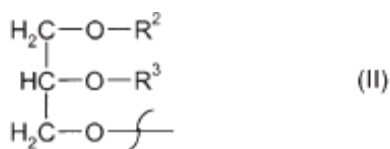
Los microorganismos multicelulares que se pueden emplear como organismos no humanos transgénicos son preferiblemente protistas o diatomeas seleccionados de entre el grupo de las familias *Dinophyceae*, *Turanellidae* o *Oxytrichidae*, tales como los géneros y especies: *Cryptocodium cohnii*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Stylonychia mytilus*, *Stylonychia pustulata*, *Stylonychia putrina*, *Stylonychia notophora*, *Stylonychia* sp., *Colpidium campylum* o *Colpidium* sp.

La invención se relaciona adicionalmente con un proceso para la producción de una sustancia que tiene la estructura mostrada en la fórmula I adelante



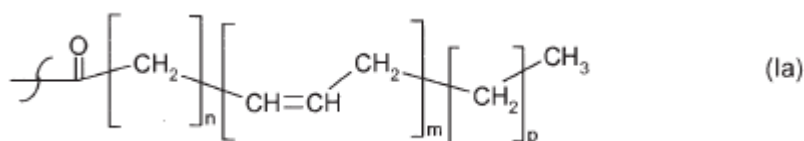
en donde las variables y sustituyentes son como sigue:

R^1 = hidroxilo, coenzima A (tiéster), lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, lisofosfatidilglicerol, lisodifosfatidilglicerol, lisofosfatidilserina, lisofosfatidilinositol, base de esfingo o un radical de la fórmula II



R^2 = hidrógeno, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol o un alquilcarbonilo saturado o insaturado C_2 a C_{24} ,

R^3 = hidrógeno, un alquilcarbonilo saturado o insaturado C_2 a C_{24} , o R^2 y R^3 independientemente de otro son un radical de la fórmula Ia:



en la que

$n = 2, 3, 4, 5, 6, 7$ o 9 , $m = 2, 3, 4, 5$ o 6 y $p = 0$ o 3 ;

y en donde el proceso comprende el cultivo de (i) una célula anfitriona de acuerdo con la invención o (ii) de un organismo transgénico o humano de acuerdo con la invención bajo condiciones que permiten la biosíntesis de la sustancia. Preferiblemente, la sustancia anteriormente mencionada se proporciona en una cantidad de por lo menos 1% en peso con base en el contenido de lípido total en la célula anfitriona o el organismo transgénico.

Los radicales alquilo R^2 que se pueden mencionar son cadenas de alquilcarbonilo C_2 - C_{24} sustituidas o no sustituidas, saturadas o no saturadas tales como etilcarbonilo, n-propilcarbonilo, n-butilcarbonilo, n-pentilcarbonilo, n-hexilcarbonilo, n-heptilcarbonilo, n-octilcarbonilo, n-nonilcarbonilo, n-decilcarbonilo, n-undecilcarbonilo, n-dodecilcarbonilo, n-tridecilcarbonilo, n-tetradecilcarbonilo, n-pentadecilcarbonilo, n-hexadecilcarbonilo, n-heptadecilcarbonilo, n-octadecilcarbonilo, n-nonadecilcarbonilo, n-eicosilcarbonilo, n-docosanilcarbonilo o n-tetracosanilcarbonilo, que comprenden uno o más enlaces dobles. Se prefieren los radicales alquilcarbonilo C_{10} - C_{22} saturados y no saturados tales como n-decilcarbonilo, n-undecilcarbonilo, n-dodecilcarbonilo, n-tridecilcarbonilo, n-tetradecilcarbonilo, n-pentadecilcarbonilo, n-hexadecilcarbonilo, n-heptadecilcarbonilo, n-octadecilcarbonilo, n-nonadecilcarbonilo, n-eicosilcarbonilo, n-docosanilcarbonilo o n-tetracosanilcarbonilo, que comprenden uno o más enlaces dobles. Especialmente se prefieren radicales alquilcarbonilo C_{10} - C_{22} saturados o insaturados tales como radicales alquilcarbonilo C_{10} , alquilcarbonilo C_{11} , alquilcarbonilo C_{12} , alquilcarbonilo C_{13} , alquilcarbonilo C_{14} , alquilcarbonilo C_{16} , alquilcarbonilo C_{18} , alquilcarbonilo C_{20} o alquilcarbonilo C_{22} que comprenden uno o más enlaces dobles. Se prefieren muy especialmente radicales alquilcarbonilo C_{16} - C_{22} saturados o insaturados tales como alquilcarbonilo C_{16} , alquilcarbonilo C_{18} , alquilcarbonilo C_{20} o alquilcarbonilo C_{22} que comprenden uno o más enlaces dobles. Estos radicales preferidos pueden comprender dos, tres, cuatro, cinco o seis enlaces dobles. Los radicales especialmente preferidos con 20 o 22 átomos de carbono en la cadena de ácido graso comprenden hasta seis enlaces dobles, preferiblemente tres, cuatro, cinco o seis enlaces dobles, especialmente preferiblemente cinco o seis enlaces dobles. Todos los radicales mencionados anteriormente se derivan de ácidos grasos correspondientes.

Los radicales alquilo R^3 que se pueden mencionar son cadenas de alquilcarbonilo sustituidas o no sustituidas saturadas o no saturadas C_2 - C_{24} tales como etilcarbonilo, n-propilcarbonilo, n-butilcarbonilo, n-pentilcarbonilo, n-hexilcarbonilo, n-heptilcarbonilo, n-octilcarbonilo, n-nonilcarbonilo, n-decilcarbonilo, n-undecilcarbonilo, n-dodecilcarbonilo, n-tridecilcarbonilo, n-tetradecilcarbonilo, n-pentadecilcarbonilo, n-hexadecilcarbonilo, n-heptadecilcarbonilo, n-octadecilcarbonilo, n-nonadecilcarbonilo, n-eicosilcarbonilo, n-docosanilcarbonilo o n-tetracosanilcarbonilo, que comprenden uno o más enlaces dobles. Se prefieren los radicales alquilcarbonilo C_{10} - C_{22} saturado o insaturados tales como n-decilcarbonilo, n-undecilcarbonilo, n-dodecilcarbonilo, n-tridecilcarbonilo, n-tetradecilcarbonilo, n-pentadecilcarbonilo, n-hexadecilcarbonilo, n-heptadecilcarbonilo, n-octadecilcarbonilo, n-nonadecilcarbonilo, n-eicosilcarbonilo, n-docosanilcarbonilo o n-tetracosanilcarbonilo, que comprenden uno o más enlaces dobles. Especialmente se prefieren radicales alquilcarbonilo C_{10} - C_{22} saturados o insaturados tales como radicales alquilcarbonilo C_{10} , alquilcarbonilo C_{11} , alquilcarbonilo C_{12} , alquilcarbonilo C_{13} , alquilcarbonilo C_{14} , alquilcarbonilo C_{16} , alquilcarbonilo C_{18} , alquilcarbonilo C_{20} o alquilcarbonilo C_{22} que comprenden uno o más enlaces dobles. Se prefieren muy especialmente radicales alquilcarbonilo C_{16} - C_{22} saturados o insaturados tales como radicales alquilcarbonilo C_{16} , alquilcarbonilo C_{18} , alquilcarbonilo C_{20} o alquilcarbonilo C_{22} que comprenden uno o más enlaces dobles. Estos radicales preferidos pueden comprender dos, tres, cuatro, cinco o seis enlaces dobles. Los radicales especialmente preferidos con 20 o 22 átomos de carbono en la cadena de ácido graso comprenden hasta seis enlaces dobles, preferiblemente tres, cuatro, cinco o seis enlaces dobles, especialmente preferiblemente cinco o seis enlaces dobles. Todos los radicales mencionados anteriormente se derivan de ácidos grasos correspondientes.

Los radicales mencionados anteriormente de R^1 , R^2 y R^3 se pueden sustituir por grupos hidroxilo y/o epoxi y/o pueden comprender enlaces triples.

Los ácidos grasos poliinsaturados producidos en el proceso de acuerdo con la invención ventajosamente comprenden por lo menos dos, ventajosamente tres, cuatro, cinco o seis, enlaces dobles. Los ácidos grasos especialmente ventajosamente comprenden cuatro, cinco o seis enlaces dobles. Los ácidos grasos producidos en el proceso ventajosamente tienen 18, 20 o 22 átomos de C en la cadena de ácido graso; los ácidos grasos preferiblemente comprenden 20 o 22 átomos de carbono en la cadena de ácido graso. Los ácidos grasos saturados ventajosamente se hacen reaccionar a un menor grado, o en absoluto, con los ácidos nucleicos utilizados en el proceso. A un menor grado se debe entender que significa que los ácidos grasos saturados se hacen reaccionar con menos de 5% de la actividad, ventajosamente menos de 3%, especialmente ventajosamente con menos de 2%, muy

especialmente preferiblemente con menos de 1, 0.5, 0.25 o 0.125% en comparación con ácidos grasos poliinsaturados. Estos ácidos grasos que se han producido se pueden producir en el proceso como un único producto o estar presente en una mezcla de ácido graso.

- 5 Los radicales R^2 o R^3 en las fórmulas generales II pueden ser idénticos o no idénticos, R^2 y R^3 preferiblemente son un alquilcarbonilo C_{18} - C_{22} saturado o insaturado, especialmente preferiblemente un -alquilcarbonilo C_{18} , C_{20} o C_{22} con por lo menos dos enlaces dobles.

- 10 Los ácidos grasos poliinsaturados producidos en el proceso ventajosamente se unen en lípidos de membrana y/o triacilglicéridos, pero también pueden ocurrir en los organismos como ácidos grasos libres o también unidos en la forma de otros ésteres de ácido graso. En este contexto, pueden estar presentes como "productos puros" o de otro modo ventajosamente en la forma de mezclas de diversos ácidos grasos o mezclas de diferentes glicéridos. Los diversos ácidos grasos que se unen en los triacilglicéridos se pueden derivar de ácidos grasos de cadena corta con 4 a 6 átomos de C, ácidos grasos de cadena mediana con 8 a 12 átomos de C o ácidos grasos de cadena larga con 14 a 24 átomos de C; se prefieren ácidos grasos de cadena larga, más preferiblemente ácidos grasos de cadena larga LCPUFAs de ácidos grasos de C_{18} , C_{20} y/o C_{22} .

- 15 El proceso de acuerdo con la invención ventajosamente produce ésteres de ácido graso con moléculas de ácido graso C_{18} , C_{20} y/o C_{22} poliinsaturados con por lo menos dos enlaces dobles en el éster de ácido graso, ventajosamente con por lo menos tres, cuatro, cinco o seis enlaces dobles en el éster de ácido graso, especialmente ventajosamente con por lo menos cinco o seis enlaces dobles en el éster de ácido graso y ventajosamente lleva a la síntesis de ácido linoleico (=LA, $C_{18:2}^{\Delta 9,12}$), ácido γ -linolénico (= GLA, $C_{18:3}^{\Delta 6,9,12}$), ácido estearidónico (= SDA, $C_{18:4}^{\Delta 6,9,12,15}$), ácido dihomo- γ -linolénico (= DGLA, $20:3^{\Delta 8,11,14}$), ácido $\omega 3$ -eicosatetraenoico (= ETA, $C_{20:4}^{\Delta 5,8,11,14}$), ácido araquidónico (ARA, $C_{20:4}^{\Delta 5,8,11,14}$), ácido eicosapentaenoico (EPA, $C_{20:5}^{\Delta 5,8,11,14,17}$), ácido $\omega 6$ -docosapentaenoico ($C_{22:5}^{\Delta 4,7,10,13,16}$), ácido $\omega 6$ -docosatetraenoico ($C_{22:4}^{\Delta 7,10,13,16}$), ácido $\omega 3$ -docosapentaenoico (= DPA, $C_{22:5}^{\Delta 7,10,13,16,19}$), ácido docosahexaenoico (= DHA, $C_{22:6}^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$) o mezclas de estos, preferiblemente ARA, EPA y/o DHA. Preferiblemente se producen muy especialmente los ácidos $\omega 3$ -grasos tales como EPA y/o DHA.

- 30 Se pueden aislar los ésteres de ácido graso con moléculas de ácido graso C_{18} , C_{20} y/o C_{22} poliinsaturados en la forma de un aceite o lípido, por ejemplo en la forma de compuestos tales como esfingolípidos, fosfoglicéridos, lípidos, glicolípidos tales como glicosfingolípidos, fosfolípidos tales como fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol o difosfatidilglicerol, monoacilglicéridos, diacilglicéridos, triacilglicéridos u otros ésteres de ácido graso tales como los ésteres de acil-coenzima A que comprenden los ácidos grasos poliinsaturados con por lo menos dos, tres, cuatro, cinco o seis, preferiblemente cinco o seis enlaces dobles, a partir de organismos que se han utilizado para la preparación de los ésteres de ácido graso; ventajosamente, 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, los ácidos grasos poliinsaturados también se presentan en los organismos, ventajosamente las plantas, 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 los organismos 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 los diversos compuestos asciende a 100% en peso.

- 40 El proceso de acuerdo con la invención proporciona los LCPUFA producidos en un contenido de por lo menos 3% en peso, ventajosamente por lo menos 5% en peso, preferiblemente por lo menos 8% en peso, especialmente preferiblemente por lo menos 10% en peso, más preferiblemente por lo menos 15% en peso, con base en el total de ácidos grasos en los organismos transgénicos, ventajosamente en una planta transgénica. En este contexto, es ventajoso convertir los ácidos grasos C_{18} - y/o C_{20} que están presentes en los organismos anfitriones a por lo menos 10%, ventajosamente a por lo menos 20%, especialmente ventajosamente a por lo menos 30%, más ventajosamente a por lo menos 40% para dar los productos correspondientes tales como DPA o DHA, por mencionar solo dos ejemplos. Los ácidos grasos ventajosamente se producen en forma de enlace. Estos ácidos grasos insaturados, con la ayuda de los ácidos nucleicos se pueden utilizar en el proceso de acuerdo con la invención, se pueden posicionar en la posición sn1, sn2 y/o sn3 de los triglicéridos ventajosamente producidos. Debido a que se realiza una pluralidad de etapas de reacción por los compuestos de partida ácido linoleico ($C_{18:2}$) y ácido linolénico ($C_{18:3}$) en el proceso de acuerdo con la invención, los productos finales del proceso tales como, por ejemplo, ácido araquidónico (ARA), ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido $\omega 6$ -docosapentaenoico o DHA no se obtienen como productos absolutamente puros; trazas menores de los precursores siempre están presentes en el producto final. Si, por ejemplo, están presentes ambos ácido linoleico y ácido linolénico en el organismo de partida y la planta de partida, los productos finales tales como ARA, EPA o DHA están presentes como mezclas. Los precursores ventajosamente no deben ser más del 20% en peso, preferiblemente no más del 15% en peso, especialmente preferiblemente no más del 10% en peso, más preferiblemente no más del 5% en peso, con base en la cantidad de el producto final en cuestión. Ventajosamente, solo se producen ARA, EPA o DHA, enlace o como ácidos libres, como productos finales en una planta transgénica en el proceso de acuerdo con la invención. Si se

producen de forma simultánea los compuestos ARA, EPA y DHA, ventajosamente se produce en una relación de por lo menos 3:2:1 (EPA:ARA:DHA).

Los ésteres de ácido graso o mezclas de ácidos grasos producidos por el proceso de acuerdo con la invención ventajosamente comprenden 6 a 15% de ácido palmítico, 1 a 6% de ácido esteárico, 7-85% 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, en cada caso con base en 100% y en el contenido de ácido graso total de los organismos. El ácido graso poliinsaturado ventajoso que está presente en los ésteres de ácido graso o mezclas de ácidos grasos es preferiblemente ácido eicosapentaenoico. Más aún, los ésteres de ácido graso o mezclas de ácidos grasos que se ha producido por el proceso de la invención ventajosamente comprenden ácidos grasos seleccionados del grupo de los ácidos grasos ácido erúcico (ácido 13-docosaenoico), ácido estercúlico (ácido 9,10-metilenooctadec-9-enoico), ácido malválico (ácido 8,9-metilenheptadec-8-enoico), ácido chaulmoógrico (ácido ciclopentenododecanoico), ácido graso de furano (ácido 9, 12-epoxioctadeca-9,11- dienoico), ácido vernólico (ácido 9,10-epoxioctadec-12-enoico), ácido tarínico (ácido 6-octadecinoico), ácido 6-nonadecinoico, ácido santálico (ácido t11-octadecen-9-inoico), ácido 6,9-octadeceninoico, ácido pirúlico (ácido t10-heptadecen-8-inoico), ácido crepenínico (ácido 9-octadecen-12-inoico), ácido 13,14-dihidroorofeico, ácido octadecen-13-eno-9,11-diinoico, ácido petroselínico (ácido cis-6-octadecenoico), ácido 9c, 12t-octadecadienoico, ácido calendúlico (ácido 8t10t12c-octadecatrienoico), ácido catálpico (ácido 9t11t13c-octadecatrienoico), ácido eleosteárico (ácido 9c11t13t-octadecatrienoico), ácido jacárico (ácido 8c10t12c-octadecatrienoico), ácido punícico (ácido 9c11t13c-octadecatrienoico), ácido parinárico (ácido 9c11t13t15c-octadecatetraenoico), ácido pinolénico (todo ácido -cis-5,9,12-octadecatrienoico), ácido labalénico (ácido 5,6-octadecadienalénico), ácido ricinoleico (ácido 12-hidroxioleico) y/o ácido coriólico (ácido 13-hidroxi-9c, 11t-octadecadienoico). Los ácidos grasos mencionados anteriormente son, por regla general, de forma ventajosa sólo se encuentran en trazas en los ésteres de ácidos grasos o mezclas de ácidos grasos producidos por el proceso de acuerdo con la invención, es decir que, con base en los ácidos grasos totales, se producen 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 preferible a menos del 4%, 3%, 2% o 1%. Los ésteres de ácidos grasos o mezclas de ácidos grasos producidos por el proceso de acuerdo con la invención comprenden ventajosamente menos de 0.1%, con base en los ácidos grasos totales, o sin ácido butírico, sin colesterol, sin ácido clupanodónico (= ácido docosapentaenoico, C₂₂:5^{Δ4,8,12,15,21}) y sin ácido nisínico, C₂₃:6^{Δ3,8,12,15,18,21}).

Debido a las secuencias de ácidos nucleicos de la invención, o las secuencias de ácidos nucleicos utilizadas en el proceso de acuerdo con la invención, un aumento en el rendimiento de ácidos grasos poliinsaturados de por lo menos 50%, ventajosamente de por lo menos 80%, especialmente ventajosamente de por lo menos 100%, muy especialmente ventajosamente de por lo menos 150%, en comparación con el organismo de partida no transgénico, por ejemplo una levadura, un alga, un hongo o una planta tal como Arabidopsis o linaza se pueden obtener en una comparación mediante análisis GC.

Los ácidos grasos poliinsaturados químicamente puros o composiciones de ácidos grasos también se pueden preparar mediante los procesos descritos anteriormente. Para este fin, los ácidos grasos o composiciones de ácidos grasos se aíslan a partir del organismo, tal como los microorganismos o plantas o medio de cultivo en o sobre el cual se han cultivado los organismos, o desde el organismo y el medio de cultivo, en una forma conocida, por ejemplo a través de la extracción, destilación, cristalización, cromatografía o combinaciones de estos métodos. Estos ácidos grasos químicamente puros o composiciones de ácidos grasos son ventajosas para las aplicaciones en el sector de la industria alimenticia, el sector de la industria cosmética y en especial el sector de la industria farmacológica.

En principio, todos los genes del ácido graso o metabolismo de los lípidos se pueden utilizar en el proceso para la producción de ácidos grasos poliinsaturados, ventajosamente en combinación con el polinucleótido(s) de la invención (para los propósitos de la presente solicitud, el plural se entiende como que abarca el singular y viceversa). Los genes del ácido graso o metabolismo de lípidos que se utilizan se seleccionan ventajosamente del grupo que consiste de acil-CoA deshidrogenasa, acil- ACP [= proteína portadora de acilo] desaturasa, acil- ACP tioesterasa, ácido graso aciltransferasa, acil-CoA: aciltransferasas lisofosfolípido, ácidos grasos sintasa, ácido graso hidroxilasa, acetil-coenzima A carboxilasa, acilcoenzima A, ácido graso desaturasa oxidasa, ácidos grasos acetilenasas, lipoxigenasas, triacilglicerol lipasas, sintasas de óxido de aleno, hidropéroxido liasas o ácido graso (s) elongasa. Se utilizan preferiblemente genes seleccionados del grupo de las Δ4-desaturasas, Δ5-desaturasas, Δ6-desaturasas, Δ8-desaturasas, Δ9-desaturasas, Δ12-desaturasas, Δ15-desaturasas, Δ12- y Δ15- desaturasas, ω3-desaturasas, Δ6-elongasas, Δ9-elongasas o Δ5-elongasas en combinación con los polinucleótidos de acuerdo con la invención, es posible utilizar los genes individuales o una pluralidad de genes en combinación. Para combinaciones de genes especialmente preferidas, se hace referencia aquí a las tablas 5 y 6, que se muestran en los ejemplos.

