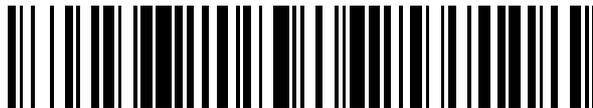


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 579 384**

21 Número de solicitud: 201530156

51 Int. Cl.:

**C12N 1/19** (2006.01)

**C12P 7/04** (2006.01)

**C12N 9/02** (2006.01)

**C12R 1/645** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

**10.02.2015**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**10.08.2016**

Fecha de concesión:

**30.06.2017**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**07.07.2017**

73 Titular/es:

**NEOL BIOSOLUTIONS, S.A. (100.0%)  
Parque Tecnológico de la Salud, Avenida de la  
Innovación, 1  
18016 Armilla (Granada) ES**

72 Inventor/es:

**FILLET, Sandy Christiane ;  
RONCHEL BARRENO, M<sup>a</sup> Del Carmen ;  
SUÁREZ GONZÁLEZ, Beatriz ;  
LARA CAMBIL, Armando ;  
ADRIO FONDEVILA, José Luis y  
VELASCO ÁLVAREZ, Javier**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

54 Título: **Producción de alcoholes grasos**

57 Resumen:

Producción de alcoholes grasos.

La presente invención se refiere a la producción de alcoholes grasos mediante el cultivo de un microorganismo de la especie *Rhodospidium toruloides*, mediante la inserción de un gen que codifica una enzima con actividad acil-Coa reductasa que permite producir alcoholes grasos en presencia de diferentes fuentes de carbono.

ES 2 579 384 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP 11/1986.

## DESCRIPCIÓN

Producción de alcoholes grasos

### 5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a la producción de alcoholes grasos mediante el cultivo de un microorganismo en presencia de diferentes fuentes de carbono.

### 10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los ácidos grasos son importantes precursores de valiosos compuestos químicos y de carburantes que, en la actualidad, se obtienen a partir de fuentes petroquímicas o de aceites vegetales. Mientras que el uso de los ácidos grasos libres está generalmente limitado debido a la naturaleza iónica de su grupo carboxilo, sus derivados (ej. alcoholes grasos, ceras, aldehídos grasos,  $\alpha$ -olefinas) son utilizados para producir surfactantes, lubricantes, carburantes, biomateriales u otros compuestos incluidos en muchos productos consumibles.

El mercado mundial de los alcoholes grasos alcanzó un valor de unos 5,2 billones de dólares en el año 2011 y se prevé una tasa de crecimiento del 4% anual durante los próximos diez años. En la actualidad los alcoholes grasos se producen mayoritariamente a partir de aceites vegetales o grasas, fundamentalmente coco, palma, semilla de palma, sebo y manteca, mediante dos procedimientos químicos: el primero parte de ácidos grasos libres y el segundo de ésteres metílicos de dichos ácidos grasos. Ambos casos requieren una etapa de esterificación (o transesterificación) catalítica y otra posterior de hidrogenación. Estas fuentes naturales tienen diferentes composiciones de ácidos grasos siendo especialmente importante la longitud de las cadenas acilo presentes en los mismos. La longitud de las cadenas de estos alcoholes tiene un gran impacto en las propiedades físicas y químicas de estas moléculas y, por ello, dicha longitud de cadena establece su posible uso para diferentes aplicaciones. Por ello, con el fin de obtener las fracciones conteniendo una longitud de cadena determinada, normalmente es necesario fraccionar por destilación la mezcla de alcoholes grasos mediante un proceso que demanda mucha energía.

Los alcoholes grasos también se pueden obtener mediante hidratación química de  $\alpha$ -oleínas producidas a partir de fuentes petroquímicas. Entre los procesos utilizados para realizar esta transformación se encuentran los procesos ALFOL<sup>®</sup>, desarrollado por Conoco, y EFAL<sup>®</sup> (BP/Amoco). Ambos son los denominados procesos Ziegler y se basan en el uso de

catalizadores orgánicos de alúmina. Otro proceso para sintetizar alcoholes grasos es el llamado proceso Oxo (hidroformilación) que consiste en hacer reaccionar las olefinas con una mezcla de hidrógeno y CO en presencia de un catalizador.

- 5 Todos estos procesos requieren condiciones de reacción severas, tiempos prolongados, equipamiento costoso, liberan compuestos peligrosos al medio ambiente y están a expensas de la fluctuación del precio de las materias primas.

10 Por todo ello, la producción de alcoholes grasos y otros derivados de ácidos grasos, a partir de microorganismos se está convirtiendo en una alternativa atractiva debido a la capacidad de los enzimas microbianos para utilizar materias primas renovables, controlar la longitud de la cadena del producto, añadir modificaciones a las moléculas y, además, no utilizar aceites de plantas como materia prima evitando de esta forma la competición entre el uso de dichos aceites como alimentos frente a su aplicación en el sector oleoquímico.

15

Las enzimas capaces de reducir substratos acil-tioésteres grasos (ej. acil-CoA grasos, o acil-ACP grasos) a sus correspondientes alcoholes grasos se les denomina comúnmente como reductasas de acil-CoA grasos (fatty acil-CoA reductases o "FARs"). Estas enzimas están presentes en numerosos tipos de organismos, incluyendo, bacterias, hongos, algas, mamíferos, plantas, insectos, crustáceos y gusanos. En la naturaleza, los alcoholes grasos producidos por las acil-CoA reductasas son, a menudo, incorporados en ceras, cutículas, u otras estructuras que sirven de barrera hidrofóbica a la entrada de agua y, también, para reducir el riesgo de infección por patógenos. En ciertos organismos los alcoholes grasos pueden ser también incorporados a ésteres de ceras como lípidos de almacenamiento, o como secreciones glandulares.

25

Las reductasas de acil-CoA grasos se puede dividir en dos clases: las que forman aldehídos y las que forman alcoholes (Metz et al. 2000. Plant Physiol, 122: 635-644). Las primeras catalizan la reducción de dos electrones de las formas activas de los ácidos grasos a aldehídos grasos como, por ejemplo, la reductasa de *Acinetobacter* sp M-1 (Reiser y Somerville. 1997. J Bacteriol, 179: 2969-75; Ishige et al. 2002. Appl Environ Microbiol, 68: 1192-5), o la de la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 680 (Steen et al. 2010. Nature, 463: 559-562).

30

Las segundas catalizan la reducción de cuatro electrones de las formas activas de los ácidos grasos para producir directamente alcoholes grasos. Este es el caso de la reductasa

de *Simmonsia chinensis* (jojoba) (Metz et al. 2000. Plant Physiol, 122: 635-644), o de aquellas presentes en animales como ratones, pájaros, humanos o nematodos (Cheng et al. 2004. J Biol Chem, 279: 37789-97; Moto et al. 2003. Proc Natl Acad Sci USA, 100: 9156-61; Hellenbrand et al. 2011. BMC Biochem, 12: 64).

5

La biosíntesis de los alcoholes grasos utiliza fundamentalmente la ruta de síntesis *de novo* de ácidos grasos presentes en los microorganismos. Por ello, esta ruta ha sido el objetivo de diferentes estrategias de ingeniería metabólica para producir alcoholes grasos.

*Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* son los microorganismos modelo más intensamente estudiados y ampliamente utilizados en el desarrollo de estrategias de ingeniería metabólica dirigidas a la producción de metabolitos de valor añadido. Ambos tienen varias ventajas clave como bajos niveles de riesgo, altas tasas de crecimiento, buena trazabilidad, y han sido ampliamente utilizados en diversos procesos industriales.

*Escherichia coli* es, por el momento, el microorganismo de referencia en el desarrollo de procesos para la producción de alcoholes grasos (Lennen y Pfeleger. 2013. Curr Opin Biotechnol, 24: 1044-1053). Los diferentes estudios se han centrado en optimizar la producción de ácidos grasos, en limitar su metabolismo y en expresar diferentes enzimas endógenas o heterólogas que conducen a la formación de estos compuestos. Así, el documento US 2014336423 describe la construcción de cepas productoras de alcoholes grasos saturados (C12:0-C18:0) que portan diferentes acil-ACP tioesterasas de plantas, genes de la ruta de biosíntesis de ácidos grasos (FabZ, FabI, FabF y FabD) de diferentes bacterias, además de acil-CoA reductasas procedente de bacterias marinas (pertenecientes a los géneros *Marinobacter*, *Marinomonas*, *Oceanobacter*, etc.), de plantas (ej. *Arabidopsis thaliana*, *Simmonsia chinensis*) u otros organismos. La producción de alcoholes grasos alcanzada, dependiendo de la cepa productora, fue de 1,5-4,5 g/L conteniendo entre un 50-80% de alcoholes saturados).

El documento US20130245339 describe el uso de cepas productoras de alcoholes lineales o ramificados. Para ello incluyen la clonación y expresión de genes como tioesterasas de plantas, acil-CoA reductasas formadoras de aldehídos o alcoholes, o el operon Bkd ( $\alpha$ -ceto ácido deshidrogenasa de cadenas ramificadas). La producción alcanzó 1-10 mg/L. El documento US20140093929 describe la producción de alcoholes grasos mediante la expresión de variantes de las acil-CoA reductasas formadoras de alcoholes de *Marinobacter aquaeolei* y *Marinobacter algicola*. Bajo las mejores condiciones de cultivo, las variantes con mayor actividad lograron producir entre 0,2 y 1,2 g/L de alcoholes grasos.

35

La sobreexpresión de la tioesterasa TesA', de FadD, y la expresión de *acr1*, una acil-CoA reductasa de *Acinetobacter calcoaceticus* en una cepa de *Escherichia coli*  $\Delta$ *fadE* permitió producir 100 mg/L de alcoholes grasos C16 y C18 (Steen et al. 2010. Nature, 463: 559-562). La optimización de los niveles de expresión de la tioesterasa de *Umbellularia californica*, de

5 *fadD*, y de la acil-CoA reductasa de *Acinetobacter calcoaceticus* permitieron lograr una cepa de *E. coli* capaz de producir 450 mg/L de alcoholes C12/C14, un 75% del total de los alcoholes grasos producidos (598 mg/L) (Zheng et al. 2012. Microbial Cell Factories, 11:65-76).

10 Alcoholes grasos de diferentes longitudes de cadena se obtuvieron al utilizar dos acil-CoA reductasas de amplia especificidad de sustrato procedentes de *Marinobacter aquaeolei* VT8 (Liu et al. 2013. Appl Microbiol Biotechnol, 97: 7061-7071). La mejor cepa productora, que también expresaba la tioesterasa modificada TesA y la acil-CoA ligasa (FadD) de *E. coli*, fue capaz de producir 1,75 g/L de alcoholes grasos.

15 Utilizando una cepa que sobre-expresaba la tioesterasa de *Umbellularia californica*, la acil-CoA ligase (FadD) nativa y la acil-CoA reductase de *Marinobacter aquaeolei* VT8, Youngquist et al (Youngquist et al. 2013. Metab Eng, 20:177-186) lograron producir 1,55 g/L de 1-dodecanol y de 1-tetradecanol con un rendimiento de 0,13 (g alcohol graso/g glucosa).

20 *Saccharomyces cerevisiae* es otro de los organismos modelo ampliamente utilizado en el desarrollo de procesos industriales. *S. cerevisiae*, en comparación con *E. coli*, presenta una serie de ventajas como poder cultivarse hasta densidades celulares más altas, tener un mejor comportamiento a baja temperatura y pH (Aronsson y Ronner, 2001; Ageitos et al.,

25 2011), y estar mejor adaptada para la expresión funcional de enzimas eucariotas (muchas de las enzimas implicadas en la producción de ácidos grasos son del reino de las plantas) debido a sus sistemas de endomembranas y modificaciones post-translacionales (Ageitos et al., 2011). Sin embargo, en muchos casos, por causas desconocidas, los rendimientos de producción de compuestos derivados de los ácidos grasos producidos por cepas

30 recombinantes de *S. cerevisiae* son mucho menores que los alcanzados en *E. coli* cuando se expresan idénticos genes heterólogos.

La producción de alcoholes grasos en *S. cerevisiae* se realiza siguiendo estrategias similares a las empleadas en *E. coli*. La expresión de la reductasa de acil-CoA grasos de ratón (mFAR1) bajo el promotor constitutivo TEF1 permitió lograr una producción de 93 mg/L

35 de alcoholes grasos (Runguphan y Keasling. 2014. Metab Eng, 21: 103-113). La posterior

expresión de la enzima málica para incrementar el pool citosólico de NADPH logró incrementar ligeramente la producción hasta 98 mg/L. Los alcoholes grasos producidos fueron mayoritariamente cetil (C16-OH) y estearil (C18-OH).

5 Debido a que la diacilglicerol acil transferasa (DAGAT) es la enzima que limita la tasa de síntesis de triglicéridos a partir de los acil-CoA grasos, la regulación de esta enzima puede alterar los niveles de producción de estos acil-CoA grasos. La disrupción génica del gen *dga1*, que codifica la diacilglicerol aciltransferasa, y la expresión heteróloga de la acil-CoA reductasa (TaFAR) de la lechuga común permitieron producir 49 mg/L de alcoholes grasos  
10 (Tang y Chen. 2014. *Biotechnol Bioeng*, 112: 386-392). El control de la relación carbono/nitrógeno en el medio de cultivo permitió incrementar la producción hasta alcanzar 84 mg/L.

En otro estudio, Feng et al (Feng et al. 2015. *Metab Eng*, 27: 10-19), lograron alcanzar una  
15 producción de 1,1 g/L de alcoholes grasos en un cultivo en modo fed-batch. Para ello, construyeron una cepa en la que realizaron modificaciones tanto de genes estructurales como reguladores del metabolismo lipídico de la levadura. En concreto expresaron la acil-CoA reductasa (TaFAR) de lechuga común, sobre-expresaron la ACC1 (acetil-CoA carboxilasa), deleccionaron un regulador negativo de la síntesis de fosfolípidos (RPD3) e  
20 incrementaron la concentración de acetil-CoA citoplasmático mediante la expresión de la ACL (ATP citrato liasa) de *Yarrowia lipolytica*.

Las cianobacterias también han sido recientemente utilizadas para la producción de alcoholes grasos. Los documentos US20110195469 y US20148633002 describen el uso de  
25 cepas recombinantes de este microorganismo capaces de producir <100 mg/L. Las modificaciones incluyen la expresión de acil-CoA reductasas formadoras de alcoholes truncadas en el extremo amino (ej. FAR6 y MS2 de *Arabidopsis*), o acil-CoA reductasas procedentes de bacterias (ej. *Marinobacter*, *Acinetobacter*), así como diferentes proteínas transportadoras.