Ventajosamente, las desaturasas utilizadas en el proceso de acuerdo con la invención convierten sus respectivos sustratos en forma de ésteres de ácidos grasos-CoA: Si se precede por una etapa de elongación, esto ventajosamente da como resultado un aumento de rendimiento del producto. Por lo tanto los respectivos productos de desaturación se sintetizan en cantidades mayores, puesto que la etapa de elongación se lleva a cabo usualmente con los ésteres de ácidos grasos-CoA, mientras que la etapa de desaturación se lleva a cabo predominantemente

con los fosfolípidos o los triglicéridos. Por lo tanto, no es necesaria una reacción de sustitución entre los ésteres de ácidos grasos - CoA y los fosfolípidos o triglicéridos, lo que requeriría limitando posiblemente una reacción de enzima adicional.

Debido a la actividad enzimática de los polipéptidos utilizados en el proceso de acuerdo con la invención, se puede producir un amplio rango de ácidos grasos poliinsaturados en el proceso de acuerdo con la invención. Dependiendo de la elección de los organismos, tales como las plantas preferidas, utilizadas para el proceso de acuerdo con la invención, se pueden producir mezclas de diversos ácidos grasos poliinsaturados o ácidos grasos poliinsaturados individuales, tales como EPA o ARA, en forma libre o de enlace. Dependiendo de la composición de ácido graso predominante en la planta de partida (ácidos grasos C18:2- o C18:3-), los ácidos grasos que se derivan de ácidos grasos C18:2-, tales como GLA, DGLA o ARA, o ácidos grasos que se derivan de ácidos grasos C18:3-, tales como SDA, ETA o EPA, se obtienen de esta manera. Si solo está presente el ácido linoleico (= LA, C18:2^{Δ9,12}) como ácido graso insaturado en la planta utilizada para el proceso, este solo puede producir GLA, DGLA y ARA como productos, todos los cuales están presentes como ácidos grasos libres o en forma de enlace. Si solo está presente el ácido α-linolénico (= ALA, C18:3^{Δ9,12,15}) como ácido graso insaturado en la planta utilizada para el proceso, el proceso solo puede producir SDA, ETA, EPA y/o DHA como productos, todos los cuales pueden estar presentes como ácidos grasos en forma libre o de enlace, como se describió anteriormente. Debido a la modificación de la actividad de las enzimas Δ5-desaturasa, Δ6-desaturasa, Δ4-desaturasa, Δ12-desaturasa, Δ15-desaturasa, ω3-desaturasa, Δ5-elongasa y/o Δ6-elongasa que cumplen una función en la síntesis, es posible producir, en una forma objetivada, solo productos individuales en los organismos mencionados anteriormente, ventajosamente en las plantas mencionadas anteriormente. Debido a la actividad de Δ6-desaturasa y Δ6-elongasa, por ejemplo, se forman GLA y DGLA, o SDA y ETA, dependiendo de la planta de partida y ácido graso insaturado. Se forman preferiblemente DGLA o ETA o mezclas de estos. Si se introducen Δ5-desaturasa, Δ5-elongasa y Δ4-desaturasa adicionalmente en los organismos, ventajosamente en la planta, se forman adicionalmente ARA, EPA y/o DHA. Ventajosamente, solo se sintetizan ARA, EPA o DHA o mezclas de estos, dependiendo de los ácidos grasos presentes en el organismo, o en la planta, que actúa como sustancia de partida para la síntesis. En razón a que se involucran cascadas biosintéticas, los productos finales en cuestión no están presentes como sustancias puras en los organismos. Cantidades pequeñas de los compuestos precursores siempre están presentes adicionalmente en el producto final. Estas cantidades pequeñas ascienden a menos de 20% en peso, ventajosamente menos de 15% en peso, especialmente ventajosamente menos de 10% en peso, most ventajosamente menos de 5, 4, 3, 2 o 1% en peso, con base en el producto final DGLA, ETA o sus mezclas, o ARA, EPA, DHA o sus mezclas, ventajosamente EPA o DHA o sus mezclas.

Además de la producción, directamente en el organismo, de los ácidos grasos de partida para los polipéptidos utilizados en el proceso de la invención, los ácidos grasos también se pueden cargar externamente. Se prefiere la producción en el organismo por razones de economía. Los sustratos preferidos son ácido linoleico (C18:2^{Δ9,12}), ácido γ-linolénico (C18:3^{Δ6,9,12}), ácido eicosadienoico (C20:2^{Δ11,14}), ácido dihomo-γ-linolénico (C20:3^{Δ8,11,14}), ácido araquidónico (C20:4^{Δ5,8,11,14}), ácido docosatetraenoico (C22:4^{Δ7,10,13,16}) y ácido docosapentaenoico (C22:5^{Δ4,7,10,13,15}).

Para aumentar el rendimiento en el proceso descrito para la producción de aceites y/o triglicéridos con un contenido ventajosamente elevado de ácidos grasos poliinsaturados, es ventajoso para aumentar la cantidad de producto de partida para la síntesis de ácidos grasos; esto se puede lograr por ejemplo al introducir, en el organismo, un ácido nucleico que codifica un polipéptido con una actividad Δ12-desaturasa y/o (15-desaturasa de acuerdo con la invención). Esto es particularmente ventajoso en organismos que producen aceite tales como aquellos de la familia Brassicaceae, tal como el género Brassica, por ejemplo colza; la familia der Elaeagnaceae, tal como el género Elaeagnus, por ejemplo el género y especie Olea europaea, o la familia Fabaceae, tal como el género Glycine, por ejemplo el género y especie Glycine max, que tienen alto contenido en ácido oleico. En razón a que estos organismos tienen bajo contenido en ácido linoleico (Mikoklajczak et al., Journal of the American Oil Chemical Society, 38, 1961, 678 - 681), es ventajoso el uso de las Δ12-desaturasas y/o (15-desaturasas mencionadas anteriormente de acuerdo con la invención para producir el material de partida ácido linoleico.

El proceso de acuerdo con la invención ventajosamente emplea las secuencias de ácidos nucleicos anteriormente mencionadas o sus derivados o homólogos que codifican polipéptidos que retienen la actividad enzimática de las proteínas codificadas por secuencias de ácidos nucleicos. Estas secuencias, individualmente o en combinación con los polinucleótidos de acuerdo con la invención, se clonan en construcciones de expresión y utilizados para la introducción en, y expresión en, organismos. Debido a su construcción, estas construcciones de expresión hacen posible una síntesis óptima ventajosa de los ácidos grasos poliinsaturados producidos en el proceso de acuerdo con la invención.

En una realización preferida, el proceso adicionalmente comprende la etapa de obtener una célula o un organismo intacto que comprende las secuencias de ácidos nucleicos utilizadas en el proceso, donde se transforma la célula y/o el organismo con un polinucleótido de acuerdo con la invención, una construcción de un gen o un vector como se describe adelante, solo o en combinación con secuencias de ácidos nucleicos adicionales que codifican proteínas de los ácido graso o metabolismo de lípido. En una realización preferida adicional, este proceso adicionalmente comprende la etapa de obtener aceites, lípidos o ácidos grasos libres de los organismos o del cultivo. El cultivo, por

ejemplo, puede tomar la forma de un cultivo de fermentación, por ejemplo en el caso del cultivo de microorganismos, tales como, por ejemplo, *Mortierella*, *Thalassiosira*, *Mantoniella*, *Ostreococcus*, *Saccharomyces* o *Thraustochytrium*, o un cultivo que crece en un invernadero o campo de una planta. La célula o el organismo así producido es ventajosamente una célula de un organismo que produce aceite, tal como un cultivo de aceite, tal como, por ejemplo, maní, colza, canola, linaza, cáñamo, soya, cártamo, girasoles o borraja.

En el caso de las células de planta, tejido de planta u órganos de planta, se entiende que “crecimiento” significa, por ejemplo, en el cultivo sobre o en un medio nutriente, o de la planta intacta sobre o en un sustrato, por ejemplo, en un cultivo hidropónico, compuesto para macetas o en tierra arable.

Los organismos o células anfitrionas adecuadas para el procedimiento de acuerdo con la invención son aquellos que son capaces de sintetizar ácidos grasos, ácidos grasos insaturados específicamente, y/o que son adecuados para la expresión de genes recombinantes. Los Ejemplos que se pueden mencionar son plantas tales como *Arabidopsis*, *Asteraceae*, tales como *Caléndula* o plantas de cultivo como soja, cacahuete, planta de aceite de ricino, girasol, maíz, algodón, lino, colza, coco, aceite de palma, cártamo (*Carthamus tinctorius*) o grano de cacao, microorganismos, tales como los hongos, por ejemplo, el género *Mortierella*, *Thraustochytrium*, *Saprolegnia*, *Phytophthora* o *Pythium*, bacterias, tales como el género *Escherichia* o *Shewanella*, levaduras, tales como el género *Saccharomyces*, cianobacterias, ciliados, algas tales como *Mantoniella* o *Ostreococcus*, o protozoos tales como dinoflagelados, tales como *Thalassiosira* o *Cryptocodinium*. Los organismos preferidos son aquellos que son naturalmente capaces de sintetizar cantidades sustanciales de aceite, tales como hongos, tales como *Mortierella alpina*, *Pythium insidiosum*, *Phytophthora infestans*, o plantas tales como soja, colza, coco, aceite de palma, cártamo, lino, cáñamo, planta de aceite de ricino, *caléndula*, maní, cacao, frijol o girasol, o levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae*, se prefieren especialmente soja, lino, colza, cártamo, girasol, *caléndula*, *Mortierella* o *Saccharomyces cerevisiae*. En principio, adecuados como organismos anfitriones también están, además de los organismos transgénicos anteriormente mencionados, animales transgénicos, ventajosamente animales no humanos, por ejemplo, *Caenorhabditis elegans*. Además adicionalmente células anfitrionas adecuadas y organismos ya se han descrito ampliamente anteriormente.

Las plantas transgénicas que comprenden los ácidos grasos poliinsaturados sintetizados en el proceso de acuerdo con la invención ventajosamente se pueden comercializar directamente sin que sea necesario aislar los aceites, lípidos o ácidos grasos sintetizados. Las plantas para el proceso de acuerdo con la invención se enumeran en el sentido de plantas intactas y todas las partes de plantas, órganos de plantas o partes de plantas tales como hojas, tallos, semillas, raíces, tubérculos, anteras, fibras, pelos de las raíces, vástagos, embriones, callos, cotiledones, pecíolos, material cosechado, tejido de planta, tejido reproductor y cultivos celulares que se derivan de la planta transgénica y/o se pueden utilizar para producir la planta transgénica. En este contexto, la semilla comprende todas las partes de la semilla, tales como las cubiertas de semillas, células epidérmicas, células del endospermo de semillas, o tejido embrionario. Sin embargo, los compuestos producidos en el proceso de acuerdo con la invención también se pueden aislar de los organismos, ventajosamente plantas, en forma de sus aceites, grasas, lípidos y/o ácidos grasos libres. Los ácidos grasos poliinsaturados producidos por este proceso se pueden obtener a través de la cosecha de los organismos, ya sea desde el cultivo en el que crecen, o desde el campo. Esto se puede hacer a través de prensado o extracción de partes de la planta, preferiblemente de las semillas de la planta. En este contexto, los aceites, grasas, lípidos y/o ácidos grasos libres se pueden obtener a través de prensado por lo que se conoce como prensado en frío batido en frío y sin la aplicación de calor. Para permitir una mayor facilidad de rotura de las partes de la planta, específicamente las semillas, que son previamente trituradas, vaporizadas u horneadas. Las semillas que se han tratado previamente de esta manera posteriormente se pueden presionar o extraer con solvente, tal como hexano caliente. El solvente se elimina posteriormente. En el caso de microorganismos, estos últimos, después de cosechar, por ejemplo, se extrae directamente sin etapas de procesamiento adicionales o de lo contrario, después de la interrupción, se extrae a través de diversos métodos con los que el experto está familiarizado. De esta manera, se puede aislar más del 96% de los compuestos producidos en el proceso. A partir de entonces, los productos resultantes se procesan adicionalmente, es decir se refinan. En este proceso, por ejemplo, se eliminan primero los mucílagos de plantas y materias en suspensión. Se puede efectuar lo que se conoce como deslamado enzimáticamente o, por ejemplo, químico-físicamente mediante la adición de ácido, tal como ácido fosfórico. A partir de entonces, se eliminan los ácidos grasos libres mediante tratamiento con una base, por ejemplo una solución de hidróxido de sodio. El producto resultante se lava a fondo con agua para eliminar el álcali restante en el producto y luego se seca. Para eliminar los pigmentos restantes en el producto, los productos se someten a la decoloración, por ejemplo, utilizando tierra de batán o carbón activo. Al final, el producto se desodoriza, por ejemplo, utilizando vapor.

Los PUFA o LCPUFAS producidos por este proceso son preferiblemente moléculas de ácidos grasos C_{18} , C_{20} o C_{22} , ventajosamente moléculas de ácidos grasos C_{20} o C_{22} , con al menos dos enlaces dobles en la molécula de ácido graso, preferiblemente tres, cuatro, cinco o seis dobles enlaces. Estas moléculas de ácidos grasos C_{18} , C_{20} o C_{22} se pueden aislar a partir del organismo en forma de un aceite, lípido o ácido graso libre. Los organismos adecuados son, por ejemplo, los mencionados anteriormente. Los organismos preferidos son plantas transgénicas.

Por lo tanto, una realización de la invención es aceites, lípidos o ácidos grasos o fracciones de los mismos que se han producido mediante el proceso anteriormente descrito, especialmente preferiblemente aceite, lípido o una composición de ácido graso que comprende PUFAs y que se deriva de las plantas transgénicas.

Estos aceites, lípidos o composiciones de ácidos grasos comprenden preferiblemente los ácidos grasos anteriormente mencionados, en particular preferiblemente en la concentración mencionada anteriormente. En una realización de la invención, los aceites, lípidos o composiciones de ácidos grasos obtenidos por los métodos de acuerdo con la invención se distinguen por el hecho de que las preparaciones que comprenden dichos aceites, lípidos o composiciones de ácidos grasos contienen trazas de los ácidos nucleicos de acuerdo con la invención. Se pueden detectar estas trazas mediante métodos de detección altamente sensibles adecuados, por ejemplo, tecnologías con base en PCR.

Una realización adicional de acuerdo con la invención es el uso del aceite, los lípidos, ácidos grasos y/o la composición de ácido graso en alimentos para animales, productos alimenticios, cosméticos o productos farmacéuticos. Los aceites, lípidos, ácidos grasos o mezclas de ácidos grasos de acuerdo con la invención se pueden utilizar en la manera con la que el experto está familiarizado para mezclar con otros aceites, lípidos, ácidos grasos o mezclas de ácidos grasos de origen animal, tales como, por ejemplo, aceites de pescado. Se pueden utilizar estos aceites, lípidos, ácidos grasos o mezclas de ácidos grasos, que se componen de constituyentes de origen animal y vegetal, también para la preparación de alimentos para animales, productos alimenticios, cosméticos o productos farmacéuticos.

Se entiende que el término "aceite", "lípidos" o "grasas" significa una mezcla de ácidos grasos que comprende ácidos grasos insaturados, saturados, preferiblemente esterificados. El aceite, lípido o grasa tiene preferiblemente alto contenido de ácido graso libre o esterificado, ventajosamente, poli-insaturado, en particular aquellos mencionados anteriormente. La cantidad de ácidos grasos insaturados esterificados asciende preferiblemente a aproximadamente 30%, se prefiere más un contenido de 50%, se prefiere aún más un contenido de 60%, 70%, 80% o más. Para el análisis, el contenido de ácido graso, por ejemplo, se puede determinar mediante cromatografía de gases después de convertir los ácidos grasos en los ésteres de metilo mediante transesterificación. El aceite, lípido o grasa pueden comprender diversos otros ácidos grasos saturados o insaturados, por ejemplo ácido calendúlico, ácido palmítico, ácido palmitoleico, ácido esteárico, ácido oleico, y similares. El contenido de los diferentes ácidos grasos en el aceite o la grasa puede variar, en particular, dependiendo del organismo de partida.

Los ácidos grasos poliinsaturados con ventajosamente por lo menos dos enlaces dobles que se producen en el proceso son, como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, esfingolípidos, fosfoglicéridos, lípidos, glicolípidos, fosfolípidos, monoacilglicerol, diacilglicerol, triglicéridos u otros ésteres de ácidos grasos.

A partir de los ácidos grasos poliinsaturados con ventajosamente por lo menos cinco o seis enlaces dobles, ácidos que han sido preparados en el proceso de acuerdo con la invención, los ácidos grasos poliinsaturados que están presentes se pueden liberar por ejemplo, mediante tratamiento con álcali, por ejemplo KOH o NaOH acuoso, o hidrólisis ácida, ventajosamente en presencia de un alcohol tal como metanol o etanol, o por medio de división enzimática, y aislar a través de, por ejemplo, separación de fases y posterior acidificación a través de, por ejemplo, H₂SO₄. También se pueden liberar los ácidos grasos directamente sin la etapa de procesamiento descrita anteriormente.

Después de su introducción en un organismo, de manera ventajosa una célula de planta o planta, los ácidos nucleicos utilizados en el proceso o bien pueden estar presente en un plásmido separado o, ventajosamente, integrados en el genoma de la célula anfitriona. En el caso de la integración en el genoma, la integración puede ser aleatoria o de lo contrario se efectúa mediante recombinación de tal manera que el gen nativo se reemplaza por la copia introducida, mediante la cual se modula la producción del compuesto deseado por la célula, o mediante el uso de un gen en "trans", de modo que el gen está ligado operativamente con una unidad de expresión funcional que comprende por lo menos una secuencia que asegura la expresión de un gen y al menos una secuencia que asegura la poliadenilación de un gen transcrito funcionalmente. Los ácidos nucleicos se introducen ventajosamente en los organismos a través de casetes multiexpresión o construcciones para expresión multiparalela, ventajosamente en las plantas para expresión específica a semillas multiparalela de genes.

Los musgos y algas son solo los sistemas de planta conocidos que producen cantidades sustanciales de ácidos grasos poliinsaturados tales como ácido araquidónico (ARA) y/o ácido eicosapentaenoico (EPA) y/o ácido docosahexaenoico (DHA). Los musgos comprenden PUFA en los lípidos de membrana, mientras que las algas, los organismos que están relacionados con las algas y algunos hongos también acumulan cantidades sustanciales de PUFA en la fracción de triacilglicerol. Esto es el que las moléculas de ácido nucleico que se aíslan de dichas cepas también acumulan PUFA en la fracción de triacilglicerol que son particularmente ventajosos para el procedimiento de acuerdo con la invención y por lo tanto para la modificación del sistema de producción de lípidos y de PUFA en un anfitrión, en particular plantas tales como cultivos oleaginosos, por ejemplo colza, canola, linaza, cáñamo, soja, girasol y borraja. Por lo tanto, pueden ser utilizados ventajosamente en el procedimiento de acuerdo con la invención.

Los sustratos que son adecuados para los polipéptidos de acuerdo con la invención del ácido graso o el metabolismo de lípidos se seleccionan del grupo de acil-CoA deshidrogenasa, acil- ACP [= proteína portadora de acilo] desaturasa, acil- ACP tioesterasa, ácido graso aciltransferasa, acil-CoA: aciltransferasa(s) lisofosfolípido, ácido graso sintasa, ácido graso hidroxilasa, acetil - coenzima A carboxilasa, acil- coenzima A oxidasa, ácido graso desaturasa, ácido graso acetilasa, lipoxigenasa, triacilglicerol lipasa, óxido de aleno sintasa, hidroperóxido liasa (s) o ácido graso elongasa son preferiblemente de ácidos grasos C₁₆, C₁₈ o C₂₀. Los ácidos grasos como sustratos convertidos en el proceso se convierten preferiblemente en la forma de sus ésteres de acil- CoA reductasa y/o sus ésteres de fosfolípidos.

Para producir los PUFA de cadena larga de acuerdo con la invención, los ácidos grasos poliinsaturados C₁₈ primero se deben desaturar por la actividad enzimática de una desaturasa y, posteriormente, se alargan mediante por lo menos dos átomos de carbono a través de una elongasa. Después de un ciclo de elongación, esta actividad enzimática da ácidos grasos C₂₀ y después de dos ciclos de elongación ácidos grasos C₂₂. La actividad de las desaturasas y elongasas utilizadas en los procesos de acuerdo con la invención llevan preferiblemente a ácidos grasos C₁₈ C₂₀ y/o C₂₂, de manera ventajosa con por lo menos dos enlaces dobles en la molécula de ácido graso, preferiblemente con tres, cuatro, cinco o seis enlaces dobles, especialmente preferiblemente con ácidos grasos C₂₀ y/o C₂₂ por lo menos dos enlaces dobles en la molécula de ácido graso, preferiblemente con tres, cuatro, cinco o seis enlaces dobles, muy especialmente preferiblemente con cinco o seis enlaces dobles en la molécula. Después de una primera desaturación y tiene lugar la elongación, las etapas de desaturación y elongación adicionales tales como, por ejemplo, puede tener lugar una desaturación en las posiciones Δ5 y Δ4. Los productos del procedimiento de acuerdo con la invención que se prefieren especialmente son ácido dihomo-γ-linolénico, ácido araquidónico, ácido eicosapentaenoico, ácido docosapentaenoico y/o ácido docosahexaenoico. Los ácidos grasos C₂₀ con por lo menos dos enlaces dobles en el ácido graso se pueden desaturar por la actividad enzimática de acuerdo con la invención en forma del ácido graso libre o en la forma de los ésteres, tales como fosfolípidos, glicolípidos, esfingolípidos, fosfogliceridos, monoacilglicerol, diacilglicerol o triglicéridos.

El sitio de biosíntesis preferido de ácidos grasos, aceites, lípidos o grasas en las plantas que se utilizan ventajosamente es, por ejemplo, en general la semilla o estratos de célula de la semilla, de tal manera que es sensible la expresión específica de la semilla de los ácidos nucleicos utilizados en el proceso. Sin embargo, es obvio que la biosíntesis de ácidos grasos, aceites o lípidos no necesita limitarse al tejido de semillas, sino que también puede tener lugar en una forma específica a tejido en todas las otras partes de la planta - por ejemplo, en células de la epidermis o en los tubérculos.

Si los microorganismos tales como levaduras, tales como *Saccharomyces* o *Schizosaccharomyces*, hongos tales como *Mortierella*, *Aspergillus*, *Phytophthora*, *Entomophthora*, *Mucor* o *Thraustochytrium*, algas tales como *Isochrysis*, *Mantoniella*, *Ostreococcus*, *Phaeodactylum* o *Cryptocodinium* se utilizan como organismos en el proceso de acuerdo a la invención, estos organismos se hacen crecer ventajosamente en cultivos de fermentación. Debido al uso de ácidos nucleicos de acuerdo con la invención que codifican una desaturasa, los ácidos grasos poliinsaturados producidos en el proceso se pueden aumentar por lo menos en 5%, preferiblemente mediante por lo menos 10%, especialmente preferiblemente mediante por lo menos 20%, muy especialmente preferiblemente mediante por lo menos 50% en comparación con el tipo silvestre de los organismos que no comprenden recombinantemente ácidos nucleicos.

En principio, los ácidos grasos poliinsaturados producidos por el proceso de acuerdo con la invención en los organismos utilizados en el proceso se puede aumentar de dos maneras diferentes. Ventajosamente, se puede ampliar el grupo de ácidos libres grasos poliinsaturados y/o el contenido de los ácidos grasos poliinsaturados esterificados producido a través del proceso. Ventajosamente, se amplía el grupo de ácidos grasos poliinsaturados esterificados en los organismos transgénicos mediante el proceso de acuerdo con la invención.

Si se utilizan microorganismos como organismos en el proceso de acuerdo con la invención, se producen o se hacen crecer de una manera con la cual el experto está familiarizado, dependiendo del organismo anfitrión. Como regla, los microorganismos se hacen crecer en un medio líquido que comprende una fuente de carbono, usualmente en la forma de azúcares, una fuente de nitrógeno, usualmente en la forma de fuentes de nitrógeno orgánicas tales como extracto de levadura o sales tales como sulfato amónico, oligoelementos tales como sales de hierro, manganeso y magnesio, y, si es apropiado, vitaminas, a temperaturas de entre 0° C y 100° C, preferiblemente entre 10° C y 60° C, mientras que se introduce gas oxígeno. El pH del líquido nutriente se puede o no mantener constante, es decir regulado durante el periodo de cultivo. Los cultivos se pueden hacer crecer en forma de tanda, forma de semitanda o continuamente. Los nutrientes se pueden proporcionar al inicio de la fermentación o cargar semicontinualmente o continuamente. Se pueden aislar los ácidos grasos poliinsaturados producidos de los organismos como se ha descrito anteriormente mediante procedimientos conocidos por el experto, por ejemplo mediante extracción, destilación, cristalización, si es apropiado, precipitación con sal, y/o cromatografía. Para este fin, los organismos se pueden descomponer ventajosamente con anterioridad.

Si los organismos anfitriones son microorganismos, el procedimiento de acuerdo con la invención se lleva a cabo ventajosamente a una temperatura de entre 0° C y 95° C, preferiblemente entre 10° C y 85° C, especialmente preferiblemente entre 15° C y 75° C, muy especial y preferiblemente entre 15° C y 45° C.

5 En este proceso, el valor de pH se mantiene ventajosamente entre pH 4 y 12, preferiblemente entre pH 6 y 9, especialmente preferiblemente entre pH 7 y 8.

10 El proceso de acuerdo con la invención se puede operar en forma de tanda, semitanda o continuamente. Una visión general de los métodos de cultivo conocidos se puede encontrar en el libro de texto de Chmiel (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik [Bioprocess technology 1. Introduction to bioprocess technology] (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) o en el libro de texto por Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen [Bioreactors y peripheral equipment] (Vieweg Verlag, Brunswick/Wiesbaden, 1994)).

El medio de cultivo que se va a utilizar debe satisfacer adecuadamente las necesidades de las cepas en cuestión. Se pueden encontrar descripciones de medios de cultivo para diversos microorganismos que en el libro Manual of Methods for General Bacteriology" of the American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981).

15 Como se describió anteriormente, estos medios que se pueden emplear de acuerdo con la invención generalmente comprenden una o más fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, sales inorgánicas, vitaminas y/u oligoelementos.

20 Las fuentes de carbono preferidas son azúcares, tales como mono-, di - o polisacáridos. Ejemplos de muy buenas fuentes de carbono son glucosa, fructosa, manosa, galactosa, ribosa, sorbosa, ribulosa, lactosa, maltosa, sacarosa, rafinosa, almidón o celulosa. Los azúcares también se pueden agregar a los medios a través de compuestos complejos tales como melazas u otros subproductos de la refinación de azúcar. También puede ser ventajosa la adición de mezclas de una variedad de fuentes de carbono. Otras posibles fuentes de carbono son aceites y grasas tales como, por ejemplo, aceite de soja, aceite de girasol, aceite de cacahuete y/o grasa de coco, ácidos grasos tales como, por ejemplo, alcoholes de ácidos palmítico, el ácido esteárico y/o ácido linoleico, y/o polialcoholes tales como, por ejemplo, glicerol, metanol y/o etanol, y/o ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido acético y/o ácido láctico.

25 Las fuentes de nitrógeno son usualmente compuestos o materiales nitrogenados orgánicos o inorgánicos que comprenden estos compuestos. Ejemplos de fuentes de nitrógeno comprenden amoníaco en forma líquida o gaseosa, sales de amonio tales como sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio o nitrato de amonio, nitratos, urea, aminoácidos o fuentes de nitrógeno complejas tales como licor de macerado de maíz, harina de soja, proteína de soja, extracto de levadura, extracto de carne y otros. Se pueden utilizar las fuentes de nitrógeno individualmente o como una mezcla.

Los compuestos de sales inorgánicas que pueden estar presentes en los medios comprenden las sales de cloruro, fósforo y sulfato de calcio, magnesio, sodio, cobalto, molibdeno, potasio, manganeso, zinc, cobre y hierro.

35 Los compuestos inorgánicos que contienen azufre tales como, por ejemplo, sulfatos, sulfitos, ditionitos, tetrationsatos, tiosulfatos, sulfuros, o de otro modo compuestos de azufre orgánicos, tales como mercaptanos y tioles se pueden utilizar como fuentes de azufre para la producción de productos químicos finos que contienen azufre, en particular de metionina.

Se pueden utilizar ácido fosfórico, fosfato de dihidrógeno potasio o fosfato hidrógeno de dipotasio o sales que contienen sodio correspondientes como fuentes de fósforo.

40 Se pueden agregar agentes quelantes al medio con el fin de mantener los iones metálicos en solución. Agentes quelantes particularmente adecuados comprenden dihidroxifenoles tales como catecol o protocatecuato y ácidos orgánicos tales como ácido cítrico.

45 Los medios de fermentación utilizados de acuerdo con la invención para el cultivo de microorganismos usualmente también comprenden otros factores de crecimiento, tales como vitaminas o promotores del crecimiento, que incluyen, por ejemplo, biotina, riboflavina, tiamina, ácido fólico, ácido nicotínico, pantotenato y piridoxina. Los factores de crecimiento y las sales se derivan con frecuencia de componentes de medios complejos tales como extracto de levadura, melazas, licor de macerado de maíz y similares. Más aún es posible agregar precursores adecuados al medio de cultivo. La composición exacta de los compuestos del medio depende en gran medida de la experiencia particular y se decide individualmente para cada caso específico. Se puede encontrar información sobre la optimización del medio en el libro de texto "Applied Microbiol. Physiology, A Practical Approach" (Editors P.M. Rhodes, P.F. Stanbury, IRL Press (1997) pp. 53-73, ISBN 0 19 963577 3). También se puede obtener el medio de crecimiento de proveedores comerciales, por ejemplo Estándar 1 (Merck) o BHI (infusión de cerebro y corazón, DIFCO) y similares.

Todos los componentes de los medios se esterilizan, ya sea mediante calor (20 min a 1.5 bar y 121° C) o por esterilización mediante filtración. Los componentes se pueden esterilizar ya sea juntos o, si se requiere, por separado. Todos los componentes de los medios pueden estar presentes al inicio del cultivo o se agregan continuamente o en forma de tanda, según se desee.

- 5 La temperatura de cultivo está normalmente entre 15° C y 45° C, preferiblemente de 25° C a 40° C, y se puede mantener constante o alterar durante el experimento. El pH del medio debe estar en el rango de 5 a 8.5, preferiblemente alrededor de 7.0. El pH para el cultivo se puede controlar durante el cultivo al agregar compuestos básicos tales como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, amoníaco y amoníaco acuoso o compuestos ácidos tales como ácido fosfórico o ácido sulfúrico. Se puede controlar la formación de espuma mediante el empleo de antiespumantes tales como, por ejemplo, ésteres de poliglicol de ácidos grasos. Para mantener la estabilidad de los plásmidos es posible agregar al medio sustancias adecuadas que tiene un efecto selectivo, por ejemplo antibiótico. Se mantienen las condiciones aeróbicas al introducir oxígeno o mezclas de gases que contienen oxígeno tales como, por ejemplo, aire ambiente, en el cultivo. La temperatura del cultivo es normalmente de 20° C a 45° C y preferiblemente 25° C a 40° C. El cultivo se continúa hasta que la formación del producto deseado está en un máximo. Este objetivo se alcanza normalmente dentro de 10 horas a 160 horas.

Los caldos de fermentación obtenidos de esta manera, en particular, aquellos que contienen ácidos grasos poliinsaturados, usualmente contienen una masa seca de 7.5 a 25% en peso.

- 20 El caldo de fermentación luego se puede procesar. La biomasa, de acuerdo con el requerimiento, se puede eliminar completa o parcialmente del caldo de fermentación mediante métodos de separación tales como, por ejemplo, centrifugación, filtración, decantación o una combinación de estos métodos o al dejar completamente en dicho caldo. Es ventajoso procesar la biomasa después de su separación.

- 25 Sin embargo, también se puede espesar o concentrar el caldo de fermentación sin separar células, utilizando métodos conocidos tales como, por ejemplo, con la ayuda de un evaporador rotatorio, evaporador de película delgada, evaporador de película descendente, por ósmosis inversa o por nanofiltración. Por último, se puede procesar este caldo de fermentación concentrado para obtener los ácidos grasos presentes en el mismo.

- 30 Los polinucleótidos o polipéptidos de la presente invención que están involucrados en el metabolismo de lípidos y ácidos grasos, cofactores PUFA y enzimas o en el transporte de compuestos lipófilos a través de las membranas se utilizan en el proceso de acuerdo con la invención para la modulación de la producción de PUFA en organismos transgénicos, ventajosamente en lantás, tales como maíz, trigo, centeno, avena, triticale, arroz, cebada, soja, cacahuete, algodón, especies de *Linum* tales como linaza o lino, especies de *Brassica*, tales como la colza, canola y nabina, pimienta, girasol, borraja, onagra y tagetes, plantas *Solanáceas* tales como patata, tabaco, berenjena y tomate, especies de *Vicia*, guisantes, yuca, alfalfa, plantas arbustivas (café, cacao, té), especies de *Salix*, árboles (aceite de palma, coco) y pastos perennes y cultivos de forraje, ya sea directamente (por ejemplo, cuando la sobreexpresión u optimización de una proteína de biosíntesis de ácido graso tiene un efecto delantero sobre el rendimiento, producción y/o eficiencia de la producción del ácido graso a partir de organismos modificados) y/o puede tener un efecto indirecto que no obstante conduce a un rendimiento mejorado, producción y/o eficiencia de producción de los PUFA o una reducción de compuestos no deseados (por ejemplo, cuando la modulación del metabolismo de los lípidos y ácidos grasos, cofactores y enzimas lleva a modificaciones del rendimiento, producción y/o eficiencia de la producción o la composición de los compuestos deseados dentro de las células, lo que, a su vez, pueden afectar la producción de uno o más ácidos grasos).

La combinación de diferentes moléculas precursoras y enzimas de biosíntesis lleva a la producción de diversas moléculas de ácidos grasos, lo cual tiene un efecto decisivo en la composición de lípidos, en razón a que los ácidos grasos poliinsaturados (=PUFA) no sólo se incorporan fácilmente en triacilglicerol sino también en los lípidos de membrana.

- 45 Las *Brassicaceae*, *Boraginaceae*, *Primulaceae*, o *Linaceae* son particularmente adecuadas para la producción de PUFAs, por ejemplo ácido estearidónico, ácido eicosapentaenoico y ácido docosahexaenoico. La linaza (*Linum usitatissimum*) es especialmente ventajosamente adecuada para la producción de PUFA con las secuencias de ácidos nucleicos de acuerdo con la invención, ventajosamente, como se ha descrito, en combinación con otras desaturasas y elongasas.

- 50 La síntesis de lípidos se puede dividir en dos secciones: la síntesis de ácidos grasos y su unión a sn-glicerol-3 -fosfato, y la adición o modificación de un grupo de cabeza polar. Los lípidos habituales que se utilizan en las membranas comprenden fosfolípidos, glicolípidos, esfingolípidos y fosfoglicéridos. La síntesis de ácido graso comienza con la conversión de acetil-CoA en malonil-CoA mediante la acetil-CoA carboxilasa o en acetil-ACP mediante acetil transacilasa. Después de una reacción de condensación, estas dos moléculas de producto forman juntas acetoacetil-ACP, que se convierte a través de una serie de reacciones de condensación, reducción y deshidratación de tal manera que se obtiene una molécula de ácido graso saturado con la longitud de cadena

deseada. La producción de los ácidos grasos insaturados de estas moléculas se cataliza por desaturasas específicas, ya sea aeróbicamente por medio de oxígeno molecular o anaeróbicamente (con respecto a la síntesis de ácidos grasos en microorganismos, véase FC Neidhardt et al. (1996) *E. coli* and *Salmonella*. ASM Press: Washington, D.C., pp 612-636 y las referencias citadas en la misma; Lengeler et al. (Ed.) (1999) *Biology of Prokaryotes*. Thieme: Stuttgart, New York, y the references therein, y Magnuson, K., et al. (1993) *Microbiological Reviews* 57:522-542 y las referencias en la misma). Para experimentar las etapas de elongación adicionales, los ácidos grasos unidos a fosfolípidos resultantes se deben devolver al grupo éster CoA de ácidos grasos de los fosfolípidos. Para desaturación adicional como se describió anteriormente, el ácido graso se puede transferir de nuevo en el grupo fosfolípido. Si es apropiado, esta secuencia de reacción se puede atravesar repetidamente.

Ejemplos de precursores para la biosíntesis de PUFA son ácido oleico, ácido linoleico y ácido linolénico. Estos ácidos grasos de carbono C_{18} se deben alargar a C_{20} y C_{22} con el fin de obtener los ácidos grasos de la cadena tipo eicosa y docosa. Con la ayuda de las desaturasas utilizadas en el proceso, tales como la $\Delta 12$ -, $\Delta 15$ -, $\Delta 12$ - y $\Delta 15$ -, $\omega 3$ -, $\Delta 4$ -, $\Delta 5$ - y $\Delta 6$ - desaturasas y/o the $\Delta 5$ -, $\Delta 6$ -elongasas, ácido araquidónico, ácido eicosapentaenoico ácido docosapentaenoico o ácido docosahexaenoico, ácido eicosapentaenoico ventajosamente y/o ácido docosahexaenoico, se pueden producir y posteriormente emplear en diversas aplicaciones como productos alimenticios, comida para animales, cosméticos o productos farmacéuticos. Los ácidos grasos C_{20} y/o C_{22} con por lo menos dos, de manera ventajosa, por lo menos, tres, cuatro, cinco o seis, enlaces dobles en la molécula de ácido graso, preferiblemente ácidos grasos C_{20} o C_{22} ventajosamente con cuatro, cinco o seis enlaces dobles en la molécula de ácido graso, se pueden preparar utilizando las enzimas mencionada anteriormente. La desaturación puede tener lugar antes o después de la elongación del ácido graso en cuestión. Esta es la razón por la que los productos de las actividades de desaturasa y de las etapas de desaturación y elongación adicionales que son posibles resultan en PUFAs preferidos con un alto grado de desaturación, que incluyen una elongación de ácidos grasos C_{20} o C_{22} adicionales, de ácidos grasos tales como ácido γ -linolénico, ácido dihomo- γ -linolénico ácido araquidónico, ácido estearidónico, ácido eicosatetraenoico o ácido eicosapentaenoico. Los sustratos de las desaturasas y elongasas utilizados en el proceso de acuerdo con la invención son ácidos grasos C_{16} , C_{18} o C_{20} tales como, por ejemplo, ácido linoleico, ácido γ -linolénico, ácido α -linolénico, ácido dihomo- γ -linolénico, ácido eicosatetraenoico o ácido estearidónico. Los sustratos preferidos son el ácido linoleico, el ácido γ -linolénico y/o ácido α -linolénico, ácido dihomo- γ -linolénico o ácido araquidónico, ácido eicosatetraenoico o ácido eicosapentaenoico. Los ácidos grasos C_{20} o C_{22} sintetizados con por lo menos dos, tres, cuatro, cinco o seis enlaces dobles en el ácido graso se obtienen en el proceso de acuerdo con la invención en forma del ácido graso libre o en la forma de sus ésteres, por ejemplo, en la forma de sus glicéridos.

Se entiende que el término "glicérido" significa un glicerol esterificado con uno, dos o tres radicales carboxilo (mono -, di-o triglicéridos). También se entiende "glicérido" significa una mezcla de diversos glicéridos. La mezcla de glicéridos o glicéridos puede comprender adiciones adicionales, por ejemplo, ácidos grasos libres, antioxidantes, proteínas, carbohidratos, vitaminas y/u otras sustancias.

Para los propósitos del proceso de acuerdo con la invención, se entiende adicionalmente que un "glicérido", significa derivados de glicerol. Además de los glicéridos de ácidos grasos anteriormente descritos, estos también incluyen glicero fosfolípidos y glicero glicolipidos. Los ejemplos preferidos que se pueden mencionar en este contexto son los glicero fosfolípidos tales como lecitina (fosfatidilcolina), cardiolipina, fosfatidilglicerol, fosfatidilserina y alquilacilglicero fosfolípidos.