30 Los microorganismos oleaginosos que incluyen bacterias, levaduras, cianobacterias, microalgas y hongos filamentosos, se definen por su capacidad para acumular, al menos, un 20% de su peso seco en forma de lípidos (Ratledge y Wynn. 2002. *Avd. Appl. Microbiol.* 51: 1-51; Ratledge. 2004. *Biochemie.* 86: 807-815). Esta característica hace que estos  
35 microorganismos se consideren como unos candidatos muy atractivos para ser utilizados

como cepas hospedadoras para la producción de diferentes compuestos derivados de ácidos grasos, incluyendo los alcoholes grasos.

Las bacterias oleaginosas han sido las menos estudiadas hasta la fecha debido a que su contenido en lípidos es relativamente más bajo que en levaduras, cianobacterias, microalgas y hongos filamentosos; y también están limitadas por sus bajas tasas de crecimiento. Las cianobacterias y microalgas oleaginosas son hospedadores atractivos para la producción de derivados de ácidos grasos principalmente por su capacidad fotosintética que les permite convertir la energía solar y reciclar el CO<sub>2</sub> en biocarburantes. Así, la cianobacteria *Synechococcus elongatus* sp. PCC 7942 ha sido modificada para producir diferentes compuestos relacionados con biocarburantes como 1-butanol (Lan y Liao. 2012. Proc Natl Acad Sci, 109: 6018-6023) o isobutanol (Atsumi et al. 2010. Appl Microbiol Biotechnol, 85: 651-657). Sin embargo, ambos tipos son técnicamente difíciles de manipular y sus procesos de cultivo y de crecimiento son más complicados que los de bacterias, levaduras y hongos. Estas dificultades son las que han impedido su uso en la producción de compuestos derivados de ácidos grasos a través de ingeniería metabólica. De forma similar, la explotación de hongos filamentosos oleaginosos como organismos de producción también ha sido impedida por la falta de técnicas de transformación eficientes. Por ello, las levaduras oleaginosas tienen muchas ventajas sobre los otros organismos productores lo que hace que estos microorganismos se consideren las factorías celulares más prometedoras para la producción de derivados de ácidos grasos.

Entre este tipo de microorganismos se encuentran varios géneros como *Yarrowia*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, y *Lipomyces*. Varias especies pertenecientes a estos géneros pueden crecer hasta altas densidades celulares y son capaces de acumular hasta un 70% de su peso seco en forma de lípidos (Ageitos et al. 2011. Appl. Microbiol. Biotechnol. 90: 1219-1227; Beopoulos et al. 2011. Appl. Microbiol. Biotechnol. 90: 1193-1206).

Los documentos WO2009118438 y WO2014198988 describen la producción de triglicéridos (aceites) a partir de diferentes tipos de fuentes de carbono, incluyendo glicerina cruda industrial o hidrolizados de diferentes tipos de biomasa lignocelulósica, respectivamente. El alto contenido en aceite (más de un 60% del peso celular) convierte a estas cepas en unas excelentes candidatas a la hora de ser utilizadas como hospedadoras para la producción de compuestos derivados de los ácidos grasos, incluyendo los alcoholes

grasos. Además, el documento WO2014198988 describe la obtención, mediante rondas de mutación y selección, de la cepa CECT 13085 capaz de metabolizar de forma más rápida la xilosa.

- 5 Sin embargo, a pesar de estos avances, permanece el reto de lograr un alto rendimiento, producción y productividad para los alcoholes grasos y lograr que estos procesos puedan llegar a ser competitivos con los utilizados hoy en día.

## SUMARIO DE LA INVENCION

10

Los autores de la presente invención han modificado genéticamente un microorganismo de la especie *Rhodospiridium toruloides*, mediante la inserción de un gen que codifica una enzima con actividad acil-Coa reductasa que permite producir alcoholes grasos. La producción de alcoholes grasos mediante el empleo de dicho microorganismo permite

15 alcanzar rendimientos elevados por encima de 1 g/L en el caldo de cultivo.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención se relaciona con un microorganismo de la especie *Rhodospiridium toruloides* modificado genéticamente con un gen que codifica una enzima con actividad acil-CoA reductasa, en donde dicha enzima

20 tiene capacidad de producir alcoholes grasos.

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un procedimiento para obtener una biomasa microbiana rica en alcoholes grasos que comprende:

- 25
- i) cultivar el microorganismo de la invención en un medio de cultivo que comprende al menos una fuente de carbono y al menos una fuente de nitrógeno en condiciones adecuadas para el crecimiento de dicho microorganismo; y
  - ii) separar la biomasa microbiana del caldo de cultivo.

30

En otro aspecto, la invención se relaciona con una biomasa microbiana rica en alcoholes grasos obtenible según el procedimiento para obtener alcoholes grasos de la invención.

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un procedimiento para obtener una

35 preparación enriquecida en alcoholes grasos que comprende:

i) cultivar el microorganismo de la invención en un medio de cultivo que comprende al menos una fuente de carbono y al menos una fuente de nitrógeno en condiciones adecuadas para el crecimiento de dicho microorganismo;

5 ii) separar la biomasa microbiana del caldo de cultivo; y

iii) extraer los alcoholes grasos de la biomasa microbiana y/o del medio de cultivo obtenidos en la etapa (ii)

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para obtener biosurfactantes que comprende:

10 i) cultivar un microorganismo de la invención en un medio de cultivo que comprende al menos una fuente de carbono y al menos una fuente de nitrógeno en condiciones adecuadas para el crecimiento de dicho microorganismo;

ii) separar la biomasa microbiana del caldo de cultivo;

15 iii) extraer los alcoholes grasos de la biomasa microbiana y/o del caldo de cultivo obtenidos en la etapa (ii); y

iv) convertir la mezcla de alcoholes grasos obtenidos en la etapa (iii) en biosurfactantes.

20 En otro aspecto, la presente invención se relaciona con el uso del microorganismo según la invención para obtener una biomasa microbiana enriquecida en alcoholes grasos según el primer procedimiento de la invención.

25 En otro aspecto, la presente invención se relaciona con el uso del microorganismo según la invención para obtener una preparación rica en alcoholes grasos según el segundo procedimiento de la invención.

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con el uso del microorganismo según la invención para obtener biosurfactantes según el tercer procedimiento de la invención.

### 30 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

**Figura 1:** plásmido integrativo pNEOL102

**Figura 2:** Producción de alcoholes grasos en diferentes medios de cultivo.

### 35 **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

Microorganismo de la invención

En un primer aspecto, la presente invención se relaciona con un microorganismo, en adelante “microorganismo de la invención”, en donde el microorganismo pertenece a la especie *Rhodospiridium toruloides* modificado genéticamente con un gen que codifica una enzima con actividad acil-CoA reductasa, en donde dicha enzima tiene capacidad de producir alcoholes grasos.

El término “microorganismo” o “microbio”, tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a un organismo microscópico con capacidad de producir alcoholes grasos, que puede ser unicelular o multicelular. En particular, el microorganismo de la invención es una levadura de la especie *Rhodospiridium toruloides*.

El término “gen”, tal y como se usa en el presente documento, se refiere a una cadena de desoxirribonucleótidos que codifica una proteína. En el caso concreto de la invención, dicho término se refiere a una cadena de desoxirribonucleótidos que codifica una enzima acil-CoA reductasa con capacidad de producir alcoholes grasos.