Adicionalmente, los ácidos grasos posteriormente se deben trasladar a diversos sitios de modificación e incorporar a los lípidos de almacenamiento de triacilglicerol. Otra etapa importante en la síntesis de lípidos es la transferencia de ácidos grasos a los grupos de cabeza polares, por ejemplo mediante el ácido graso de glicerol aciltransferasa (véase Frentzen, 1998, *Lipid*, 100 (4-5):161-166). Para publicaciones sobre la biosíntesis de ácidos grasos de plantas y sobre la desaturación, el metabolismo de los lípidos y el transporte de membrana de compuestos lipídicos, por beta - oxidación, modificación de ácidos grasos y cofactores, almacenamiento de triglicéridos y montaje de triglicéridos, que incluyen las referencias allí, consulte los siguientes documentos: Kinney, 1997, *Genetic Engineering*, Ed.: JK Setlow, 19: 149-166; Ohlrogge and Browse, 1995, *Plant Cell* 7:957-970; Shanklin and Cahoon, 1998, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49:611-641; Voelker, 1996, *Genetic Engineering*, Ed.: JK Setlow, 18:111-13; Gerhardt, 1992, *Prog. Lipid R.* 31:397-417; Gühnemann-Schäfer & Kindl, 1995, *Biochim. Biophys Acta* 1256:181-186; Kunau et al., 1995, *Prog. Lipid Res.* 34:267-342; Stymne et al., 1993, in: *Biochemistry and Molecular Biology of Membrane and Storage Lipids of Plants*, Ed.: Murata and Somerville, Rockville, American Society of Plant Physiologists, 150-158, Murphy & Ross 1998, *Plant Journal*. 13(1):1-16.

Los PUFA producidos en el proceso son un grupo de moléculas que los animales superiores ya no son capaces de sintetizar y por lo tanto deben tomar, o que los animales superiores ya no son capaces de sintetizar por se mismos en cantidad suficiente y por lo tanto deben tomar cantidades adicionales, a pesar de que se pueden sintetizar fácilmente mediante otros organismos, tales como bacterias; por ejemplo, los gatos han perdido la capacidad de sintetizar el ácido araquidónico en el curso de la evolución.

Se entiende que los “fosfolípidos” para los propósitos de la invención significan fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol y/o fosfatidilinositol, ventajosamente fosfatidilcolina. Los términos “producción o productividad” son conocidos en la técnica y abarcan la concentración del producto de fermentación (compuestos de la fórmula I) que se forman dentro de un período específico de tiempo y en un volumen de fermentación específico (por ejemplo, kg de producto por hora por litro). También comprenden la productividad dentro de una célula de planta o una planta, es decir, el contenido de los ácidos grasos deseados producidos en el proceso en relación con el contenido de todos los ácidos grasos en la célula o de la planta. El término “eficiencia de producción” comprende el tiempo requerido para obtener una cantidad de producción específica (por ejemplo, el tiempo requerido por la célula para establecer un cierto índice de rendimiento de un producto químico fino). El término “rendimiento o producto/rendimiento de carbono” se conoce en la técnica y comprende la eficiencia de la conversión de la fuente de carbono en el producto (es decir, el producto químico fino). Esto se expresa usualmente, por ejemplo, como kg de producto por kg de fuente de carbono. Al aumentar el rendimiento o la producción del compuesto, la cantidad de las moléculas obtenidas de este compuesto, o de las moléculas adecuadas de este compuesto obtenidas, en una cantidad de cultivo específico durante un período especificado de tiempo se incrementa. Los términos “biosíntesis o ruta biosintética” se conocen en la técnica y comprenden la síntesis de un compuesto, preferiblemente un compuesto orgánico, mediante una célula a partir de intermedios, por ejemplo en un proceso de múltiples etapas y regulado fuertemente. Los términos “catabolismo o ruta catabólica” se conocen en la técnica y comprenden la división de un compuesto, preferiblemente de un compuesto orgánico, por una célula para dar catabolitos (en términos más generales, moléculas más pequeñas o menos complejas), por ejemplo, en un proceso de múltiples etapas y fuertemente regulado. El término “metabolismo” se conoce en la técnica y comprende la totalidad de las reacciones bioquímicas que tienen lugar en un organismo. El metabolismo de un determinado compuesto (por ejemplo el metabolismo de un ácido graso) comprende por lo tanto la totalidad de las rutas biosintéticas, rutas de modificación y rutas catabólicas de este compuesto en la célula que se relacionan con este compuesto.

Al emplear, en el proceso de acuerdo con la invención, los polinucleótidos de acuerdo con la invención y opcionalmente polinucleótidos adicionales que codifican las enzimas del metabolismo de ácidos grasos o lípidos es posible lograr diversos efectos ventajosos. Por lo tanto, es posible influir en el rendimiento, producción y/o eficiencia de producción de los ácidos grasos poliinsaturados en una planta, preferiblemente en una planta de cultivo de aceite, o en un microorganismo. El número o actividad de los polipéptidos o polinucleótidos de acuerdo con la invención se pueden aumentar, por lo que se producen grandes cantidades de productos génicos y en última instancia, grandes cantidades de los compuestos de la fórmula general I. También es posible que, una síntesis de novo en un organismo, en el que, antes se introdujo el gen en cuestión, hubiera estado ausente de la actividad y capacidad para biosintetizar los compuestos. Lo mismo se aplica análogamente a la combinación con desaturasas o elongasas o enzimas adicionales del metabolismo de ácido graso y de lípido. El uso de una variedad de secuencias divergentes, es decir, secuencias que difieren en el nivel de secuencia de ADN, también puede ser ventajoso en este contexto, o bien el uso de promotores de expresión génica que hace posible la expresión de un gen diferente en lo que se relaciona con la sincronización, por ejemplo, como una función del grado de madurez de una semilla o tejido que almacena aceite.

Al introducir, en un organismo, un polinucleótido de acuerdo con la invención solo o en combinación con otros genes en una célula, es posible no sólo aumentar el flujo de biosíntesis hacia el producto final, sino también aumentar, o crear de novo, la composición de triacilglicerol correspondiente. Igualmente, se puede aumentar el número o la actividad de otros genes que se requieren para la importación de nutrientes para la biosíntesis de uno o más ácidos grasos, aceites, lípidos polares y/o neutrales, de tal manera que se incrementa la concentración de estos precursores, cofactores o intermedios dentro de las células o dentro del compartimiento de almacenamiento, por lo que la capacidad de las células para producir los PUFA se mejora adicionalmente. Al optimizar la actividad, o aumentar el número, de uno o más polinucleótidos o polipéptidos de acuerdo con la invención que están involucrados en la biosíntesis de estos compuestos, o al destruir la actividad de uno o más genes que están implicados en la degradación de estos compuestos, puede ser posible aumentar el rendimiento, producción y/o eficiencia de producción de moléculas de ácidos grasos y lípidos a partir de organismos, en particular a partir de plantas. Los ácidos grasos obtenidos en el proceso son adecuados como materiales de partida para la síntesis química de otros productos de interés. Por ejemplo, se pueden utilizar para la preparación de productos farmacéuticos, productos alimenticios, comida para animales o cosméticos, ya sea solos o en combinación otros.

Se puede observar a partir de lo que se ha dicho anteriormente que la invención también se relaciona con un proceso para la preparación de una composición de aceite, lípidos o composición de ácidos grasos, que comprende las etapas del proceso de acuerdo con la invención y la etapa adicional de formular la sustancia como un aceite, lípido o composición de ácidos grasos.

En una realización preferida de este proceso, el aceite, lípidos o la composición de ácidos grasos se formula adicionalmente para dar un fármaco, producto cosmético, producto alimenticio, comida para animales, preferiblemente comida para peces, o un suplemento alimenticio.

Por último, la invención se relaciona con el principio de utilizar el polinucleótido, el vector, la célula anfitriona, el polipéptido o el organismo no humano transgénico de la presente invención para la producción de un aceite, lípido o

composición de ácidos grasos. Esta última entonces se debe emplear preferiblemente como fármaco, producto cosmético, producto alimenticio, comida para animales, preferiblemente comida para peces, o suplemento alimenticio.

- 5 El contenido de todas las referencias, solicitudes de patentes, patentes y solicitudes de patentes publicadas citadas en la presente solicitud de patente se incorpora mediante referencia a la respectiva descripción específica.

Figuras

Figura 1: Rutas biosintéticas para la producción de ácidos grasos de cadena larga poliinsaturados, tales como el ácido araquidónico (= ARA, $C_{20:4}^{\Delta 5,8,11,14}$), ácido eicosapentaenoico (= EPA, $C_{20:5}^{\Delta 5,8,11,14,17}$) o ácido docosahexaenoico (= DHA, $C_{22:6}^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$).

- 10 Figura 2: Determinación por cromatografía de gases de los ácidos grasos a partir de levaduras que se han transformado con el plásmido pYES (A) o Pyes-d15Des (CH) (B) y pYES-d15Des (Cy) (C), respectivamente.

Ejemplos

Ejemplo 1: Métodos de clonación generales

- 15 Los métodos de clonación, tales como, por ejemplo, divisiones de restricción, electroforesis en gel de agarosa, purificación de fragmentos de ADN, transferencia de ácidos nucleicos a nitrocelulosa y membranas de nylon, ligado de fragmentos de ADN, transformación de células de *Escherichia coli*, cultivos bacterianos y secuenciación de ADN recombinante se realizan como se describe por Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6).

Ejemplo 2: Análisis de la secuencia de ADN recombinante

- 20 Las moléculas de ADN recombinantes se secuencian con un secuenciador de ADN con láser de fluorescencia ABI por el método de Sanger (Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467). Los fragmentos obtenidos mediante reacción en cadena de polimerasa se secuencian y se verifican para evitar errores de polimerasa en construcciones que se van a expresar.

Ejemplo 3: Extracción de lípidos a partir de levaduras

- 25 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 por el crecimiento de los microorganismos modificados o la planta modificada bajo condiciones adecuadas (tales como aquellas descritas anteriormente) y analizar el medio y/o los componentes celulares para la producción elevada del producto deseado (es decir, de lípidos o un ácido graso). Estas técnicas analíticas son conocidas por el experto y comprenden espectroscopía, cromatografía de capa fina, diversos tipos de métodos de tinción, métodos enzimáticos y microbiológicos y cromatografía analítica tal como cromatografía líquida de alto desempeño (véase, por ejemplo, Ullman, Encyclopedia of Industrial Chemistry, Vol. A2, p. 89-90 and 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., and Cabral, J.M.S. (1992) Recovery processes for biological Materials, John Wiley and Sons; Shaeiwitz, J.A., and 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).
- 30
- 35

- Además de los procesos anteriormente mencionados, los lípidos se extraen de plantas a partir de material de planta tal 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. El análisis cualitativo y cuantitativo de los lípidos o ácidos grasos se describe en 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.
- 40
- 45

- Además de medir el producto final de la fermentación, también es posible analizar otros componentes de las rutas metabólicas que se utilizan para la producción del compuesto deseado, tales como productos intermedios y subproductos, con el fin de determinar la eficiencia de producción completa del compuesto. Los métodos de análisis comprenden medir la cantidad de nutrientes en el medio (por ejemplo, azúcares, hidrocarburos, fuentes de nitrógeno, fosfato y otros iones), medir la composición de biomasa y crecimiento, el análisis de la producción de metabolitos convencionales de las rutas de biosíntesis y medir los gases que se generan durante la fermentación.
- 50

Los métodos estándar para estas mediciones se describen en Applied Microbial Physiology; A Practical Approach, P.M. Rhodes y P.F. Stanbury, Ed., IRL Press, p. 103-129; 131-163 y 165-192 (ISBN: 0199635773) y las referencias citadas en la misma.

Un ejemplo es el análisis de los ácidos grasos (abreviaturas FAME: ésteres metílicos de ácidos grasos, GC- MS, cromatografía/espectrometría de masa líquida del gas; TAG, triacilglicerol, TLC, cromatografía en capa fina).

La prueba inequívoca de la presencia de productos de ácido graso se puede obtener al analizar los organismos recombinantes mediante métodos analíticos estándar: GC, GC-MS o TLC, como se describió en diversas ocasiones por Christie y las referencias en la misma (1997, en: Advances on Lipid Methodology, Fourth Edition: Christie, Oily Press, Dundee, 119-169; 1998, Gaschromatographie- Massenspektrometrie-Verfahren [Gas chromatography/mass spectrometry methods], Lipide 33: 343-353).

El material que se va a analizar se puede descomponer mediante sonicación, molienda en un molino de vidrio, nitrógeno líquido y molienda o por medio de otros métodos aplicables. Después de la descomposición, el material se debe centrifugar. El sedimento se resuspende en agua destilada, se calienta durante 10 minutos a 100° C, se enfría en hielo y se centrifuga de nuevo, seguido de la extracción durante una hora a 90° C en ácido sulfúrico 0.5 M en metanol con 2% de dimetoxipropano, que lleva a aceite hidrolizado y compuestos lipídicos, que dan lípidos transmetilados. Estos ésteres de metilo de ácidos grasos se extraen en éter de petróleo y finalmente se someten a un análisis GC utilizando una columna capilar (Chrompack, WCOT Fused Silica, CP -Wax CB-52, 25 micrómetros, 0.32 mm) a un gradiente de temperatura de entre 170° C y 240° C durante 20 minutos y 5 minutos a 240° C. La identidad de los ésteres de metilo de ácidos grasos resultantes se debe definir utilizando estándares que están disponibles de fuentes comerciales (es decir, Sigma).

Ejemplo 4: Clonación de genes de desaturasas

El hongo Mycocentrospora acerina se hace crecer durante cinco días a 25° C en 50 ml de medio líquido (3 g/l de extracto de levadura, 3 g/l de extracto de malta, 3 g/l de peptona, 10 g/l de glucosa, 0.68 g/l de K₂HPO₄ pH 6,0) en un agitador a 200 rpm. Después las células se cosechan mediante centrifugación a 2000 x g, 5 min, 4° C, se obtienen 2 g de sedimento celular. El sedimento se lava 3 veces con agua destilada. Se aísla el Total-ARN utilizando el Mini Kit RNeasy Plant (Qiagen, Hilden, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este ARN se emplea con el fin de obtener cADN "5'RACE-ready" y "3'-RACE ready" utilizando el kit de amplificación de cADNc SMART RACE (Clontech, Heidelberg, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para aislar los genes de desaturasa novedos, se emplean los siguientes cebadores degenerados en combinación con el cADN "5'RACE-ready":

Deg.1 (SEQ ID No.: 42):

5'-TGGGTI(C/T)T(T/C/G)GCICA(C/T)GA(A/G)TG(C/T)GG(A/T/C)CA-3'

Deg.2 (SEQ ID No.: 43):

5'-TTIGG(A/G)TCIGT(A/G)TG(C/T)TG(A/C/G)A(A/G)(A/G)AAIGT-3'

Se emplea el siguiente protocolo PCR para la amplificación:

a) 2 min a 95° C,

b) 30 segundos a 94° C

30 segundos a 55-72° C

2 min a 72° C

Número de ciclos: 30

c) 10 min a 72° C

Se secuencian amplificados de PCR después de haber sido clonados en pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Karlsruhe, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una secuencia muestra homología con Δ-12 y Δ-15 desaturasas conocidas (Sayanova O et al. J. Biol. Chem., 2006, 281, 36533-36541) en la alineación ClustalW (Thompson JD, et al., Nucleic Acids Res., 1994, 22: 4673-4680). Esta sección de secuencia conocida se extiende en ambos extremos (5' y 3') mediante Amplificación Rápida de Extremos de cADNc (RACE) por medio del Kit de

Amplificación de cADN SMART RACE (Clontech, Heidelberg, Alemania). Para este fin, los siguientes cebadores específicos de secuencia se obtienen en la región de secuencia conocida:

5RACE1 (SEQ ID No.: 44): 5'-ATGAAGACCATGTCGCGCTCCATGT-3'

3RACE1 (SEQ ID No.: 45): 5'-GACGAGCACCTCATCCTGCTTAG-3'

- 5 Estos cebadores en combinación con cADN "5'-RACE ready" o "3'-RACE ready" del hongo *Mycocentrospora acerina* da la secuencia de mRNA completa (SEQ ID No.: 15, Tabla 1).

10 Para las otras secuencias candidatas enumeradas, se identificaron secuencias genómicas completas en una primera etapa, de conformidad con las entradas de la base de datos. En una etapa adicional, la secuencia de codificación se extrae con la ayuda de métodos de bioinformática. Con el fin de obtener la secuencia de codificación correspondiente de los organismos, éstos se pueden amplificar en una reacción de PCR a partir de preparaciones de cADN, utilizando las secuencias de cebadores definidas en la Tabla 1. Esto puede dar lugar a fragmentos como se describen en la Tabla 2.

15 Al buscar regiones conservadas en las secuencias de proteínas, derivados del ADN, de los organismos *Cochliobolus heterostrophus* C5, *Cyanothece* sp. CCY0110 y *Mycocentrospora acerina*, es posible identificar las secuencias con actividad putativa de $\Delta 12$ -desaturasa o actividad de $\Delta 15$ -desaturasa. En particular, cuando una sucesión del motivo desaturasa 1 "GX₁₀HX₃HX₁₃GX₉PX₃WX₃H" (SEQ ID No: 46), el motivo de desaturasa 2 "PX₁₄(H/Q)H" (SEQ ID No: 47) y ya sea el motivo de desaturasa 3 "HX₂HHX₅PXY" (SEQ ID No: 48) o el motivo de desaturasa 4 "HX₂HHX₆PXY" (SEQ ID No: 49) se encuentran en la secuencia, esto es indicativo de $\Delta 12$ -desaturasas o $\Delta 15$ -desaturasas, donde X es sinónimo de cualquier aminoácido. Si es una $\Delta 12$ -, $\Delta 15$ - o omega3-desaturasa putativa se puede deducir del aminoácido en la posición variable 16 del motivo de desaturasa 2 (H o Q): Q = glutamina es indicadora de $\Delta 12$ -desaturasas putativas, H = histidina es indicadora de $\Delta 15$ - o omega3-desaturasas putativas.

Tabla 1: secuencias de los cebadores para la clonación de las desaturasas que se han identificados.

Nombre del gen	Organismo	Secuencia de Cebador (5'-3')	SEQ ID No:
D15Des(Ch)	<i>Cochliobolus heterostrophus</i> C5	Delantero: atgattacgactacgcacc	4
		Inverso: ttaagccttggtcttgacc	6
D15Des(Cy)	<i>Cyanothece</i> sp. CCY0110	Delantero: atgcagcaacctatgactgtg	11
		Inverso: ttaaaactttctagattcac	13
D12Des(Mac)	<i>Mycocentro spora acerina</i>	Delantero: atggcctcgaccaccgcccgc	18
		Inverso: ttactcgtgtcactctcag	19
$\omega 3$ Des(Hp)	<i>Hyaloperonospora parasitica</i>	Delantero: atggcgaccaagcaatcgg	53
		Inverso: ctaagctgcttgcatcac	55

Tabla 2: Codificación de secuencias de polinucleótidos o de aminoácidos de las desaturasas que se han identificado.

Nombre del gen	Organismo	Nucleótidos en bp	SEQ ID No:	Aminoácidos	SEQ ID
D15Des(Ch)	<i>Cochliobolus heterostrophus</i> C5	1215	2	404	3
D15Des(Cy)	<i>Cyanothece</i> sp. CCY0110	1050	9	349	10

(continuación)

Nombre del gen	Organismo	Nucleótidos en bp	SEQ ID No:	Aminoácidos	SEQ ID
D12Des(Mac)	<i>Mycocentrospora acerina</i>	1488	16	495	17
ω 3Des(Hp)	<i>Hyaloperonospora parasitica</i>	1086	51	361	52

Tabla 3: secuencias genómicas (gADN) o secuencias de transcripción (mARN) de las desaturasas que se han identificado.

Nombre del gen	Organismo	Tipo de secuencia	Nucleótidos en bp	SEQ ID No:
D15Des(Ch)	<i>Cochliobolus heterostrophus</i> C5	gADN	1870	1
D15Des(Cy)	<i>Cyanothece</i> sp. CCY0110	gADN	1667	4
D12Des(Mac)	<i>Mycocentrospora acerina</i>	mARN	1932	7
ω 3Des(Hp)	<i>Hyaloperonospora parasitica</i>	gADN	1300	50

5

Para caracterizar las funciones de las secuencias individuales, el marco de lectura abierto del ADN (Tabla 2) se clona en dirección 3' del promotor GAL1 inducible por galactosa de pYES2.1/V5-His-TOPO (Invitrogen), dando lugar a los plásmidos pYES-D15Des (Ch), pYES-D15Des (Cy) o pYES-D12Des (Mac). Luego, siguiendo las instrucciones del fabricante, estos plásmidos luego se pueden transformar en la cepa de levadura INVSC-1 (Invitrogen) y se seleccionan para auxotrofismo uracilo en placas con agar DOB -U. Las colonias positivas se identifican por PCR. Para este fin, el PCR se lleva a cabo en cada caso con 1 μ l de células descongeladas, dNTPs 200 μ M, 2,5 U de Taq-polimerasa y 100 pmol de cada cebador en un volumen total de 50 μ l. Las condiciones de PCR son las siguientes: primera desnaturalización a 95° C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos a 94° C durante 30 segundos, 55° C durante 1 minuto y 72° C durante 2 minutos, y una última etapa de elongación a 72° C durante 10 minutos: en paralelo, el vector pYES2.1/V5-His-TOPO vacío se transforma en la forma descrita anteriormente en células de levadura competentes de la cepa INVSC-1. Las células de levadura con los plásmidos pYES-D15Des (Ch), pYES-D15Des (Cy) o pYES-D12Des (Mac) se incuban durante 12 h en medio DOB -U líquido a 28° C y 200 rpm y crecido durante 12 h en medio de inducción (DOB -U 2% (p/v) de galactosa 2% (p/v) de rafinosa) y 250 μ M de ácidos grasos que se agregan en el medio. La especificidad y la actividad del gen que se va caracterizar se pueden determinar con referencia a los ácidos grasos agregado.

10

15

20

Las levaduras transformadas con los plásmidos pYES2/V5-His-TOPO o pYES-D15Des (Ch), pYES-D15Des (Cy) o pYES-D12Des (Mac) se analizan como sigue:

25

30

Las células de levadura de los principales cultivos se recogen por centrifugación (100 xg, 5 min, 20° C) y se lavan con NaHCO₃ 100 mM, pH 8.0 para eliminar el medio residual y ácidos grasos. Partiendo con los sedimentos celulares de levadura, ésteres de metilo de ácidos grasos (FAME) se preparan por metanolisis ácido. Para este fin, los sedimentos celulares 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 de petróleo (PE). Para eliminar los ácidos grasos no derivados, las fases orgánicas se lavan en cada caso una vez con 2 ml de NaHCO₃ 100 mM, pH 8.0 y 2 ml de agua destilada. A partir de entonces, las fases de PE se secan con Na₂SO₄, se evaporan en atmósfera de argón y se recogen en 100 μ l de PE. Las muestras se separan en una columna capilar 23-DB (30 m, 0.25 mm, 0.25 μ m, Agilent) en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 6850 equipado con detector de ionización de llama. Las condiciones para el análisis de GLC son como sigue: la temperatura del horno se programa desde 50° C hasta 250° C con un incremento de 5° C/min y finalmente 10 min a 250° C (posesión).

35

Las señales se identifican al comparar los tiempos de retención con los estándares de ácidos Grasos correspondientes (Sigma). 50 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 and Michaelson et al., 1998, FEBS Letters. 439(3):215-218.

Actividad y determinación de sustrato de las desaturasas que se han identificado

La especificidad de sustrato de D15Des (Ch) o D15Des (Cy) Se puede determinar después de la expresión y después de la alimentación de los diferentes ácidos grasos. Apartándose del motivo desaturasa conservada 2 (SEQ ID No. 47), la siguiente actividad se encuentra para las secuencias de codificación (Tabla 4).

Tabla 4: Actividad de las desaturasas que han sido identificadas

Nombre del gen	Organismo	Actividad	Polinucleótido SEQ ID No:	Polipéptido SEQ ID No:
D15Des(Ch)	<i>Cochliobolus heterostrophus C5</i>	$\Delta 15$ -desaturasa	2	3
D15Des(Cy)	<i>Cyanothece sp. CCY0110</i>	$\Delta 15$ -desaturasa	5	6
$\omega 3$ Des(Hp)	<i>Hyaloperonospora parasitica</i>	$\omega 3$ -desaturasa	51	52

5

Estas actividades que se han encontrado, se verifican adicionalmente mediante expresión de las desaturasas en levadura. La Tabla 4A muestra la conversión de diversos sustratos de ácidos grasos en los productos de ácidos grasos esperados. Excepto para los ácidos grasos 18: 1 n- 9, todos los sustratos se cargan en el experimento y, por lo tanto están presentes en exceso. La Figura 2 muestra los cromatogramas de los experimentos individuales.

10

Tabla 4A: Alimentación de levaduras

Nombre de la muestra/ carga de ácido graso	Etapa de reacción observada				Índice de conversión (%)		Actividad observada	Fig.
	Sustrato (% de contenido de ácido graso total)		Producto (% de contenido de ácido graso total)		Esperado	observado		
Vector vacío pYES2 / 18: 2n-9	18:2n-6	25.3	18:3n-3	0.0	-	-	-	4a
d15Des (Ch)/18: 2n-9	18:2n-6	6.3	18:3n-3	5.7	> 0	47.5	$\Delta 15$ -des.	4b
d15Des (Cy)/18: 2n-9	18:2n-6	13.0	18:3n-3	0.9	> 0	6.4	$\Delta 15$ -des.	4c
$\omega 3$ Des (Hp)/18: 2n-9	18:2n-6	12.6	18:3n-3	0.0	> 0	0.0	-	
$\omega 3$ Des (Hp)/20: 3n-6	20:3n-6	6.3	20:4n-3	0.6	> 0	8.6	$\omega 3$ -Des	
$\omega 3$ Des (Hp)/20: 4n-6	20:4n-6	5.7	20:5n-3	1.8	> 0	24.0	$\omega 3$ -Des	

A modo de control para el ensayo para la actividad $\Delta 15$ -desaturasa, las levaduras se transforman con el vector vacío pYES, se carga el ácido graso 18:2 n-6 y el perfil de ácidos grasos se analiza (Figura 2A). En comparación, el ácido graso adicional 18:3 n-3 se puede observar en levaduras que expresan las desaturasas d15Des (Ch) y d15Des(Cy) (Figura 2B, 2C). Estas desaturasas que se han ensayado por lo tanto, tienen actividad $\Delta 15$ -desaturasa.

15

Ejemplo 5: Producción de Plantas transgénicas para la producción de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga

5 Para producir ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en plantas, diversos genes de la ruta metabólica se combinan en un vector binario. Para producir el ácido graso ácido eicosapentaenoico (20:5 Δ 5,8,11,14,17), se combinan los genes como se describe en la Tabla 5. Análogamente, Los genes como se describe en la Tabla 6 se combinan para producir el ácido graso ácido docosahexaenoico (22:6 Δ 4,7,10,13,16,19).

Tabla 5: Combinación de genes para la producción de ácido eicosapentaenoico

Gen	Actividad	SEQ ID No.
D6Des(Pir)	Δ 6-desaturasa	22
D6Elo(Pp)	Δ 6-elongasa	31
D5Des(Tc)	Δ 5-desaturasa	25
ω 3-Des(Pi)	ω 3-desaturasa	28
D15Des(Ch)	Δ 15-desaturasa	2
D15Des(Cy)	Δ 15-desaturasa	9
D12Des(Mac)	Δ 12-/ Δ 15-desaturasa	16
ω 3Des(Hp)	ω 3-desaturasa	51

Tabla 6: Combinación de genes para la producción de ácido docosahexaenoico

Gen	Actividad	SEQ ID No.
D6Des(Pir)	Δ 6-desaturasa	22
D6Elo(Pp)	Δ 6-elongasa	31
D5Des(Tc)	Δ 5-desaturasa	25
ω 3Des(Pi)	ω 3-desaturasa	28
D15Des(Ch)	Δ 15-desaturasa	2
D15Des(Cy)	(15-desaturasa	9
ω 3Des(Hp)	ω 3-desaturasa	
D12Des(Mac)	(12-/15-desaturasa	16
D5Elo(Ot)	Δ 5-elongasa	34
D4Des(Tc)	Δ -desaturasa	37

10 Los vectores de transformación con base en PSUN-USP se generan para la transformación de plantas. Para este fin, los sitios de división NotI se introducen en el extremo 5' y en el extremo 3' de la secuencia de codificación, utilizando los siguientes pares de cebadores (Vease Tabla 7).

Composición de la Mezcla PCR (50 μ l):

ES 2 435 572 T3

5.00 µl de plantilla de cADN

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

5.00 µl de dNTP

1.25 µl de Cada cebador (10 pmol/µl)

5 0.50 µl de polimerasa Advantage

Se emplea polimerasa Advantage de Clontech.

Condiciones de Reacción PCR:

Temperatura de hibridación: 1 min 55° C

Temperatura de desnaturalización: 1 min 94° C

10 Temperatura de elongación: 2 min 72° C

Número de Ciclos: 35

Tabla 7: Las secuencias de cebador (para clonación de vectores de transformación basados en PSUN-USP)

Gen	Cebador	SEQ ID No.
D6-Des(Pir)	Fwd: gcggccgcgcatggtggacctaagcctgg	23
	Rvs: gcggccggttacatcgctgggaactcgg	24
D5-Des(Tc)	Fwd: gcggccgcgcatgggcaagggcagcgaggg	26
	Rvs: gcggccgcgctcagtcctcttcttggtgtc	27
O3-Des(Pi)	Fwd: gcggccgcgcatggcgacgaaggaggcgta	29
	Rvs: gcggccgcggttacgtggacttggtcttgcc	30
D6-Elo(Pp)	Fwd: gcggccgcgcatggaggtcgtggagagattc	32
	Rvs: gcggccgcgtcactcagtttagctccc	33
D15Des(Ch)	Fwd: gcggccgcgcatgattacgactacgcacc	5
	Rvs: gcggccgcgttaagccttggtcttgacc	7
D15Des(Cy)	Fwd: gcggccgcgcatgcagcaacctatgactgtg	12
	Rvs: gcggccgcgttaaaacttttagattcac	14
D12Des(Mac)	Fwd: gcggccgcgcatggcctcgaccaccgcccgc	20
	Rvs: gcggccgcgttactcgttgctactctcag	21
ω3Des(Hp)	Fwd: gcggccgcgcatggcgaccaagcaatcgg	54
	Rvs: gcggccgcgctaagctgcttggcatcac	56

(continuación)

Gen	Cebador	SEQ ID No.
D5Elo(Ot)	Fwd: gcggccgcgccatgagcgctccggtgcgctg	35
	Rvs: gcggccgcgtagtagcaatttttc	36
D4Des(Tc)	Fwd: gcggccgcgccatgacggtcggctacgacgag	38
	Rvs: gcggccgcgctcaggcagcgcgctgccagg	39

Los productos PCR se incuban con la enzima de restricción NotI durante 4 horas a 37° C. El vector de expresión de planta pSUN300-USP se incuba en la misma manera. A partir de entonces, los productos de PCR y el vector 7624 pb se separan por electroforesis en gel de agarosa, y los fragmentos de ADN correspondientes se extirpan. El ADN se purifica por medio del kit de purificación en gel de Qiagen, siguiendo las instrucciones del fabricante. A partir de entonces, el vector y los productos PCR se ligan. El kit de Ligación Rápido de Roche se utiliza para este propósito. Los plásmidos generados se verifican mediante secuenciación.

El pSUN300 es un derivado del plásmido pPZP (Hajdukiewicz, P., Svab, Z., Maliga, P., (1994) La pequeña familia pPZP versátil de vectores binarios de *Agrobacterium* para transformación de plantas, *Plant Mol Biol* 25:989-994). Los pSUN-USP se originan a partir de pSUN300, al insertar un promotor de USP en pSUN300 en la forma de un fragmento EcoRI. La señal de poliadenilación es el gen OCS del plásmido *A. tumefaciens* Ti (ocs-Terminador, Acceso GenBank V00088) (De Greve, H., Dhaese, P., Seurinck, J., Lemmers, M., Van Montagu, M. y Schell, J. Nucleotide sequence and transcript map of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid-encoded octopine synthase gene *J. Mol. Appl. Genet.* 1 (6), 499-511 (1982). El promotor USP corresponde a los nucleótidos 1-684 (Acceso de GenBank X56240), en donde parte de la región no codificante del gen USP está presente en el promotor. El fragmento de promotor que es 684 pares bases en tamaño se amplifica por una reacción de PCR utilizando métodos estándar con la ayuda de un cebador sintetizado y por medio de un cebador estándar T7 comercialmente disponible (Stratagene)

(Cebador de secuencia):

5'-GTCGACCCGCGGACTAGTGGGCCCTCTAGACCCGGGGGATCC
GGATCTGCTGGCTATGAA-3') [SEQ ID NR: 82].

El fragmento de PCR se recorta con EcoRI/Sall y se inserta en el vector de pSUN300 con el terminador OCS. Esto da lugar al plásmido llamado pSUN-USP, que se puede emplear para transformar plantas por medio de *Agrobacterium tumefaciens*.

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

Para generar plantas de colza transgénicas, los vectores binarios tales como los plásmidos PSUN descritos anteriormente se transforman en *Agrobacterium tumefaciens* C58C1: pGV2260 (Deblaere et al., 1984, *Nucl Acids Res.* 13, 4.777-4.788). Una dilución 1:50 de un cultivo nocturno de una colonia de agrobacterias transformada positivamente en medio de Murashige-Skoog (Murashige and Skoog 1962 *Physiol. Plant.* 15, 473), complementado con 3% de sacarosa (medio 3MS) se utiliza para transformar plantas de colza (cv. Westar). Los pecíolos o hipocótilos de plantas de colza estériles recién germinados (en cada caso aproximadamente 1 cm²) se incuban con una dilución de agrobacterias 1:50 durante 5-10 minutos en una placa de Petri. Esto se sigue por 3 días de incubación en la oscuridad a 25° C en medio 3MS complementado con 0.8% de agar Bacto. Después de 3 días, el cultivo se continúa con 16 horas de luz/8 horas oscuridad y se continúa, en un ritmo de 1 semana, en medio MS complementado con 500 mg/l de Claforan (cefotaxima-sodio), 50 mg/l de kanamicina, bencilaminopurina 20 µM (BAP) y 1.6 g/l de glucosa. Los brotes en crecimiento se transfieren a medio MS complementado con 2% de sacarosa, 250 mg/l de Claforan y 0.8% de agar Bacto. Si no se han formado raíces después de tres semanas, la hormona de crecimiento ácido 2-indolbutírico se agrega al medio para promover enraizamiento.

Los brotes regenerados se obtienen en medio 2MS complementado con kanamicina y Claforan, se transfieren en el suelo una vez se arraiga, y después del cultivo durante dos semanas crece en un estante de ambiente controlado o en un invernadero, se induce floración, se recogen las semillas maduras y se analizan para la expresión de los

genes desaturasa o elongasa por medio de análisis de lípidos, como se describe a modo de ejemplo en Qiu et al. 2001, J. Biol. Chem. 276, 31561-31566.

b) Generación de plantas transgénicas de linaza

- 5 Las plantas de linaza transgénicas pueden ser generadas por ejemplo por el método de Bell et al., 1999, In Vitro Cell. Dev. Biol. -Plant. 35 (6):456-465 por medio de bombardeo de partículas. Se puede efectuar transformaciones mediadas por Agrobacterium por ejemplo como se describe por Mlynarova et al. (1994), Plant Cell Report 13: 282-285.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> BASF Plant Science GmbH

- 10 <120> Desaturasas y proceso para la producción de ácidos grasos poliinsaturados en organismos transgénicos

<130> BPS66115PC

<160> 56

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

- 15 <211> 1870

<212> ADN

<213> Cochliobolus heterostrophus C5

<400> 1

ES 2 435 572 T3

ttgaaatctc ggttcgagac ccactgttac gtaccgccat agacacgaag gcggtgtctg	60
gtgcacatcg ctgccctcgc gacgttgaaa cgtatgtcgg gtccgttgag cttaggctgt	120
atcaaggggc agagttttcg tgctcaaccc agccgctatc ggtacaaaag gctgaccacc	180
gtcccgcccc gtgtctgaac gagtgtccct tccattccct ttcttcccaa ccatgattac	240
gactacgcac cgtgtccacg aggtccctgt caagaccagg cttacggctg tggccgatgt	300
ccggcccatt cccgacgtca agaccctcaa ggatgccatt cccgcaaat gctttgagcg	360
ctccatgctt cgctccttct cttacgtcgt ccgtgatctc attgtcgtct tctccctttt	420
ctacgtgct gtgccccgt ctgcctaga cgtccctgg ttctgcacag ttccccgtg	480
ggccctatac agcttcgtcc agggctgttt cttcactggc ctctggattc ttgccacga	540
ttgcggccat gactctttct ccgagaacct caccgtcaac gccattaccg gctggttcct	600
ccactgcatg ttgatggccc cttcttcag ctggaagttc agccacgccc gccaccaccg	660
ataccacaac cacatggaca aggacaccgt cttcgtgccc caccgcaagt ccgacgtcga	720
ggccaagaag accaagccaa cctcctcga gaaatcatg gaccactcag ccgctgacac	780
gcccatac acggtcgctt ctctcatctt ccaccaagtc cttggctggc cagcttacat	840
tctgatgaac gccggcgctg gcaagaagag cttgaccaag ggagaccgct acacttcttc	900
ccgctacaag caaagtcatt tggatccac tggccacgta ttcaccccg ctaggctcc	960
ttttgtcgt ctgagcaatg tcggcctcat cctcacaatg actgctctgt atgtctggc	1020
ccgcagcgtt ggaacttcga ccgttcttct cgcgtatgg ctccttacc tctggatgaa	1080
ccactggatc ggtaagcgtg tcgttcccc gagctgcaaa gtagtgaaaa ctaattctcc	1140
acagtcgcta ttacttacct tcaccacact cccccgagg ctctcacta cgaggctgac	1200
aactggactt ttatcaaggc cgctgcctca actgtggacc gtgattttgg cttcattggc	1260

```
cgccacatct tccacggcat cattgagtac cacgtcgttc accacatggt cccgtaagtt 1320
tgacctatac cgagccacca ccatgtcttg gtcactccaa ctcttcgcgc tgagcccagc 1380
tgacgtgtat tagacgcatt cccttctacc acgccgagga ggccacttgg gctattgccc 1440
ctcttcttgg cgaacgctac atccagcaaa agaccaactt ttccggtgac ttgtggcaaa 1500
gcttcaccac ttgcaagacc gttgagccgg gcactggcgt ccacgctgga ggattggtct 1560
gggtccaagac caaggcttaa ggcttgcgca gtttggtttg cgaaatgaaa cgaggcaaat 1620
gaaattagac tctagacaat agaaggttta atccgatact atctttcagt aatcccgggt 1680
acatgcctaa acacaacttg gtgagatgat atgttggcac gaaagattta gttggtgctg 1740
cttaggtgaa ttgccgactg atgacgtcgt gtgttgatca tctccggtca cgtgaataca 1800
caaggtggtg caggcactcc aacttgtttg agctgactga tcgagagaac tccttgatct 1860
ccagaattaa 1870
```

<210> 2

<211> 1215

<212> ADN

5 <213> Cochliobolus heterostrophus C5

<400> 2

ES 2 435 572 T3

```

atgattacga ctacgcaccg tgtccacgag gtcctgtca agaccaggct tacggctgtg      60
gccgatgtcc ggccattcc cgacgtcaag accctcaagg atgccattcc cgcaaaatgc      120
tttgagcgct ccatgcttgc ctcttctct tacgtcgtcc gtgatctcat tgtcgtcttc      180
tcccttttct acgtgctgtg gcccctgtct cgcttagacg ctccctgggt cgtcacagtt      240
cccctgtggg cctatacag ctctgtccag ggcgtttct tcaactggtct ctggattctt      300
gcccacgatt gcggccatga ctcttctcc gagaacctca ccgtcaacgc cattaccggc      360
tggttctctc actgcatgtt gatgggtccc ttcttcagct ggaagtccag ccacgcccgc      420
caccaccgat accacaacca catggacaag gacaccgtct tcgtgcccc cgcgaagtcc      480
gacgtcgagg ccaagaagac caagccaacc ctctcgaga aaatcatgga ccaactcagcc      540
gctgacacgc ccatcatcac ggctgcttct ctcatcttcc accaagtcct tggttgcca      600
gcttacattc tgatgaacgc cggcgctggc aagaagagct tgaccaaggg agaccgctac      660
acttcttccc gctacaagca aagtcatttg gatccactg ccacgtatt caccctgtct      720
gaggctcctt ttgtcgtct gagcaatgtc ggctcatcc tcacaatgac tgctctgtat      780
gtctgggtccc gcagcgttg aacttcgacc gttcttctcg cgtatggtct ccttacctc      840
tggtatgaacc actggatcgt cgtattact tacctcacc acactcaccc cgaggctcct      900
cactacgagg ctgacaactg gacttttatc aaggcgctg cctcaactgt ggaccgtgat      960

tttggttca ttggccgcca catcttcac ggcatcattg agtaccacgt cgttcaccac      1020
atgttccac gcattccctt ctaccacgcc gaggaggcca cttgggctat tgccctctt      1080
cttggaac gctacatcca gcaaaagacc aacttttctg gtgacttggt gcaaagcttc      1140
accacttgca agaccgttg gccgggact ggcgtccacg ctggaggatt ggtctggtcc      1200
aagaccaagg cttaa                                          1215