El término “enzima”, en el contexto de la presente invención, se refiere a una proteína que funciona como un catalizador altamente selectivo, acelerando tanto la velocidad como la especificidad de la reacción metabólica para la cuál es específica.

En concreto, el microorganismo de la invención es un microorganismo modificado genéticamente. El término “microorganismo modificado genéticamente” como se usa en el presente documento, se refiere a un microorganismo cuyo material genético se ha alterado usando técnicas de ingeniería genética. Según esto, dicho microorganismo genéticamente modificado expresa una enzima que tiene una actividad acil-CoA reductasa, comparado con un microorganismo control no modificado correspondiente de la misma cepa. En el contexto de la presente invención, la enzima que tiene actividad acil-CoA reductasa puede estar codificada por un gen que codifica dicha enzima en otro organismo. Generalmente, el gen que codifica una enzima que tiene actividad acil-CoA reductasa se puede introducir en el microorganismo en cualquier forma adecuada, por ejemplo, comprendido en un vector, un plásmido o como ácido nucleico desnudo. Después de ser introducido en el microorganismo, el gen se puede expresar de modo exógeno si se expresa en un vector/plásmido en el microorganismo [es decir, fuera de del/de los cromosoma(s) microbiano(s)], o se puede incorporar en el/los cromosoma(s) microbiano(s) por recombinación aleatoria (ectópica) u

homóloga o cualquier otro método adecuado conocido en el estado de la técnica. Técnicas apropiadas que permiten la transformación genética en levaduras incluyen pero no están limitadas a:

- 5 - Transformación de esferoplastos que supone eliminar la pared celular de la levadura y poner en contacto los esferoplastos con el plásmido en presencia de PEG.
- Transformación con  $\text{Li}^+$ , que supone el tratamiento de las células de levadura con cationes alcalinos monovalentes ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{Cs}^+$  y  $\text{Li}^+$ ) en combinación con PEG para estimular la captación de ADN por las células intactas.
- 10 - Bombardeo génico que supone bombardear las células con microproyectiles recubiertos con el ADN exógeno.
- Electroporación, que supone administrar pulsos eléctricos a las levaduras que produce la apertura de poros en la membrana de los esferoplastos y células de levadura intactas.
- 15 - Transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT) se basa en el empleo de la capacidad de transferencia génica que *A. tumefaciens* posee de forma natural.

Los transformantes se hacen crecer en un medio nutriente adecuado y bajo condiciones de selección para asegurar la retención del ADN endógeno. La inserción del gen que codifica una acil-CoA reductasa en dichos transformantes puede determinarse mediante cualquier  
20 técnica de biología molecular apropiada para ello, por ejemplo, mediante Southern blot o PCR. Métodos convencionales de detección y cuantificación de la expresión de un gen pueden encontrarse, por ejemplo, en Sambrook y cols., 2001. "Molecular cloning: a Laboratory Manual", 3<sup>rd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., Vol. 1-3.

El término "acil-CoA reductasa", o "reductasa de acil-CoA grasos" tal y como se utiliza en el  
25 presente documento, se refiere a polipéptidos que tienen la capacidad de reducir las moléculas de acil-CoA grasos a los correspondientes alcoholes (E.C. 1.2.1.50). Las acil-CoA que reducen las moléculas de acil-CoA grasos a los correspondientes alcoholes grasos catalizan la reacción mediante la reducción de cuatro electrones de las formas activas de los ácidos grasos para dar lugar a alcoholes grasos.

30 El término "alcohol graso", como se utiliza en el presente documento, se refiere a alcoholes de cadena de entre 4 a 26 átomos de carbono, derivados de grasas y aceites naturales. Ejemplos ilustrativos, no limitativos de alcoholes grasos de acuerdo a la presente invención incluyen, 1-hexanol (o alcohol hexílico), heptanol (o alcohol heptílico). 1-octanol (o alcohol caprílico), 2-etilhexanol, 1-nonanol (o alcohol pelargónico), 1-decanol (o alcohol cáprico o  
35 caprílico).

alcohol decílico), dodecanol (alcohol láurico), 1-tridecanol (alcohol tridecílico), 1-tetradecanol (alcohol miristílico), 1-pentadecanol (alcohol pentadecílico), 1-hexadecanol (alcohol cetílico o alcohol palmítico), cis-9-hexadecen-1-ol (o alcohol palmitoleico, 1-heptadecanol (o alcohol pentadecílico), 1-octadecanol (o alcohol esteárilico o alcohol octadecílico), cis-9-octadecen-1ol (o alcohol oleico), 1 nonadecanol (o alcohol nonadecílico), 1-eicosanol (o alcohol araquidílico) , docosanol (o alcohol behénico), 1-tetracosanol (alcohol lignocérico) o 1 hecacosanol (o alcohol cérico).

En una realización particular y preferida de la invención, el gen que codifica la enzima que tiene actividad acil-CoA reductasa tiene codones optimizados, para la expresión en el microorganismo recombinante, es decir en *R. toruloides*. En la técnica se conocen codones que pueden ser empleados para la expresión de genes en *R. toruloides*. Ejemplos ilustrativos no limitativos de codones optimizados que pueden ser empleados para la expresión de genes en incluyen: UUU, UUC, UUA,UUG, CUU, CUC, CUA, AUU,AUC, AUG, GUU,GUC, GUA o GUG (Codon usage database, data source: NCBI-GenBank). En este contexto de la invención, el microorganismo genéticamente modificado se cultiva en las condiciones adecuadas que permitan la expresión del gen que tiene actividad acil-CoA reductasa y de esta manera, producir alcoholes grasos. Los medios de cultivo adecuados para el crecimiento apropiado de diferentes microorganismos se conocen bien en la técnica. Normalmente dichos medios de cultivo comprenden fuentes de carbono, como, por ejemplo, glucosa, xilosa, sacarosa, glicerina, y fuentes de nitrógeno apropiadas como, por ejemplo, extracto de levadura, peptona, sales de amonio, líquido macerado de maíz, urea o glutamato sódico.

Preferiblemente, dicho gen se introduce en un vector de expresión o construcción de ADN replicativa que permite la expresión del gen que codifica una enzima con actividad acil-CoA reductasa según la presente invención y que incluye una unidad transcripcional que comprende el ensamblaje de (1) elemento(s) genético(s) que desempeña(n) un papel regulador en expresión génica, por ejemplo, promotores, operadores o potenciadores, operativamente unidos a (2) la secuencia del gen que codifica una enzima con actividad acil-CoA reductasa según la invención y que se transcribe a ARN mensajero y se traduce a proteína y (3) secuencias adecuadas para iniciar y terminar la transcripción y la traducción. Los vectores que se pueden usar en el contexto de la presente invención normalmente incluyen un marcador genético, un origen de replicación en bacterias o levaduras, sitios múltiples de clonación y un marcador genético. El marcador genético es habitualmente un gen que confiere resistencia a un antibiótico, por ejemplo ampicilina o geneticina, o

alternativamente, un marcador auxotrófico en el caso de levaduras. Tales elementos reguladores pueden incluir una secuencia operadora para controlar la transcripción. La capacidad de replicarse en un huésped, habitualmente conferida por un origen de replicación, y un gen de selección para facilitar el reconocimiento de transformantes se pueden incorporar adicionalmente. Las regiones de ADN están operativamente unidas cuando están funcionalmente relacionadas entre sí. Por ejemplo, el ADN para un péptido señal está operativamente unido al ADN para un polipéptido si se expresa como un precursor que participa en la secreción del polipéptido; un promotor está operativamente unido a una secuencia codificante si controla la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosomas está operativamente unido a una secuencia codificante si está colocado de modo que permita la traducción. Las secuencias reguladoras útiles para la presente invención pueden ser secuencias promotoras nucleares o, de forma alternativa, secuencias potenciadoras y/o secuencias reguladoras que aumentan la expresión de la secuencia de nucleótidos, secuencias supresoras, sitios de inicio transcripcional, sitios de parada transcripcional, sitios de poliadenilación y similares. En la técnica se conocen un gran número de secuencias de control de la expresión y se pueden utilizar según la presente invención.