```

<210> 3

<211> 404

5 <212> PRT

<213> Cochliobolus heterostrophus C5

<400> 3

ES 2 435 572 T3

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

ES 2 435 572 T3

Asp His Ser Ala Ala Asp Thr Pro Ile Ile Thr Val Ala Ser Leu Ile
 180 185 190
 Phe His Gln Val Leu Gly Trp Pro Ala Tyr Ile Leu Met Asn Ala Gly
 195 200 205
 Ala Gly Lys Lys Ser Leu Thr Lys Gly Asp Arg Tyr Thr Ser Ser Arg
 210 215 220
 Tyr Lys Gln Ser His Leu Asp Pro Thr Ala His Val Phe Thr Pro Ser
 225 230 235 240
 Glu Ala Pro Phe Val Ala Leu Ser Asn Val Gly Leu Ile Leu Thr Met
 245 250 255
 Thr Ala Leu Tyr Val Trp Ser Arg Ser Val Gly Thr Ser Thr Val Leu
 260 265 270
 Leu Ala Tyr Gly Leu Pro Tyr Leu Trp Met Asn His Trp Ile Val Ala
 275 280 285
 Ile Thr Tyr Leu His His Thr His Pro Glu Ala Pro His Tyr Glu Ala
 290 295 300
 Asp Asn Trp Thr Phe Ile Lys Gly Ala Ala Ser Thr Val Asp Arg Asp
 305 310 315 320
 Phe Gly Phe Ile Gly Arg His Ile Phe His Gly Ile Ile Glu Tyr His
 325 330 335
 Val Val His His Met Phe Pro Arg Ile Pro Phe Tyr His Ala Glu Glu
 340 345 350
 Ala Thr Trp Ala Ile Ala Pro Leu Leu Gly Glu Arg Tyr Ile Gln Gln
 355 360 365
 Lys Thr Asn Phe Phe Gly Asp Leu Trp Gln Ser Phe Thr Thr Cys Lys
 370 375 380
 Thr Val Glu Pro Gly Thr Gly Val His Ala Gly Gly Leu Val Trp Ser
 385 390 395 400
 Lys Thr Lys Ala

<211> 19
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 5 <223> Cebador
 <400> 4
 atgattacga ctacgcacc 19
 <210> 5
 <211> 30
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 <400> 5
 15 gcggccgcgc catgattacg actacgcacc 30
 <210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Cebador
 <400> 6
 ttaagccttg gtcttgacc 20
 <210> 7
 25 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 30 <400> 7
 gcggccgcgt taagccttgg tcttgacc 29

ES 2 435 572 T3

<210> 8

<211> 1667

<212> ADN

<213> *Cianothece* sp. CCY0110

5 <400> 8

gagatgatga ctttaaccgt acctttcgtc gaaatcctcc attaccacca cgaggagaat	60
ggaacgatta aaggattttg ctttttggtta ctaatgtcgg taaacagtcc ccaagctata	120
aagggcgcaa gttttgcgcc ttttaatttt gaaagtagaa aaaattgacc ccaacaccat	180
ctagagcaaa ggttcttgaa gtagtaactt gtaacagtag agtatgtcaa ctgctaatag	240

ES 2 435 572 T3

tataataggt aagattaaga aaaattaagt ttttctcgac attaggttta aataaggaga	300
tccaacagcg aatgcagcaa cctatgactg tgaagcgacc agaaccacaaa gtggctcgacc	360
taccttttac gttacaagat attagagaag ccatccccc tcattgtttt gagtcactg	420
ctataaaatc cctggcttat tttttttggg atatttttgt catatctgtt ctatatgcga	480
tcgcttattc tttggattct tggttttttt ggccgatttt ttgggtcatg caaggaacta	540
tgttttgggc attatttgtt gtcggacatg attgtggcca tggttctttt tctcgctaca	600
aatgggttaa taatctcatt ggtcatcttt cccatactcc catttttagtc ccatttcattg	660
ggtggcgat tagtcacgc actcatcata aaaatactgg taatattgat acggatgaaa	720
gttggatatc tatcacagaa tctaaatata atgagatggg atgggttagaa aagtttgccc	780
gttttaaaact ggttttattt ctgtatcttc tttatttatt taagcgttcc ccaggagaa	840
aaggaagtca tttcgatcct aagagcgatc tattcgcgtc atctgaaaaa tgggatgttt	900
taactagcac tatttgcttg attggtatgg ttgctttgtt aggtttttta acttatcaat	960
tcggcttttt gtggttactt aaatattatt taggacctta tcttgttttt gtgatttgg	1020
tagatttagt taccttttta catcacactg atcctgatgt tccttggat cgggggaaag	1080
attggtactt tttaaaagg gcattatcta cggtagatca tgattatggg tttatcaatg	1140
atatccatca taatattggt actcatgttg ctcacatata ctttttgacc atgcctcatt	1200
accatttaaa aaccgcaaca gaagccatta aaccogtttt aggtgactat tatcgtaagt	1260
caaattactc tatttttagaa gcatttatcc ggggctacaa tatttgcat gtggttccc	1320
atgaaggggg taaggtttat tgtgaatcta gaaagtttta agttttaatt cttctttcta	1380
gttataaaaa acacaatcga attaatataa aaaagggaag gtatttaata agtatcttcc	1440
ttttactata gaatgaagaa aaaaaataaa atttcaaatt tcttagtata aatatatttg	1500
caaagaatta tagagaagtt aaatgtaaac aagatcaaga aaacaagtta ataaaaaat	1560
ggaaattaga agagaataat ttatattcat tatgaatgta atacattgat ctattgttaa	1620
cttttccaat ttttagaata attctgtaac ctattgtaaa aacagaa	1667

<210> 9

<211> 1050

<212> ADN

5 <213> *Cianothece* sp. CCY0110

<400> 9

ES 2 435 572 T3

```

atgcagcaac ctatgactgt gaagcgacca gaacccaaaag tggtcgacct accttttaacg      60
ttacaagata ttagagaagc catccccccct cattgttttg agtcatctgc tataaaatcc      120
ctggccttatt ttttttggga tatttttgtc atatctgttc tatatgcgat cgcttattct      180

ttggattcctt ggtttttttg gccgattttt tgggtcatgc aaggaactat gttttgggca      240
ttatttggtg tcggacatga ttgtggccat ggttcttttt ctcgctacaa atggttaaat      300
aatctcattg gtcacttttc ccatactccc attttagtcc catttcatgg gtggcgtatt      360
agtcatcgca ctcatcataa aaatactggt aatattgata cggatgaaag ttggtatcct      420
atcacagaat ctaaataata tgagatggga tggtagaaa agtttgcccg ttttaaactg      480
gttttatttc tgtatcctct ttatttattt aagcgttccc caggagagaaa aggaagtcatt      540
ttcgatccta agagcgatct attccgtcca tctgaaaaat gggatgtttt aactagcact      600
atttgcttga ttggtatggt tgctttgtta ggttttttaa cttatcaatt cggctttttg      660
tggttactta aatattattt aggaccttat cttgtttttg tgatttggtt agatttagtt      720
acctttttac atcacactga tcctgatgtt ccttggtatc gggggaaaga ttggtacttt      780
ttaaaagggg cattatctac ggtagatcat gattatgggt ttatcaatga tatccatcat      840
aatattggta ctcatgttgc tcatcatatc tttttgacca tgccctatta ccatttaaaa      900
accgcaacag aagccattaa acccgtttta ggtgactatt atcgtaagtc aaattactct      960
attttagaag catttattcg gggctacaat atttgtcatg tggttcccg tgaagggggt      1020
aaggtttatt gtgaatctag aaagttttta      1050

```

<210> 10

<211> 349

<212> PRT

5 <213> *Cianothece* sp. CCY0110

<400> 10

ES 2 435 572 T3

Met Gln Gln Pro Met Thr Val Lys Arg Pro Glu Pro Lys Val Val Asp
1 5 10 15

Leu Pro Phe Thr Leu Gln Asp Ile Arg Glu Ala Ile Pro Pro His Cys
20 25 30

Phe Glu Ser Ser Ala Ile Lys Ser Leu Ala Tyr Phe Phe Trp Asp Ile
35 40 45

Phe Val Ile Ser Val Leu Tyr Ala Ile Ala Tyr Ser Leu Asp Ser Trp
50 55 60

Phe Phe Trp Pro Ile Phe Trp Val Met Gln Gly Thr Met Phe Trp Ala
65 70 75 80

Leu Phe Val Val Gly His Asp Cys Gly His Gly Ser Phe Ser Arg Tyr
85 90 95

ES 2 435 572 T3

Lys Trp Leu Asn Asn Leu Ile Gly His Leu Ser His Thr Pro Ile Leu
 100 105 110

Val Pro Phe His Gly Trp Arg Ile Ser His Arg Thr His His Lys Asn
 115 120 125

Thr Gly Asn Ile Asp Thr Asp Glu Ser Trp Tyr Pro Ile Thr Glu Ser
 130 135 140

Lys Tyr Asn Glu Met Gly Trp Leu Glu Lys Phe Ala Arg Phe Lys Leu
 145 150 155 160

Val Leu Phe Leu Tyr Pro Leu Tyr Leu Phe Lys Arg Ser Pro Gly Arg
 165 170 175

Lys Gly Ser His Phe Asp Pro Lys Ser Asp Leu Phe Arg Pro Ser Glu
 180 185 190

Lys Trp Asp Val Leu Thr Ser Thr Ile Cys Leu Ile Gly Met Val Ala
 195 200 205

Leu Leu Gly Phe Leu Thr Tyr Gln Phe Gly Phe Leu Trp Leu Leu Lys
 210 215 220

Tyr Tyr Leu Gly Pro Tyr Leu Val Phe Val Ile Trp Leu Asp Leu Val
 225 230 235 240

Thr Phe Leu His His Thr Asp Pro Asp Val Pro Trp Tyr Arg Gly Lys
 245 250 255

Asp Trp Tyr Phe Leu Lys Gly Ala Leu Ser Thr Val Asp His Asp Tyr
 260 265 270

Gly Phe Ile Asn Asp Ile His His Asn Ile Gly Thr His Val Ala His
 275 280 285

His Ile Phe Leu Thr Met Pro His Tyr His Leu Lys Thr Ala Thr Glu
 290 295 300

Ala Ile Lys Pro Val Leu Gly Asp Tyr Tyr Arg Lys Ser Asn Tyr Ser
 305 310 315 320

Ile Leu Glu Ala Phe Ile Arg Gly Tyr Asn Ile Cys His Val Val Pro
 325 330 335

Asp Glu Gly Gly Lys Val Tyr Cys Glu Ser Arg Lys Phe
340 345

<210> 11

<211> 21

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 11

atgcagcaac ctatgactgt g 21

10 <210> 12

<211> 32

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Cebador

<400> 12

gcggccgcgc catgcagcaa cctatgactg tg 32

<210> 13

<211> 20

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 13

25 ttaaaacttt ctagattcac 20

<210> 14

<211> 29

<212> ADN

<213> Artificial

30 <220>

ES 2 435 572 T3

<223> Cebador

<400> 14

gcggccgcgt taaaacttc tagattcac 29

<210> 15

5 <211> 1932

<212> ADN

<213> Mycocentrospora acerina

<400> 15

accctctttc cctcttttc ttatcgagga cctcagac .ttgcggttca gggcactcat 60

ES 2 435 572 T3

ccttgaacgg	tcagcccaac	aataagcgac	ctgcatctca	acaacagcac	ctcaaccgtc	120
attcgggttg	ctgttgctct	ttgaagcccc	tccagcttct	ttactgctcg	ctgagacagc	180
cgctcctcgt	gccattgcca	tcagcattca	ctcgacacct	tcaccatggc	ctcgaccacc	240
gcccgcgctc	aagcccctgt	gctgaggcgc	cacgttacca	ccgagtctgt	gccctccacc	300
atggccaact	cgcccaacga	ctcgcccaac	ggctccgcct	ccaacacgtc	gctgtcgtcg	360
ctcggctccg	tcgacgacgt	gcaggccaag	aaggcatcca	acggtgtcct	tctcgacacg	420
tacggcaacg	agttcaagat	ccctgacttc	accatcaagg	acatccgga	tgccatcccc	480
aagcactgct	tcgagcgctc	tgccgcccgc	agtcttggct	acgttgcccg	cgacctggcc	540
atgctcgcca	ccaccttcta	cctctcctac	acattcatca	ggcccgagta	catctcctcc	600
aaggccgtcc	gcgcgctgct	gtgggctgga	tacactgtca	tccagggtct	tgttggcacc	660
ggtctctggg	ttcttgccca	cgagtgcggc	caccaggcct	tctccccctc	caagggtgctc	720
aacgacaccg	tcggctgggt	ctgccactct	ctctcctcgt	tcccctactt	ctcatggaag	780
atctcccacg	gcaagcacca	caaggccacc	ggccacatgg	agcgcgacat	ggtcttcatt	840
cccaagacc	gcgacgtcta	cgctaccogt	gtcagcaagc	ttatccacga	gatctctgag	900
ctagccgagg	agactcccat	cgttaccttt	atccacatgc	tcggtcagca	gattggcgga	960
tggcagatgt	acctctttgc	caacgctact	ggccacaccc	accacgaccg	tcagtcggag	1020
ggcaaggggtg	ttggcaagca	gaacggcatg	ttcgggtggcg	tcaaccactt	caacccatcc	1080
agccctctgt	acgagaagag	ggacgagcac	ctcatcctgc	ttagcgatct	tggccttgct	1140
attgttatcg	ctgctctgac	ctacgttggc	aagattcacg	gcttctcaag	tgtcctcgtg	1200
tggtagatca	tcccttactt	ctgggttcac	cactggctcg	tcatgatcac	cttcctccag	1260
cacacggacc	cttccttgcc	ccactacgac	gctgagacgt	ggacctacgc	ccgtggcgct	1320
ggtgcaacga	ttgaccgga	gtttggcttc	attggacgca	ctctgttcca	cggcatcatt	1380
gagacgcacg	ttctccacca	ctacatctcg	tcgattcctt	tctacaacgc	cgatgaggcc	1440
tctgaggcca	tcaagaaggt	catgggctcg	cactaccgat	ctgacgttga	gggtggctcc	1500
attggcttcc	tcaagtcttt	ctggaggagt	gcccgcacgt	gccagtttgt	cgagcccagc	1560
gaagggtgcc	agggcgaggg	caagggtgtg	cttttcttcc	gcaaccacaa	tggctcttggc	1620
gttcagcccc	gcaagctgga	tgctctggc	aagcctgtcg	ttagcaagcg	cgccaccaag	1680
atggagggtg	gccctgagag	tgacaacgag	taaagaggct	gcaaggccct	tttttcggac	1740
tagtgaggca	aggttgattt	gggtgaagg	gcgttttatg	gtagcattga	ctcgaagatt	1800
gacttttttg	agctgggctg	gttacttgat	gataaatttt	ttttcttctc	tcgagcgtta	1860
gagcttagac	agcccaagac	gatagaagtc	gatatcccac	ttggaaaaaa	aagaaaaaaa	1920
aaaaaaaaaa	aa					1932

<210> 16

<211> 1488

<212> ADN

<213> Mycocentrospora acerina

5 <400> 16

```

atggcctcga ccaccgcccg cgctcaagcc cctgtgctga ggcgccacgt taccaccgag      60
tctgtgccct ccaccatggc caactcgccc aacgactcgc ccaacggctc cgctccaac      120
acgtcgctgt cgtcgctcgg ctccgtcgac gacgtgcagg ccaagaaggc atccaacggt      180
gtccttctcg acacgtacgg caacgagttc aagatccctg acttcacat caaggacatc      240
cgcgatgcc a tccccaagca ctgcttcgag cgctctgccg cccgcagtct tggctacgtt      300
gcccgcgacc tggccatgct cgccaccacc ttctacctct cctacacatt catcaggccc      360
gagtacatct cctccaaggc cgtcgcgcgc gtgctgtggg ctggatacac tgtcatccag      420
ggtcttgttg gcaccggtct ctgggttctt gcccacgagt gcggccacca ggccttctcc      480
ccctccaagg tgcacaacga caccgtcggc tgggtctgcc actctctcct cctcgtcccc      540
tactttctcat ggaagatctc ccacggcaag caccacaagg ccaccggcca catggagcgc      600
gacatggtct tcattcccaa gaccgcgcac gtctacgcta cccgtgtcag caagcttctc      660
cacgagatct ctgagctagc cgaggagact cccatcgcta cctttatcca catgctcggc      720
cagcagattg gcggatggca gatgtacctc ttgccaacg tcaactggcca caccaccac      780
gaccgtcagt ccgagggcaa ggggtgtggc aagcagaacg gcatgttcgg tggcgtcaac      840
cacttcaacc catccagccc tctgtacgag aagagggacg agcacctcat cctgcttagc      900
gatcttggcc ttgctattgt tatcgctgct ctgacctacg ttggcaagat tcacggcttc      960
tcaagtgtcc tcgtgtggta catcatccct tactttctggg ttcaccactg gtcgtcatg      1020
atcaccttcc tccagcacac ggacccttcc ctgcccact acgacgctga gacgtggacc      1080
tacgcccgtg gcgctggtgc aacgattgac cgcgagtttg gcttcattgg acgcactctg      1140
ttccacggca tcattgagac gcacgttctc caccactaca tctcgtcgat tcctttctac      1200
aacgccgatg aggcctctga ggccatcaag aaggatcatgg gctcgcacta ccgatctgac      1260
gttgaggggtg gctccattgg cttcctcaag tctttctgga ggagtggccg catgtgccag      1320
tttgtcgagc ccagcgaagg tgccgagggc gagggcaagg gtgtgctttt cttccgcaac      1380
cacaatggtc ttggcgttca gcccgcgaag ctggatgcgt ctggcaagcc tgcgttagc      1440
aagcgcgcca ccaagatgga ggtgggccct gagagtgaca acgagtaa      1488

```

<210> 17

<211> 495

<212> PRT

<213> Mycocentrospora acerina

<400> 17

ES 2 435 572 T3

Met	Ala	Ser	Thr	Thr	Ala	Arg	Ala	Gln	Ala	Pro	Val	Leu	Arg	Arg	His	1	5	10	15
Val	Thr	Thr	Glu	Ser	Val	Pro	Ser	Thr	Met	Ala	Asn	Ser	Pro	Asn	Asp	20	25	30	
Ser	Pro	Asn	Gly	Ser	Ala	Ser	Asn	Thr	Ser	Leu	Ser	Ser	Leu	Gly	Ser	35	40	45	
Val	Asp	Asp	Val	Gln	Ala	Lys	Lys	Ala	Ser	Asn	Gly	Val	Leu	Leu	Asp	50	55	60	
Thr	Tyr	Gly	Asn	Glu	Phe	Lys	Ile	Pro	Asp	Phe	Thr	Ile	Lys	Asp	Ile	65	70	75	80
Arg	Asp	Ala	Ile	Pro	Lys	His	Cys	Phe	Glu	Arg	Ser	Ala	Ala	Arg	Ser	85	90	95	
Leu	Gly	Tyr	Val	Ala	Arg	Asp	Leu	Ala	Met	Leu	Ala	Thr	Thr	Phe	Tyr	100	105	110	
Leu	Ser	Tyr	Thr	Phe	Ile	Arg	Pro	Glu	Tyr	Ile	Ser	Ser	Lys	Ala	Val	115	120	125	
Arg	Ala	Val	Leu	Trp	Ala	Gly	Tyr	Thr	Val	Ile	Gln	Gly	Leu	Val	Gly	130	135	140	
Thr	Gly	Leu	Trp	Val	Leu	Ala	His	Glu	Cys	Gly	His	Gln	Ala	Phe	Ser	145	150	155	160
Pro	Ser	Lys	Val	Leu	Asn	Asp	Thr	Val	Gly	Trp	Val	Cys	His	Ser	Leu	165	170	175	
Leu	Leu	Val	Pro	Tyr	Phe	Ser	Trp	Lys	Ile	Ser	His	Gly	Lys	His	His	180	185	190	
Lys	Ala	Thr	Gly	His	Met	Glu	Arg	Asp	Met	Val	Phe	Ile	Pro	Lys	Thr	195	200	205	
Arg	Asp	Val	Tyr	Ala	Thr	Arg	Val	Ser	Lys	Leu	Ile	His	Glu	Ile	Ser	210	215	220	