En el caso de células eucariotas comprenden normalmente promotores que aseguran el inicio de la transcripción y opcionalmente señales de poli-A que aseguran la terminación de la transcripción y estabilización del transcrito. Promotores comúnmente usados son el promotor del virus del mosaico de la escrofularia, el promotor de poliubiquitina y el promotor de la actina para la expresión ubicua. El promotor puede ser constitutivo o inducible. Si se desea la expresión constante del gen, entonces se usa un promotor constitutivo. Se usa un promotor "inducible" cuando se desea una expresión regulada del gen dependiendo de las condiciones fisiológicas o de desarrollo. Los promotores típicos para la expresión en células de levadura incluyen, pero no están limitados a:

- Promotores constitutivos tales como, por ejemplo, el promotor de la alcohol deshidrogenasa (ADH1), el promotor del factor de elongación 1- $\alpha$  (TEF) y el promotor del gen que codifica la triosa fosfato isomerasa (TPI), el promotor de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GPD) y el promotor de la 3-fosfoglicerato quinasa (GPK), el promotor de MRP7 y el promotor de la alcohol, oxidasa (AOX1).
- Promotores inducibles tales como, por ejemplo, el promotor de la metalotioneína (CUP1), cuya expresión está regulada por medio de la adición de cobre al medio de cultivo, el promotor del gen que codifica el gen FUS1 o el gen FUS2, cuya expresión se activa en presencia de feromonas (al factor  $\alpha$ ) como se describe en el documento

US5063154, el promotor TET, cuya expresión se regula en presencia de tetraciclinas, los promotores GAL1-10, GALL, GALS que se activan en presencia de galactosa, el promotor VP16-ER, inducible por estrógenos, y el promotor de fosfatasa (PH05) cuya expresión se activa en presencia de fosfato y el promotor de la proteína de choque térmico HSP150, cuya expresión se activa a alta temperatura.

- Promotores represibles tales como, por ejemplo, el promotor del gen de la enolasa (ENO-1) de *S. cerevisiae*, cuya expresión se puede reprimir cuando el microorganismo se cultiva en una fuente de carbono no fermentable, así como promotores cuya expresión está sometida a represión de glucosa de modo que la expresión se reprimirá cuando parte de la lactosa se haya hidrolizado y la concentración de glucosa en el medio empiece a aumentar, el promotor de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (ADH2/GAP) de *R.toruloides*, y el promotor de galactoquinasa (GAL1).

Preferiblemente, en esos casos en los que se sospecha que la proteína heteróloga es tóxica para la célula huésped, el promotor usado para regular su expresión es aconsejablemente un promotor inducible de modo que la expresión de la proteína de interés se pueda retrasar hasta que se hayan alcanzado suficientes niveles de biomasa. En una forma de realización preferida, el gen que codifica para una enzima acil-CoA reductasa con capacidad para producir alcoholes grasos de acuerdo a la presente invención, se expresa bajo el control de un promotor constitutivo. Al construir plásmidos de expresión adecuados, las secuencias de terminación asociadas con estos genes también se ligan en el vector de expresión 3' de la secuencia deseada que se va a expresar para proporcionar poliadenilación del ARNm y terminación. Otros promotores, que tienen la ventaja adicional de transcripción controlada por condiciones de crecimiento son la región promotora para alcohol deshidrogenasa-2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradantes asociadas con el metabolismo del nitrógeno, y la anteriormente mencionada gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Cualquier vector plasmídico que contenga un promotor, origen de replicación y terminación compatibles con levadura, es adecuado.

Los vectores de levaduras adecuados para la presente invención se pueden basar en los siguientes tipos de plásmidos:

- Plásmidos autónomos multicopia: estos plásmidos contienen secuencias que permiten generar múltiples copias de dichos vectores. Estas secuencias pueden ser la denominada  $2\mu$  tal como la que aparece en plásmidos episomales (YE<sub>p</sub> o

plásmidos episomales de levadura) o secuencias de tipo ARS tales como las que aparecen en plásmidos de replicación (YRps o plásmidos de replicación de levadura), Los ejemplos de vectores basados en plásmidos de este tipo son p426GPD, p416GPD, p426TEF, p423GPD, p425GPD, p424GPD o p426GAL, YEp24 y YEplac.

5

- Plásmidos autónomos de copia única: plásmidos que contienen la secuencia de replicación autónoma ARS1 y una secuencia centromérica (CEN4). Los plásmidos de este tipo incluyen los plásmido centroméricos (YCps o plásmidos centroméricos de levadura).

10

- Plásmidos de integración: plásmidos que pueden ser integrados en el genoma de la célula huésped. Los plásmidos de este tipo incluyen plásmidos de integración (YIPs o plásmidos de integración de levadura). Los ejemplos de vectores basados en plásmidos de este tipo son pRS303, pRS304, pRS305 o pRS306 y similares.

15

Generalmente, todos los vectores mencionados por Sikorski (“Extrachromosomal cloning vectors of *Saccharomyces cerevisiae*”, en *Plasmid, A Practical Approach*, Ed. K. G. Hardy, IRL Press, 1993) y por Ausubel *et al.* (“Yeast Cloning Vectors and Genes” *Current Protocols in Molecular Biology*, Sección II, Unidad 13.4, 1994) son útiles en el contexto de la presente invención.

20

En otra forma de realización particular, el gen que codifica una enzima con actividad acil-CoA reductasa de acuerdo a la presente invención, tiene codones optimizados para la expresión en *R. toruloides*. El término “codones optimizados”, como se usa en el presente documento, se refiere a la alteración de codones en moléculas de ácidos nucleicos para reflejar el uso de codones típico del organismo huésped sin alterar el polipéptido codificado por el ADN, para mejorar la expresión. Hay varios métodos y herramientas de software conocidas en la técnica para la optimización de codones. Véase, Narum D, *et al.*, *Infect. Immun.* 2001; 69(12):7250-7253), Outchkourov N, *et al.*, *Protein Expr. Purif.* 2002; 24(1):18-24, Feng L, *et al.*, *Biochemistry* 2000; 39(50):15399-15409, y Humphreys D, *et al.*, *Protein Expr. Purif.* 2000; 20(2):252-264.

25

30

En una realización aún más particular y preferida de la invención, dicho gen que codifica una enzima con actividad acil-CoA reductasa se expresa bajo control del promotor glicerol-3-fosfato deshidrogenasa de *R. toruloides* y dicho gen contiene codones optimizados para la expresión en *R. toruloides*.