ES 2 435 572 T3

Glu Leu Ala Glu Glu Thr Pro Ile Val Thr Phe Ile His Met Leu Gly
 225 230 235 240
 Gln Gln Ile Gly Gly Trp Gln Met Tyr Leu Phe Ala Asn Val Thr Gly
 245 250 255
 His Thr His His Asp Arg Gln Ser Glu Gly Lys Gly Val Gly Lys Gln
 260 265 270
 Asn Gly Met Phe Gly Gly Val Asn His Phe Asn Pro Ser Ser Pro Leu
 275 280 285
 Tyr Glu Lys Arg Asp Glu His Leu Ile Leu Leu Ser Asp Leu Gly Leu
 290 295 300
 Ala Ile Val Ile Ala Ala Leu Thr Tyr Val Gly Lys Ile His Gly Phe
 305 310 315 320
 Ser Ser Val Leu Val Trp Tyr Ile Ile Pro Tyr Phe Trp Val His His
 325 330 335
 Trp Leu Val Met Ile Thr Phe Leu Gln His Thr Asp Pro Ser Leu Pro
 340 345 350
 His Tyr Asp Ala Glu Thr Trp Thr Tyr Ala Arg Gly Ala Gly Ala Thr
 355 360 365
 Ile Asp Arg Glu Phe Gly Phe Ile Gly Arg Thr Leu Phe His Gly Ile
 370 375 380
 Ile Glu Thr His Val Leu His His Tyr Ile Ser Ser Ile Pro Phe Tyr
 385 390 395 400
 Asn Ala Asp Glu Ala Ser Glu Ala Ile Lys Lys Val Met Gly Ser His
 405 410 415
 Tyr Arg Ser Asp Val Glu Gly Gly Ser Ile Gly Phe Leu Lys Ser Phe
 420 425 430
 Trp Arg Ser Ala Arg Met Cys Gln Phe Val Glu Pro Ser Glu Gly Ala
 435 440 445
 Glu Gly Glu Gly Lys Gly Val Leu Phe Phe Arg Asn His Asn Gly Leu
 450 455 460

ES 2 435 572 T3

Gly Val Gln Pro Arg Lys Leu Asp Ala Ser Gly Lys Pro Val Val Ser
465 470 475 480

Lys Arg Ala Thr Lys Met Glu Val Gly Pro Glu Ser Asp Asn Glu
485 490 495

<210> 18

<211> 21

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 18

atggcctcga ccaccgccg c 21

10 <210> 19

<211> 32

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Cebador

<400> 19

gcggccgcgc catggcctcg accaccgcc gc 32

<210> 20

<211> 20

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 20

25 ttactcgttg tcactctcag 20

<210> 21

<211> 29

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

5 <400> 21

gcggccgcgt tactcgttgt cactctcag 29

<210> 22

<211> 1380

<212> ADN

10 <213> Pythium irregulare

<400> 22

ES 2 435 572 T3

atggtggacc tcaagcctgg agtgaagcgc ctggtgagct ggaaggagat ccgcgagcac 60
 ggcagcggcg cgaccgcgtg gatcgtgatt caccacaagg tctacgacat ctccaagtgg 120
 gactcgcacc cgggtggctc cgtgatgctc acgcaggccg gcgaggacgc cacggacgcc 180
 ttgcgggtct tccaccgctc ctccggcgtc aagctgctcg agcagttcta cgtcggcgac 240
 gtggacgaaa cctccaaggc cgagatcgag ggggagccgg cgagcgacga ggagcgcgcg 300
 cgccgcgagc gcatcaacga gttcatcgcg tctaccgctc gtctgcgcgt caaggtcaag 360
 ggcattggggc tctacgacgc cagcgcgctc tactacgctg ggaagctcgt gagcacgttc 420
 ggcattcgcg tgctctcgat ggcgatctgc ttctttctca acagtttcgc catgtacatg 480
 gtgcgcggcg tgattatggg gctcttctac cagcagtcgg gatggctggc gcacgacttc 540
 ttgcacaacc aggtgtgcca gaaccgcacg ctccggcaacc ttatcggctg cctcgtgggc 600
 aacgcctggc agggcttcag catgcagtgg tggagaaca agcacaacct gcaccacgcg 660
 gtgccgaacc tgcacagcgc caaggacgag ggcttcatcg gcgaccgga catcgacacc 720
 atgccgctgc tggcgtggtc taaggagatg gcgcgcaagg cgttcgagtc ggcgacggc 780
 ccgttcttca tccgcaacca ggcgcttcta tacttccgc tgctgctgct cgcgcgctg 840
 agctggctcg cgcagtcgtt cttctacgtg ttcaccgagt tctcgttcgg catcttcgac 900
 aaggtcgagt tcgacggacc ggagaaggcg ggtctgatcg tgcactacat ctggcagctc 960
 gcgatcccg acttctgcaa catgagcctg tttgagggcg tggcatactt cctcatgggc 1020
 caggcgtcct gcggcttgct cctggcgctg gtgttcagta ttggccacaa cggcatgtcg 1080
 gtgtacgagc gcgaaaccaa gccggacttc tggcagctgc aggtgaccac gacgcgcaac 1140
 atccgcgct cggtattcat ggactggctc accggtggct tgaactacca gatcgaccat 1200
 cacctgttcc cgctcgtgcc gcgccacaac ttgccaaagg tcaacgtgct catcaagtgc 1260
 ctatgcaagg agttcgacat cccgttccac gagaccggct tctgggaggg catctacgag 1320
 gtcgtggacc acctggcgga catcagcaag gaattcatca ccgagttccc agcgatgtaa 1380

<210> 23

<211> 31

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 23

gcggccgcgc catggtggac ctcaagcctg g 31

<210> 24

<211> 27

<212> ADN

<213> Artificial

5 <220>

<223> Cebador

<400> 24

gcggccgtta catcgctggg aactcgg 27

<210> 25

10 <211> 1320

<212> ADN

<213> Thraustochytrium sp.

<400> 25

atgggcaagg gcagcgaggg ccgcagcgcg gcgcgcgaga tgacggccga ggcgaacggc 60
gacaagcgga aaacgattct gatcgagggc gtcctgtacg acgcgacgaa ctttaagcac 120
ccgggcggtt cgatcatcaa cttcttgacc gagggcgagg ccggcggtga cgcgacgcag 180
gcgtaccgcg agtttcatca gcggtccggc aaggccgaca agtacctcaa gtcgctgccg 240
aagctggatg cgtccaaggt ggagtcgcgg ttctcggcca aagagcaggc gcggcgcgac 300
gccatgacgc gcgactacgc ggcctttcgc gaggagctcg tcgcgagggg gtactttgac 360
ccgtcgatcc cgcacatgat ttaccgcgtc gtggagatcg tggcgctctt cgcgctctcg 420
ttctggctca tgtccaaggc ctgcgccacc tcgctcgtgc tggcggtggt gatgaacggc 480
attgcgcagg gccgctgcgg ctgggtcatg cagcagatgg gccacgggtc gttcacgggc 540
gtcatctggc tcgacgaccg gatgtgcgag ttcttctacg gcgtcggctg cggcatgagc 600
gggcactact ggaagaacca gcacagcaag caccacgccg cgcaccaacc cctcgagcac 660
gatgtcgatc tcaacacgct gcccttggtc gcctttaacg agcgcgtcgt gcgcaaggtc 720
aagccgggat cgtcgtggc gctctggctg cgcgtgcagg cgtacctctt tgcgccgctc 780
tcgtgcctgc tcatcggcct tggctggacg ctctacctgc acccgcgcta catgctgcgc 840
accaagcggc acatggagtt cgtctggatc ttgcgcgct acattggctg gttctcgctc 900
atgggcgctc tcggctactc gccgggcacc tcggtcggga tgtacctgtg ctcgttcggc 960
ctcggctgca ttacatttt cctgcagttc gccgtcagcc acacgcacct gccggtgacc 1020
aaccgggagg accagctgca ctggctcgag tacgcggccg accacacggt gaacattagc 1080
accaagtcct ggctcgtcac gtggtggatg tcgaacctga actttcagat cgagcaccac 1140
ctcttcccca cggcgccgca gttccgcttc aaggaaatca gtctcgcgt cgaggccctc 1200
ttcaagcgcc acaacctccc gtactacgac ctgccctaca cgagcgcggt ctcgaccacc 1260
tttgccaatc ttatttcgt cggccactcg gtcggcgccg acaccaagaa gcaggactga 1320

<210> 26

<211> 31

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 26

gcggccgcgc catgggcaag ggcagcgagg g 31

10 <210> 27

<211> 32

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

5 <223> Cebador

<400> 27

gcggccgcgc ctcagtcctg cttcttggtg tc 32

<210> 28

<211> 1086

10 <212> ADN

<213> Phytophthora infestans

<400> 28

atggcgacga aggaggcgta tgtgttcccc actctgacgg agatcaagcg gtcgctacct	60
aaagactgtt tcgaggcttc ggtgcctctg tcgctctact acaccgtgcg ttgtctggtg	120
atcgcggtgg ctctaacctt cggctctcaac tacgctcgcg ctctgcccga ggtcgagagc	180
ttctgggctc tggacgccgc actctgcacg ggctacatct tgctgcaggg catcggtgttc	240
tggggctttct tcacgggtggg ccacgatgcc ggccacggcg ccttctcgcg ctaccacctg	300
cttaacttcg tgggtgggcac tttcatgcac tcgctcatcc tcacgccctt cgagtcgtgg	360
aagctcacgc accgtcacca ccacaagaac acgggcaaca ttgaccgtga cgaggctcttc	420
taccgcgaac gcaaggccga cgaccaccog ctgtctcgca acctgattct ggcgctcggg	480
gcagcgtggc tcgcctatth ggtcgagggc ttccctcctc gtaagggtcaa ccacttcaac	540
ccgttcgagc ctctgttcgt gcgtcagggtg tcagctgtgg taatctctct tctcgccac	600
ttcttcgtgg ccggactctc catctatctg agcctccagc tgggccttaa gacgatggca	660
atctactact atggacctgt ttttgtgttc ggcagcatgc tggtcattac caccttccta	720
caccacaatg atgaggagac cccatggtac gccgactcgg agtggacgta cgtcaagggc	780
aacctctcgt ccgtggaccg atcgtaaggc gcgctcattg acaacctgag ccacaacatc	840
ggcagcgacc agatccacca ccttttcctt atcattccgc actacaaact caagaaagcc	900

ES 2 435 572 T3

actgcggcct tccaccaggc ttccctgag ctcggtcgca agagcgacga gccattatc 960
aaggctttct tccgggttgg acgtctctac gcaaactacg gcgttgtgga ccaggaggcg 1020
aagctcttca cgctaaagga agccaaggcg gcgaccgagg cggcggccaa gaccaagtcc 1080
acgtaa 1086

<210> 29

<211> 31

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 29

gcggccgcgc catggcgacg aaggaggcgt a 31

10 <210> 30

<211> 31

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Cebador

<400> 30

gcggccgcgt tacgtggact tggcttggc c 31

<210> 31

<211> 873

20 <212> ADN

<213> Physcomitrella patens

<400> 31

ES 2 435 572 T3

atggaggtcg tggagagatt ctacggtgag ttggatggga aggtctcgca gggcgtgaat 60
gcattgctgg gtagttttgg ggtggagttg acggatacgc ccactaccaa aggccttgccc 120
ctcgttgaca gtcccacacc catcgtcctc ggtgtttctg tatacttgac tattgtcatt 180
ggagggcctt tgtggataaa ggccagggat ctgaaaccgc gcgcctcgga gccatttttg 240
ctccaagctt tgggtgcttg gcacaacctg ttctgttttg cgctcagtct gtatatgtgc 300
gtgggcatcg cttatcaggc tattacctgg cgggtactctc tctggggcaa tgcatacaat 360
cctaaacata aagagatggc gattctggta tacttggtct acatgtctaa gtacgtggaa 420
ttcatggata ccgttatcat gatactgaag cgcagcacca ggcaaataag ctctctccac 480
gtttatcatc attcttcaat ttccctcatt tgggtgggta ttgctcatca cgctcctggc 540
ggtgaagcat attggtctgc ggctctgaac tcaggagtgc atgttctcat gtatgcgtat 600
tacttcttgg ctgcctgcct tcgaagtagc ccaaagttaa aaaataagta ccttttttgg 660

ggcagggtact tgacacaatt ccaaagtgtc cagtttatgc tgaacttagt gcaggcttac 720
tacgacatga aaacgaatgc gccatatcca caatggctga tcaagatttt gttctactac 780
atgatctcgt tgctgtttct ttccggcaat ttttacgtac aaaaatacat caaacctct 840
gacggaaagc aaaaggagc taaaactgag tga 873

<210> 32

<211> 32

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 32

gcggccgcgc catggaggtc gtggagagat tc 32

10 <210> 33

<211> 28

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Cebador

<400> 33

ES 2 435 572 T3

gcggccgcgt cactcagttt tagtccc 28

<210> 34

<211> 903

<212> ADN

5 <213> *Ostreococcus tauri*

<400> 34

atgagcgccct ccggtgcgct gctgcccgcg atcgcggttcg ccgcgtagcg gtacgcgacg	60
tacgcctacg cctttgagtg gtcgcacgcg aatggcatcg acaacgtcga cgcgcgcgag	120
tggatcggtg cgctgtcggt gaggctcccg gcgatcgca cgacgatgta cctgttggtc	180
tgcctggctg gaccgaggtt gatggcgaag cgcgagcggt tcgacccgaa ggggttcattg	240
ctggcggtaca atgcgtatca gacggcggtt aacgtcgctg tgctcgggat gttcgcgcga	300
gagatctcgg ggctggggca gcccggtgtg gggtaacca tgccgtggag cgatagaaaa	360
tcgtttaaga tcctcctcgg ggtgtggttg cactacaaca accaatattt ggagctattg	420
gacactgtgt tcatggttgc gcgcaagaag acgaagcagt tgagcttctt gcacgtttat	480
catcacgccc tgttgatctg ggcgtggtg ttggtgtgtc acttgatggc cacgaacgat	540
tgtatcgatg cctacttcgg cgcggcggtg aactcggttca ttcacatcgt gatgtactcg	600
tattatctca tgtcggcgct cggcattcga tgcccggtgga agcgatacat caccaggt	660
caaagtctcc aattcgatc tgtcttcgcg cagcccggtg tcgtgctgcg tcagaagcac	720
tgcccggtca ccttccttg ggcgcaaatg ttcgatcga cgaacatgct cgtgctcttc	780
gggaacttct acctcaaggc gtactcgaac aagtcgcgcg gcgacggcgc gagttccgtg	840
aaaccagccg agaccacgcg cgcgcccagc gtgcgacgca cgcgatctcg aaaaattgac	900
taa	903

<210> 35

<211> 32

10 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 35

15 gcggccgcgc catgagcgcc tccggtgcgc tg 32

<210> 36

<211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

5 <220>

<223> Cebador

<400> 36

gcggccgcgt tagtcaattt ttc 23

<210> 37

10 <211> 1560

<212> ADN

<213> Thraustochytrium sp.

<400> 37

ES 2 435 572 T3

atgacggctcg gctacgacga ggagatcccg ttcgagcagg tccgcgcgca caacaagccg 60
gatgacgcct ggtgcgcgat ccacgggcac gtgtacgatg tgaccaagtt cgcgagcgtg 120
caccggggcg gcgacattat cctgctggcc gcaggcaagg aggccaccgt gctgtacgag 180
acttaccatg tgcggggcgt ctcggacgcg gtgctgcgca agtaccgcat cggcaagctg 240
ccggacggcc aaggcgggcg gaacgagaag gaaaagcgga cgctctcggg cctctcgtcg 300
gcctcgtact acacgtggaa cagcgacttt tacagggtaa tgcgcgagcg cgtcgtggct 360
cggctcaagg agcgcgga aa ggcccgccgc ggaggctacg agctctggat caaggcgttc 420
ctgctgctcg tcggcttctg gagctcgtg tactggatgt gcacgctgga cccctcgttc 480
ggggccatcc tggcggccat gtcgctgggc gtctttgccg cctttgtggg cactgtcatc 540
cagcacgacg gcaaccacgg cgctttgcc cagtcgcgat gggtaacaa ggttgccggg 600

tggacgctcg acatgatcgg cgccagcggc atgacgtggg agttccagca cgtcctgggc 660
caccatccgt acacgaacct gatcgaggag gagaacggcc tgcaaaagggt gagcggcaag 720
aagatggaca ccaagctggc cgaccaggag agcgatccgg acgtcttttc cactgacctg 780
atgatgcgcc tgcacccgtg gcaccagaag cgctgggtacc accgtttcca gcacatttac 840
ggccccctca tctttggctt catgaccatc aacaagggtg tcacgcagga cgtcgggtg 900
gtgctcgcga agcggctctt ccagattgac gccgagtgcc ggtacgcgag cccaatgtac 960
gtggcgcggt tctggatcat gaaggcgctc acgggtgctt acatggtggc cctgccgtgc 1020
tacatgcagg gcccggtgga cggcctcaag ctgttcgcga tcgcgcactt tacgtgcggc 1080
gaggtgctcg caaccatggt cattgtgaac cacatcatcg agggcgtctc gtacgcttcc 1140
aaggacggcg tcaagggcac gatggcgccg ccgaagacga tgcacggcgt gacgccccatg 1200
aacaacacgc gcaaggaggt ggaggcggag gcgtccaagt ctggcgccgt ggtcaagtca 1260
gtcccgctcg acgactgggc cgccgtccag tgccagacct cgggtgaactg gagcgtcggc 1320
tcgtggttct ggaatcactt ttccggcggc ctcaaccacc agattgagca ccacctgttc 1380
cccggtctca gccacgagac gtactaccac atccaggacg tcgttcagtc cacctgcgcc 1440
gagtacggcg tcccgtagca gcacgagcct tcgctctgga ccgctactg gaagatgctc 1500
gagcacctcc gtcagctcgg caatgaggag acccacgagt cctggcagcg cgctgcctga 1560

<210> 38

<211> 32

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 38

gcggccgcgc catgacgggc ggctacgacg ag 32

5 <210> 39

<211> 29

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> Cebador

<400> 39

gcggccgcgt caggcagcgc gctgccagg 29

<210> 40

<211> 819

15 <212> ADN

<213> Thalassiosira pseudonana

<400> 40

atggacgcct acaacgctgc tatggacaag attggtgctg ctattattga ctggtctgat	60
cccgatggaa agttccgtgc cgatagagag gactgggtggc tctgcgactt ccgtagcggc	120
atcaccatcg cccatcatcta catcgcccttc gtcacccctcg gttccgcccgt catgcaatcc	180
ctccccgcaa tggatcccta ccccatcaaa ttctcttaca acgtctccca aatcttccct	240
tgtgcctaca tgactgtcga ggcgggattt ttggcctacc gcaatggata tacggtcatg	300
ccttgcaatc atttcaatgt gaatgatcct cccgtggcga atcttctttg gttgttttat	360
atttccaagg tgtgggactt ttgggatacc attttcattg tgttggggaa gaagtggcgt	420
caattatctt tcttgcatgt ataccatcac accaccatct ttctattcta ttggctgaat	480
gccaatgtct tgtacgatgg tgacatcttc cttaccatct tgctcaatgg attcatccac	540
acgggtgatgt acacgtatta cttcatctgt atgcatacca aagattccaa gacgggcaag	600
agtcttcccta tatggtggaa gtcgagtttg acggcgcttc agttgttgca attcactatc	660
atgatgagtc aggctaccta ccttgtcttc cacgggtgtg ataagggtgc gcttcgtatc	720
acgatttgtgt acttttgtga cattttgagt ttgttcttcc tttttgtcga gttctttgtg	780
caatcataca tggcacccaa aaagaagaag agtgcttag	819