Realizaciones preferidas de la invención contemplan el empleo de secuencias terminadoras. El término “secuencia terminadora”, tal y como se utiliza en la presente invención, ha ce

referencia a una secuencia de ADN localizada en el extremo de una unidad transcripcional que señala la terminación de la transcripción. Los terminadores son secuencias de ADN sin traducir que contienen una señal de poliadenilación, que facilita la adición de secuencias de poliadenilato al extremo 3' de un transcrito primario. Las secuencias terminadoras son conocidas por el experto en la materia. Ejemplos ilustrativos y no limitativos de secuencias terminadoras que pueden emplearse de acuerdo a la presente invención incluyen el terminador del gen de la nopalina sintasa de *Agrobacterium tumefaciens* (*t-nos*) o el terminador del gen 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV). En una realización todavía más preferida de la invención el terminador es el terminador del gen *nos* de *A. tumefaciens*.

Como se ha mencionado anteriormente, la invención contempla formas de realización en donde el vector empleado para la expresión del gen que codifica la acil-CoA reductasa en *R. toruloides* comprende un marcador genético, como por ejemplo, un gen que confiere resistencia a un antibiótico. Si se desea la expresión de dicho gen puede optimizarse para la expresión en *R. toruloides* mediante el empleo de secuencias promotoras, terminadoras y codones optimizados para la expresión en levaduras. Ejemplos de dichas secuencias han sido mencionados anteriormente en el presente documento. En una realización preferida, dichas secuencias promotoras y terminadoras son distintas a los promotores y terminadores empleados para la correcta expresión del gen que codifica la enzima acil-CoA reductasa con capacidad de producir alcoholes grasos en *R. toruloides*.

En una realización particular, dicho gen que codifica una enzima con actividad acil-CoA reductasa se selecciona del gen acil-CoA reductasa aislado de *Marinobacter aquaeolei* que comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1 o una variante funcionalmente equivalente de la misma. El término "es de" o "aislado de" significa que el gen o la enzima codificada por dicho gen está sustancialmente separado o purificado de un gen o la enzima codificada en la célula del organismo en el que el dicho gen o polipéptido codificado se produce de forma natural. Por tanto, el término aislado abarca genes purificados por métodos de purificación estándar para ácidos nucleicos o proteínas codificadas. El término también comprende genes o enzimas codificadas por dichos genes preparados por expresión recombinante en una célula huésped así como ácidos nucleicos químicamente sintetizados o el polipéptido codificado de los mismos.

El término "variante funcionalmente equivalente" tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a todos aquellos polipéptidos derivados de la secuencia de la acil-CoA reductasa mostrada en la SEQ ID NO: 1 mediante modificación, inserción y/o delección de

uno o más aminoácidos siempre y cuando se mantenga sustancialmente la función de dicha enzima. En concreto, las variantes funcionalmente equivalentes mantendrán la capacidad producir alcoholes grasos a partir de los acil-CoA grasos correspondientes. Métodos para determinar la producción de alcoholes grasos a partir de acil-CoA grasos son conocidos en el estado de la técnica. A modo ilustrativo, la determinación de la producción de ácidos grasos puede llevarse a cabo mediante cualquier método que permita detectar componentes orgánicos en una muestra como por ejemplo, métodos cromatográficos que incluyen cromatografía de gases y cromatografía de masas. El ejemplo 5 de la presente solicitud detalla la determinación de alcoholes grasos en una muestra mediante cromatografía de gases-masas. Si es necesario, puede llevarse a cabo una extracción previa de los alcoholes grasos del interior celular mediante cualquier método apropiado para ello. Técnicas que permiten la extracción de alcoholes grasos del interior celular son conocidas en el estado de la técnica y comprenden métodos de extracción mecánica como filtración o centrifugación y métodos de extracción sólido-líquido.

15

Variantes funcionalmente equivalentes de dicha acil-CoA reductasa incluyen aquellas que muestran al menos un 25%, al menos un 30%, al menos un 35%, al menos un 40%, al menos un 45%, al menos un 50%, al menos un 55%, al menos un 60%, al menos un 65%, al menos un 70%, al menos un 75%, al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98% o al menos un 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a la secuencia de acil-CoA reductasa indicada anteriormente. El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse por métodos convencionales mencionados en el contexto del primer método de la invención tales como, por ejemplo BLAST (Altschul S.F. *et al.* Basic Local Alignment Search Tool. *J Mol Biol.* 1990 Oct 5; 215(3):403-10). El experto en la materia entenderá que las secuencias de aminoácidos a las que se hace referencia en esta descripción pueden estar modificadas químicamente, por ejemplo, mediante modificaciones químicas que son fisiológicamente relevantes, tales como, fosforilaciones, acetilaciones, etc.

30 En una realización preferida de la invención, dicho gen que codifica una enzima con actividad acil-CoA reductasa consiste en la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1

En una realización particular, El microorganismo de la invención se refiere a un mutante de la cepa *Rhodospiridium toruloides* CECT 13085. El término “cepa”, tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a una variante genética o subtipo de un organismo determinado.

35

La cepa *Rhodosporidium toruloides* CECT 13085 se refiere a un microorganismo de la especie *Rhodosporidium toruloides* que tiene la capacidad de crecer presencia de hidrolizados de biomasa sin detoxificar y/o tiene la capacidad de metabolizar xilosa. Dicha cepa está depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con fecha 7 de Mayo de 2013. Las características de dicha cepa se describen en la solicitud de patente ES2526617A1.

En una realización particular, el gen DAG1 del microorganismo de la invención no es funcional. El término “DAG1” o “DGAT1”, tal y como se usa en el presente documento, se refiere al gen que codifica la enzima diacilglicerol acil transferasa y la isoforma que cataliza la etapa final de la síntesis de triglicéridos a partir de diacilglicerol y acil-CoA grasos y que presenta dos isoformas DAG1 y DAG2. La isoforma 1 cataliza dicha reacción a concentraciones altas de cloruro de magnesio mientras que la isoforma 2 lo hace a concentraciones bajas. DAG1 también está implicada en la transferencia de residuos de acil-CoA a moléculas de retinol. La secuencia de la proteína DAG1 de *R. toruloides* está depositada en la base de datos Uniprot bajo el número de acceso BAH85840.1 (versión del 22 de septiembre de 2009).

En una realización preferida, la expresión “el gen DAG1 no es funcional” tal y como se usa en el presente documento, se refiere a que dicho gen codifica una proteína DAG1 cuya capacidad de realizar la síntesis de triglicéridos a partir de diacilglicerol y acil-CoA grasos, está disminuida con respecto a la capacidad de llevar a cabo dicha síntesis por una proteína codificada por dicho gen DAG1 funcional. De acuerdo a la presente invención, el microorganismo de la invención presenta un gen DAG1 no funcional si la capacidad de sintetizar triglicéridos por la proteína DAG1 codificada por dicho gen DAG1 no funcional está reducida al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80% al menos un 90%, al menos un 95% o más con respecto a dicha síntesis realizada por un gen DAG1 funcional. El gen DAG1 de *R. toruloides*, preferiblemente de *R. toruloides* CECT 13085 puede ser no funcional consecuencia de una mutación en la secuencia de dicho gen.

En otra realización preferida de acuerdo a la presente invención, la expresión “gen DAG1 no es funcional” también se refiere a que dicho gen está ausente en el genoma del microorganismo de la invención, consecuencia de una delección total de la secuencia de dicho gen. En una realización preferida de la invención, el microorganismo de la invención presenta el gen DAG1 delecionado en su totalidad. La determinación de la funcionalidad del

gen DAG1 en *R. toruloides*, preferiblemente en *R. toruloides* CECT 13085, puede llevarse a cabo mediante cualquier método conocido en el estado de la técnica que permita detectar la actividad enzimática de DAG1.