<210> 41

<211> 1371

<212> ADN

<213> *Ostreococcus tauri*

5 <400> 41

```

atgtgcgtgg agacggaaaa taacgatggg atccccacgg tggagatcgc gttcgacggt      60
gagcgcgagc gggcggaggc aaacgtgaag ctgtccgcgg agaagatgga gccggcggcg      120
ctggcgaaga cgttcgcgag gcggtacgtc gtgatcgagg ggggtggagta cgatgtgacg      180
gattttaagc acccgggagg aacggttatt ttctatgcgt tgtcaaacac cggggcggac      240
gcgacggaag cgttcaagga gtttcatcat cggtcgagaa aggcgaggaa agccttggcg      300
gcgctcccggt ctgcaccggc caagacggcc aagggtggacg acgcggagat gctccaagat      360
ttcgccaagt ggcggaaaga attggagaga gatggattct tcaagccctc tccggcgcac      420
gtggcgtatc gcttcgccga gctcgcggcg atgtacgtc tcgggacgta cctgatgtac      480
gctcgatacg tcgtctcctc ggtgctcgtg tacgcttgct ttttcggcgc ccgatgcggt      540
tgggtgcagc acgagggcgg acacagctcg ctgacgggca acatttggtg ggacaagcgc      600
atccaggcct tcacagccgg gttcgggtctc gccggtagcg gcgacatgtg gaactcgatg      660
cacaacaagc atcacgcgac gctcaaaaag gttcgtcacg acatggatct ggacaccacc      720

cccgcggtgg cgtttcttcaa caccgcggtg gaagacaatc gtccccgtgg ctttagcaag      780
tactggttgc gccttcaggc gtggaccttc atccccgtga cgtccggctt ggtgctcctt      840
ttctggatgt ttttctcca cccctccaag gctttgaagg gtggcaagta cgaagagttg      900
gtgtggatgc tcgccgcgca cgtcatccgc acgtggacga tcaaggcggg gaccggattc      960
accgcgatgc agtcctacgg cttatTTTTg gcgacgagct gggtgagcgg ctgctatctg      1020
tttgcacact tctccacgtc gcacacgcac ctggatgtgg tgcccgcgga cgagcatctc      1080
tcctgggttc gatacgccgt cgatcacacg atcgacatcg atccgagtca aggttggggtg      1140
aactggttga tgggctacct caactgccaa gtcattccacc acctctttcc gagcatgccg      1200
cagttccgcc agcccgaggt atctcgccgc ttctgtgcct ttgcgaaaaa gtggaacctc      1260
aactacaagg tcatgacctc cgcgggtgcg tggaaggcaa cgctcgaaa cctcgacaac      1320
gtgggtaagc actactacgt gcacggccaa cactccggaa agacggcgta a      1371

```

<210> 42

<211> 26

<212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador degenerado
 5 <220>
 <221> modified_base
 <222> (6)..(6)
 <223> I
 <220>
 10 <221> misc feature
 <222> (6)..(6)
 <223> n es a, c, g, o t
 <220>
 <221> modified_base
 15 <222> (12)..(12)
 <223> I
 <220>
 <221> misc feature
 <222> (12)..(12)
 20 <223> n es a, c, g, o t
 <400> 42
 tgggtntybg cncaygartg yggghca 26
 <210> 43
 <211> 26
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador degenerado
 <220>
 30 <221> modified_base
 <222> (3)..(3)

<223> I
 <220>
 <221> misc feature
 <222> (3)..(3)
 5 <223> n es a, c, g, o t
 <220>
 <221> modified_base
 <222> (9)..(9)
 <223> I
 10 <220>
 <221> misc feature
 <222> (9)..(9)
 <223> n es a, c, g, o t
 <220>
 15 <221> modified_base
 <222> (24)..(24)
 <223> I
 <220>
 <221> misc feature
 20 <222> (24)..(24)
 <223> n es a, c, g, o t
 <400> 43
 ttnggrtcng trtgytgvar raangt 26
 <210> 44
 25 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Cebador
 30 <400> 44
 atgaagacca tgtcgcgctc catgt 25

<210> 45
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> Cebador
 <400> 45
 gacgagcacc tcacctgct tag 23
 <210> 46
 10 <211> 51
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Desaturasa distintiva 1
 15 <220>
 <221> VARIANT
 <222> (1)..(48)
 <223> Xaa es cualquier Aminoácido
 <220>
 20 <221> VARIANT
 <222> (1)..(48)
 <223> Xaa es cualquier aminoácido
 <220>
 <221> misc feature
 25 <222> (49)..(50)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural
 <400> 46

Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa His Xaa Xaa Xaa His
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa
20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Trp Xaa Xaa Xaa His
35 40 45

Xaa Xaa His
50

<210> 47

<211> 17

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Desaturasa distintiva 2

<220>

<221> VARIANT

10 <222> (1)..(15)

<223> Xaa es cualquier aminoácido

<220>

<221> VARIANT

<222> (16)..(16)

15 <223> Xaa es Gln o His

<400> 47

Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

His

<210> 48

<211> 13

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Desaturasa distintiva 3

<220>

<221> VARIANT

5 <222> (1)..(13)

<223> Xaa es cualquier aminoácido

<400> 48

His	Xaa	Xaa	His	His	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Pro	Xaa	Tyr
1				5					10			

<210> 49

10 <211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Desaturasa distintiva 4

15 <220>

<221> VARIANT

<222> (1)..(14)

<223> Xaa es cualquier aminoácido

<400> 49

His	Xaa	Xaa	His	His	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Pro	Xaa	Tyr
1				5					10				

20

<210> 50

<211> 1300

<212> ADN

<213> Hyaloperonospora parasitica

25 <400> 50

```

agtagtgatc ttgtcgccac gcgtcccga ccaagtctca cgtaacacca tttcggaact      60
tgctccgtca gccacaaaaa cgtccatggc gaccaagcaa tcggtcgcgt tcccgaccct      120
cacggacctc aagcggtcgc tcccaagcga gtgcttcgaa tcttcattgc cgctgtcact      180
ctactacacg ctgcgctcgc tcgtgtttgc cggttccttg gctgtaagtc tcagctacgc      240
gctcgcccag ccactcgtcc agaacttcta cccgctccgt gtcgctctaa tcgcgggcta      300
caccgtgttc cagggcgtga tcttctgggg ctttttcacc atcgggtcatg atgccggtca      360
cggcgctttc agccgctacc cgggtgtcaa cttcacgcgc gggacgctca tgcactcgt      420
catcctcacg ccgttcgagt cgtggaaact cagcaccgc caccaccaca agaacacggg      480
caacatcgac cgagacgaga tcttttacct ccaacgggag agcgacgacc acccagtttc      540
tcgccatttg accttcacgc tcggagctgc gtggttcgcc tacctcgtcg aggggtttcc      600
acctcggaac ctcaatcact ataaccggtt cgagccgctc tttgaacgga gagtatctgc      660
tgttatcatc tcaattctcg cccagttttt cgtcgcggga ctctcgatct acctctgctt      720
tcaagtggga gtccaggctg tggcgctcta ttactacgga ccgatctttg tctttggcac      780
gatgctcgtc atcacgacgt ttttgacca caatgacgag gagacgccgt ggtatggaga      840
cgaggactgg tcgtacgtca agggcaacct ctgcgcggtt gatcgggtcat acggaccgct      900
cattgataac ttgagccaca acattggcac gcaccaggct catcacctgt tccccattat      960
tccccactac aagctcaagc ccgcgacagc tgcttttcgt cgtgcttttc ctcacctcgt      1020
acgcaagagt gacgagcggg ttcttcaggc gttttaccgc atcggtcggc tctatgcaaa      1080
gtacggcgtc gccgactcgt cagccaagct gtttacctc aaggaagccc aattgacgtc      1140
gaaagcagca agtgatgcca aagcagctta ggattagcgc tggaagcagt tctcactcat      1200
gcaagacagg ctcacaaaaa cgaacgatgg acggatggat gtggcaagtg atctattgac      1260
agatgaacgg tctacgtcac ttctactcta gtctaacgaa      1300

```

<210> 51

<211> 1086

<212> ADN

5 <213> Hyaloperonospora parasitica

<400> 51

atggcgacca agcaatcggg cgcgttcccc accctcacgg acctcaagcg gtcgctccca	60
agcgagtgtc tcgaatcctc attgccgctg tcaacttact acacgctgcg ctgctcgtg	120
tttgccgggt ccttggctgt aagtctcagc tacgcgctcg cccagccact cgtccagaac	180
ttctaccgcg tccgtgtcgc tctaatecgc ggctacaccg tgttccaggg cgtgatcttc	240
tggggctttt tcaccatcgg tcatgatgcc ggtcacggcg ctttcagccg ctaccgggtg	300
ctcaacttca ccgtcgggac gtcgatgcac tcgctcatcc tcacgccgtt cgagtcgtgg	360
aaactcacgc accgccacca ccacaagaac acgggcaaca tcgaccgaga cgagatcttt	420
tacccccaac gggagagcga cgaccacca gtttctcgcg atttgacctt cagctcggga	480
gctgcgtggt tcgcctacct cgtcgagggg tttccacctc ggaaactcaa tcactataac	540
ccgttcgagc cgctctttga acggagagta tctgctgtta tcatttcaat tctcgcccag	600
tttttcgtcg cgggactctc gatctacctc tgctttcaag tgggagtcca ggctgtggcg	660
ctctattact acggaccgat ctttgtcttt ggcacgatgc tcgtcatcac gacgtttttg	720
caccacaatg acgaggagac gccgtggtat ggagacgagg actgggtcgt cgtcaagggc	780
aacctctcgt cggttgatcg gtcatacggg ccgctcattg ataacttgag ccacaacatt	840
ggcacgcacc aggtccatca cctgttcccc attattcccc actacaagct caagcccgcg	900
acagctgctt ttcgtcgtgc ttttctcac ctcgtacgca agagtgcga gcggattctt	960
caggcgtttt accgcatcgg tcggctctat gcaaagtacg gcgtcgccga ctcgtcagcc	1020
aagctgttta cactcaagga agcccaattg acgtcgaaag cagcaagtga tgccaaagca	1080
gcttag	1086

<210> 52

<211> 361

<212> PRT

5 <213> Hyaloperonospora parasitica

<400> 52

Met Ala Thr Lys Gln Ser Val Ala Phe Pro Thr Leu Thr Asp Leu Lys
1 5 10 15

Arg Ser Leu Pro Ser Glu Cys Phe Glu Ser Ser Leu Pro Leu Ser Leu
20 25 30

Tyr Tyr Thr Leu Arg Ser Leu Val Phe Ala Gly Ser Leu Ala Val Ser
35 40 45

Leu Ser Tyr Ala Leu Ala Gln Pro Leu Val Gln Asn Phe Tyr Pro Leu
50 55 60

Arg Val Ala Leu Ile Ala Gly Tyr Thr Val Phe Gln Gly Val Ile Phe
65 70 75 80

Trp Gly Phe Phe Thr Ile Gly His Asp Ala Gly His Gly Ala Phe Ser
 85 90 95
 Arg Tyr Pro Val Leu Asn Phe Thr Val Gly Thr Leu Met His Ser Leu
 100 105 110
 Ile Leu Thr Pro Phe Glu Ser Trp Lys Leu Thr His Arg His His His
 115 120 125
 Lys Asn Thr Gly Asn Ile Asp Arg Asp Glu Ile Phe Tyr Pro Gln Arg
 130 135 140
 Glu Ser Asp Asp His Pro Val Ser Arg His Leu Thr Phe Thr Leu Gly
 145 150 155 160
 Ala Ala Trp Phe Ala Tyr Leu Val Glu Gly Phe Pro Pro Arg Lys Leu
 165 170 175
 Asn His Tyr Asn Pro Phe Glu Pro Leu Phe Glu Arg Arg Val Ser Ala
 180 185 190
 Val Ile Ile Ser Ile Leu Ala Gln Phe Phe Val Ala Gly Leu Ser Ile
 195 200 205
 Tyr Leu Cys Phe Gln Val Gly Val Gln Ala Val Ala Leu Tyr Tyr Tyr
 210 215 220
 Gly Pro Ile Phe Val Phe Gly Thr Met Leu Val Ile Thr Thr Phe Leu
 225 230 235 240
 His His Asn Asp Glu Glu Thr Pro Trp Tyr Gly Asp Glu Asp Trp Ser
 245 250 255
 Tyr Val Lys Gly Asn Leu Ser Ser Val Asp Arg Ser Tyr Gly Pro Leu
 260 265 270
 Ile Asp Asn Leu Ser His Asn Ile Gly Thr His Gln Val His His Leu
 275 280 285
 Phe Pro Ile Ile Pro His Tyr Lys Leu Lys Pro Ala Thr Ala Ala Phe
 290 295 300
 Arg Arg Ala Phe Pro His Leu Val Arg Lys Ser Asp Glu Arg Ile Leu
 305 310 315 320
 Gln Ala Phe Tyr Arg Ile Gly Arg Leu Tyr Ala Lys Tyr Gly Val Ala
 325 330 335
 Asp Ser Ser Ala Lys Leu Phe Thr Leu Lys Glu Ala Gln Leu Thr Ser
 340 345 350

Lys Ala Ala Ser Asp Ala Lys Ala Ala
355 360

<210> 53

<211> 19

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 53

atggcgacca agcaatcgg 19

10 <210> 54

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Cebador

<400> 54

gcggccgcgc catggcgacc aagcaatcgg 30

<210> 55

<211> 20

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 55

25 ctaagctgct ttggcatcac 20

<210> 56

<211> 29

<212> ADN

<213> Artificial

30 <220>

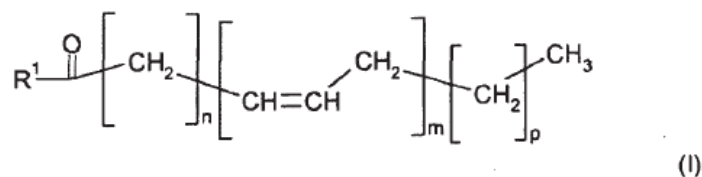
<223> Cebador

<400> 56

gcggccgcgc taagctgctt tggcatcac 29

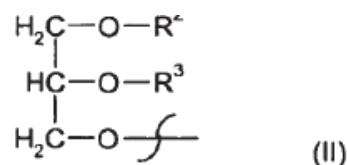
REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido que comprende una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada del grupo que consiste de:
 - (a) secuencia de ácidos nucleicos como se muestra en la SEQ ID NO. 1 o 2, y;
 - 5 (b) secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido que caracteriza una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO. 3; y
 - 10 (c) secuencia de ácidos nucleicos que tiene por lo menos 70% de identidad con la longitud completa de una de las secuencias de ácidos nucleicos de (a) o (b), y que codifica un polipéptido con una actividad de ω 3-desaturasa, en donde dicha secuencia de ácidos nucleicos comprende una secuencia que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 47, en donde en la posición 16 de la SEQ ID NO: 47 está presente un residuo de Histidina.
2. El polinucleótido de acuerdo con reivindicación 1, en donde el polinucleótido consiste de ARN o ADN.
3. Un vector que comprende el polinucleótido de acuerdo con reivindicación 1 o 2.
4. El vector de acuerdo con reivindicación 3, en donde el vector es un vector de expresión.
- 15 5. El vector de acuerdo con reivindicación 3 o 4, en donde el vector comprende por lo menos un polinucleótido adicional que codifica una enzima adicional que está involucrada en la biosíntesis de lípidos o ácidos grasos.
6. Una célula anfitriona que comprende el polinucleótido de acuerdo con reivindicación 1 o 2 o el vector de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5.
7. La célula anfitriona de acuerdo con reivindicación 6, en donde la célula anfitriona adicionalmente comprende por lo menos una enzima adicional que está involucrada en la biosíntesis de lípidos o ácidos grasos.
- 20 8. El vector de acuerdo con reivindicación 5 o la célula anfitriona de acuerdo con reivindicación 7, en donde la enzima se selecciona del grupo que consiste de: acil-CoA de hidrogenasa, acil-ACP [= proteína portadora de acilo] desaturasa, acil-ACP tiesterasa, ácido graso aciltransferasa, acil-CoA:lisofosfolíido aciltransferasa, ácido graso sintasa, ácido graso hidroxilasa, acetil-coenzima A carboxilasa, acil-coenzima A oxidasa, ácido graso desaturasa, ácido graso acetilasa, lipoxigenasa, triacilglicerol lipasa, óxido de aleno sintasa, hidroperóxido liasa, ácido graso elongasa, Δ 4-desaturasa, Δ 5-desaturasa, Δ 6-desaturasa, Δ 8-desaturasa, Δ 9-desaturasa, Δ 12-desaturasa, Δ 5-elongasa, Δ 6-elongasa y Δ 9-elongasa.
- 25 9. Un método para generar un polipéptido con actividad de desaturasa, que comprende las etapas:
 - (a) expresar un polinucleótido de acuerdo con reivindicación 1 o 2 en una célula anfitriona; y
 - (b) obtener, de la célula anfitriona, el polipéptido que se codifica por el polinucleótido de acuerdo con (a).
- 30 10. Un polipéptido que se codifica por el polinucleótido de acuerdo con reivindicación 1 o 2 o que se puede obtener mediante el método de acuerdo con reivindicación 9.
11. Un anticuerpo que reconoce específicamente el polipéptido de acuerdo con reivindicación 10.
12. Un organismo transgénico, no humano que comprende el polinucleótido de acuerdo con reivindicación 1 o 2, el vector de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 o la célula anfitriona de acuerdo con reivindicación 6 o 7.
- 35 13. El organismo transgénico, no humano de acuerdo con reivindicación 12, en donde el organismo es un animal, una planta o un microorganismo multicelular.
14. Un proceso para la producción de una sustancia que tiene la estructura mostrada en la fórmula I adelante



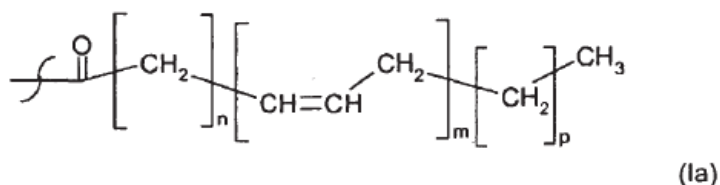
en donde las variables y sustituyentes son como sigue:

R^1 = hidroxilo, coenzima A (tiéster), lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, lisofosfatidilglicerol, lisodifosfatidilglicerol, lisofosfatidilserina, lisofosfatidilinositol, base de esfingo o un radical de la fórmula II



R^2 = hidrógeno, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, difosfatidilglicerol, fosfatidilserina, fosfatidilinositol o alquilcarbonilo C_2 a C_{24} saturado o insaturado,

R^3 = hidrógeno, un alquilcarbonilo saturado o insaturado C_2 a C_{24} , o R^2 y R^3 independientemente de otro son un radical de la fórmula Ia:



$n = 2, 3, 4, 5, 6, 7$ o 9 , $m = 2, 3, 4, 5$ o 6 y $p = 0$ o 3 ; y en donde el proceso comprende el cultivo de (i) una célula anfitriona de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5 o (ii) de un organismo transgénico o humano de acuerdo con reivindicación 12 o 13 bajo condiciones que permiten la biosíntesis de la sustancia.

15. Un proceso para la producción de un aceite, lípido o composición de ácido graso, que comprende las etapas del proceso de acuerdo con reivindicación 14 y la etapa adicional de formular la sustancia como un aceite, lípido o composición de ácido graso.

16. El proceso de acuerdo con reivindicación 15, en donde el aceite, lípido o composición de ácido graso se formula adicionalmente para dar un fármaco, un producto cosmético, un alimento, una comida para animales, preferiblemente comida para peces, o un suplemento alimenticio.

20. 17. El uso de el polinucleótido de acuerdo con reivindicación 1 o 2, del vector de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, de la célula anfitriona de acuerdo con reivindicación 6 o 7, del vector o la célula anfitriona de acuerdo con reivindicación 8, del polipéptido de acuerdo con reivindicación 10 o del organismo transgénico, no humano de acuerdo con reivindicación 12 o 13 para la producción de un aceite, lípido o composición de ácido graso.

25. 18. El uso de acuerdo con reivindicación 17, en donde el aceite, lípido o composición de ácido graso es para ser empleado como un fármaco, un producto cosmético, un alimento, una comida para animales, preferiblemente comida para peces, o un suplemento alimenticio.