5 El término “mutación” se refiere a sustituciones, inserciones o deleciones que se producen a nivel de la secuencia nucleotídica. Por “inserción”, se entiende la ganancia de uno o más nucleótidos. Dentro de la inserción se encuentran las duplicaciones que consisten en la repetición de un segmento de ADN del interior de una secuencia, pudiendo producirse tres (triplicación) o más veces. Por “delección” tal y como se usa el presente documento, se  
10 entiende la pérdida de uno o más nucleótidos. Las deleciones pueden ser totales o parciales. Por “delección total” de la secuencia de un gen, según se emplea en la presente invención, se refiere a la pérdida del 100% de los nucleótidos que constituyen la secuencia nucleotídica de dicho gen. Por “delección parcial” de la secuencia de un gen, según se emplea en la presente invención se refiere a la pérdida de al menos 0,5%, 1%, 5%, 10%,  
15 20%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 99% de los nucleótidos que componen la secuencia nucleotídica de dicho gen. Como el experto en la materia sabe, en la técnica existen métodos apropiados para realizar mutaciones en la secuencia de un gen como la mutagénesis de sitio dirigido por PCR o mutagénesis de sitio dirigido por PCR en un plásmido.

20 En otra realización particular, el gen LRO1P del microorganismo de la invención no es funcional. El término “LRO1P”, tal y como se utiliza en el presente documento se refiere a la fosfolípido acilglicerol aciltransferasa. La reacción catalizada por dicha enzima comprende transferir un residuo de acil-CoA de un fosfolípido a una molécula de diacilglicerol dando  
25 como resultado una molécula de triacilglicerol y un lisofosfolípido. La secuencia de la proteína LRO1P de *R. toruloides* está depositada en la base de datos Uniprot bajo el número de acceso RHTO\_01945 (versión del 29 de mayo de 2013).

En una realización preferida, la expresión “el gen LROP1 no es funcional” tal y como se usa  
30 en el presente documento, se refiere a que dicho gen codifica una proteína LROP1 cuya capacidad de realizar la síntesis de triglicéridos a partir de un fosfolípido y acil-CoA grasos, está disminuida con respecto a la capacidad de llevar a cabo dicha síntesis por una proteína codificada por dicho gen LROP1 funcional. De acuerdo a la presente invención, el microorganismo de la invención presenta un gen LROP1 no funcional si la capacidad de  
35 sintetizar triglicéridos por la proteína LROP1 codificada por dicho gen LROP1 no funcional está reducida al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80% al

menos un 90%, al menos un 95% o más con respecto a dicha síntesis realizada por un gen LROP1 funcional. El gen LROP1 de *R. toruloides*, preferiblemente de *R. toruloides* CECT 13085 puede ser no funcional consecuencia de una mutación en la secuencia de dicho gen.

5 En otra realización preferida, la expresión “gen LROP1 no es funcional” también se refiere a que dicho gen está ausente en el genoma del microorganismo de la invención, consecuencia de una delección total de la secuencia de dicho gen. En una realización preferida de la invención, el microorganismo de la invención presenta el gen LROP1 delecionado en su totalidad. La determinación de la funcionalidad del gen LROP1 en *R.*  
10 *toruloides*, preferiblemente en *R. toruloides* CECT 13085, puede llevarse a cabo mediante cualquier método conocido en el estado de la técnica que permita detectar la actividad enzimática de LROP1.

En otra realización particular, el gen DAG3 del microorganismo de la invención no es  
15 funcional. El término “DAG3”, “DGAT3”, o “delta-1-pirrolín carboxilato deshidrogenasa” tal y como se usa en el presente documento, se refiere a la isoforma soluble de la enzima diacilglicerol acil transferasa que cataliza la etapa final de la síntesis de triglicéridos a partir de diacilglicerol y acil-CoA grasos y cuya localización es citosólica. La secuencia de la proteína DAG3 de *R. toruloides* está depositada en la base de datos Uniprot bajo el número  
20 de acceso RTHO\_07378 (versión del 29 de mayo de 2013).

En una realización preferida la expresión “el gen DAG3 no es funcional” tal y como se usa en el presente documento, se refiere a que dicho gen codifica una proteína DAG3 cuya capacidad de realizar la síntesis de triglicéridos a partir de un fosfolípido y acil-CoA grasos,  
25 está disminuida con respecto a la capacidad de llevar a cabo dicha síntesis por una proteína codificada por dicho gen DAG3 funcional. De acuerdo a la presente invención, el microorganismo de la invención presenta un gen DAG3 no funcional si la capacidad de sintetizar triglicéridos por la proteína DAG3 codificada por dicho gen DAG3 no funcional está reducida al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80% al  
30 menos un 90%, al menos un 95% o más con respecto a dicha síntesis realizada por un gen DAG3 funcional. El gen DAG3 de *R. toruloides*, preferiblemente de *R. toruloides* CECT 13085 puede ser no funcional consecuencia de una mutación en la secuencia de dicho gen.

En otra realización preferida, la expresión “gen DAG3 no es funcional” también se refiere a  
35 que dicho gen está ausente en el genoma del microorganismo de la invención, consecuencia de una delección total de la secuencia de dicho gen. En una realización

preferida de la invención, el microorganismo de la invención presenta el gen DAG3 delecionado en su totalidad. La determinación de la funcionalidad del gen DAG3 en *R. toruloides*, preferiblemente en *R. toruloides* CECT 13085, puede llevarse a cabo mediante cualquier método conocido en el estado de la técnica que permita detectar la actividad enzimática de DAG3.

En una realización particular, el gen DAG1, y/o el gen LROP1 y/o el gen DAG3 del microorganismo de la invención no es funcional.

#### 10 Procedimiento para obtener una biomasa microbiana rica en alcoholes grasos

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un procedimiento para obtener una biomasa microbiana rica en alcoholes graos, en adelante "primer procedimiento de la invención", que comprende

- 15 i) cultivar el microorganismo de la invención en un medio de cultivo que comprende al menos una fuente de carbono y al menos una fuente de nitrógeno, en condiciones adecuadas para el crecimiento de dicho microorganismo, y
- ii) separar la biomasa microbiana del caldo de cultivo,

20

El término "biomasa microbiana", tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere al material biológico de organismos vivos o recientemente vivos, en particular del microorganismo de la invención, y a la materia orgánica originada en un proceso biológico, espontáneo o provocado, utilizable como fuente de energía. Como una fuente de energía renovable, la biomasa puede ser utilizada directa o indirectamente, previa conversión en otro tipo de producto tal como biocombustible. En el caso particular de la presente invención, la biomasa microbiana es rica en alcoholes grasos.

El término "biomasa microbiana rica en alcoholes grasos", tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a una biomasa microbiana con un contenido en alcoholes grasos de al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, o al menos el 90% de su peso seco total.

30

El término “microorganismo de la invención”, así como las realizaciones particulares y preferidas del mismo han sido detallados en el contexto del primer aspecto de la invención y aplican de igual manera al primer procedimiento de la invención.

- 5 En una primera etapa, el primer procedimiento de la invención comprende cultivar el microorganismo de la invención en un medio de cultivo que comprende al menos una fuente de carbono y al menos una fuente de nitrógeno, en condiciones adecuadas para el crecimiento de dicho microorganismo.
- 10 El término “cultivar”, tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere al procedimiento de sembrar, mantener y hacer que se desarrollen microorganismos sobre medios de cultivo adecuados.

El término “medio de cultivo”, tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a un

15 medio líquido, semisólido o sólido que cuenta con los nutrientes necesarios para permitir, en condiciones favorables de pH, temperatura y oxigenación, el crecimiento de microorganismos. En una forma de realización particular, el medio de cultivo es un medio líquido. Medios de cultivo adecuados para cultivar microorganismos son ampliamente conocidos en la materia. Entre otros nutrientes, el medio de cultivo comprende una fuente de

20 carbono y una fuente de nitrógeno. Ejemplos no limitativos de medios de cultivo adecuados para llevar a cabo el primer procedimiento de la invención incluyen medio MEM, medio YPD, medio MBO3-1 (composición:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0.7 g/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.4 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.4 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.75 g/L, liquido macerado de maíz 9,6 g/L a pH6, glucosa 110 g/L), medio MBO3-2 (composición  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0.7 g/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.4 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.4 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.75 g/L,

25 liquido macerado de maíz 9,6 g/L a pH6, glicerina 110 g/L), medio MBO3-3 (composición: extracto de levadura 10 g/L, glucosa 40 g/L, peptona 20 g/L), medio MBO3-4 (composición: extracto de levadura 10 g/L, sacarosa 40 g/L, peptona 20 g/L), medio MBO3-5 (composición  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0.28 g/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.4 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.4 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.75 g/L, extracto de levadura 1.5 g/L, sacarosa 40 g/L), medio MBO3-6 (composición glucosa 70 g/L, xilosa 40

30 g/L, liquido macerado de maíz 19,2 g/L a pH6, ácido acético 4,5 g/L, ácido fórmico 0,4 g/L, furfural 0,15 g/L), medio MBO3-7 (composición:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  0.28 g/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.4 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.4 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.75 g/L, extracto de levadura 1.5 g/L, glucosa 40 g/L), o medio MBO3-8 ( composición: glucosa 70 g/L, xilosa 40 g/L, liquido macerado de maíz 9,6 g/L a pH6).

35

En una realización particular, la fuente de carbono es un hidrolizado de biomasa lignocelulósica.

5 El término “hidrolizado de biomasa”, según se usa en el presente documento, se refiere a cualquier producto de sacarificación, que contiene los azúcares producidos en el proceso de sacarificación, los restos de biomasa no hidrolizada y las enzimas empleadas para la hidrólisis de dicha biomasa.

10 El término “sacarificación” o “hidrólisis de la biomasa”, según se usa en el presente documento, se refiere a la producción de azúcares fermentables a partir de polisacáridos.

15 El término “azúcar fermentable”, tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a los oligosacáridos y monosacáridos que pueden ser empleados como fuente de carbono por un microorganismo en el proceso de fermentación para la obtención de productos como etanol.

Los términos “biomasa” y “sustrato de biomasa”, tal y como se utilizan en el presente documento, hacen referencia a cualquier material apropiado para su uso en reacciones de sacarificación. Dichos términos incluyen pero no están limitados a materiales que  
20 comprenden celulosa (por ejemplo, biomasa celulósica, materia prima celulósica y sustrato celulósico), lignina o la combinación de celulosa y lignina. La biomasa puede derivar de plantas, animales o microorganismos y puede incluir, sin estar limitada, a residuos agrícolas, industriales y forestales, desechos agrícolas y municipales y cultivos terrestres y acuáticos con fines energéticos. Ejemplos de sustratos de biomasa incluyen pero no están limitados a  
25 madera, pasta de madera, pasta de papel, fibra de maíz, grano de maíz, mazorcas de maíz, residuos de cosechas como hojas de maíz, rastrojo de maíz, pastos, trigo, paja de trigo, cebada, paja de cebada, heno, arroz, paja de arroz, mijo, residuos de papel, papel, residuos de procesamiento de pulpa, leñosas o herbáceas, pulpa de fruta o verdura, productos de destilado del grano, hierbas, cáscaras de arroz, algodón, cáñamo, lino, sisal, bagazo de  
30 caña, sorgo, soja, mijo, componentes obtenidos de la molienda de granos, árboles, ramas, raíces, hojas, virutas de madera, aserrín, arbustos y matas, verduras, frutas y flores y cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la biomasa comprende pero no está limitada a plantas cultivadas (por ejemplo, hierbas, incluyendo gramíneas C4, tales como pasto varilla, hierba espinal, hierba de centeno, *Miscanthus*, hierba cinta o  
35 combinaciones de las mismas), residuos de procesamiento del azúcar, por ejemplo pero sin limitarse a, bagazo [por ejemplo, bagazo de caña de azúcar, pulpa de remolacha (por

ejemplo remolacha azucarera), o una combinación de las mismas], residuos agrícolas (por ejemplo rastrojo de soja, rastrojo de maíz, fibra de maíz, paja de arroz, azúcar de caña de paja, arroz, cáscaras de arroz, paja de cebada, mazorcas de maíz, paja de trigo, paja de canola, paja de avena, cáscaras de avena, fibra de maíz, cáñamo, lino, sisal, algodón o cualquier combinación de los mismos), pulpa de fruta, pulpa de vegetales, productos de destilado del grano, biomasa forestal (por ejemplo madera, pasta de madera, fibra, fibras de pasta de madera reciclada, serrín, madera dura, tal y como madera de álamo, madera blanda o una combinación de las mismas).

10 En algunas formas de realización, la biomasa comprende material de desecho celulósico y/o residuos forestales incluyendo pero sin estar limitada a, papel y residuos de procesamiento de pasta de papel, residuos municipales de papel, papel de periódico, cartón y similares. En algunas realizaciones, la biomasa comprende una especie de fibra mientras que en otras realizaciones alternativas, la biomasa comprende una mezcla de fibras que se originan a partir de diferentes biomásas. En algunas realizaciones, la biomasa puede comprender también plantas transgénicas que expresan ligninasa y/o celulasas.

El término “biomasa” incluye cualquier material biológico vivo o muerto que contiene polisacáridos como sustratos incluyendo pero sin estar limitado a celulosa, almidón, otras formas de polímeros de carbohidratos de cadena larga y combinaciones de los mismos. Puede o no estar formado completamente a partir de glucosa o xilosa, y opcionalmente, puede contener otros monómeros de pentosas o hexosas. La xilosa es una aldopentosa que contiene cinco átomos de carbono y un grupo aldehído. Es el azúcar precursor de la hemicelulosa y es a menudo, el componente principal de la biomasa. En algunas realizaciones, el sustrato se pone en suspensión antes del pretratamiento. En algunas realizaciones, la consistencia de la suspensión es de entre aproximadamente 2% y aproximadamente 30% y más típicamente entre aproximadamente 4% y aproximadamente 15%. En algunas realizaciones la suspensión se lava o se trata con ácido antes del pretratamiento. En algunas formas de realización, la suspensión se deshidrata mediante cualquier método adecuado para reducir el consumo de agua y de productos químicos antes del pretratamiento. Ejemplos de dispositivos de deshidratación incluyen, pero no se limitan a prensas de tornillo a presión, filtros presurizados y extrusoras.

Un sustrato de biomasa está “pretratado” cuando ha sido sometido a procedimientos físicos y/o químicos para facilitar la sacarificación. En algunas realizaciones, el sustrato de biomasa es “pretratado” o “tratado” para aumentar la susceptibilidad de dicha biomasa a la hidrólisis

de la celulosa mediante el empleo de métodos conocidos en el estado de la técnica, tales como métodos de pretratamiento físico-químicos (por ejemplo, tratamiento con amonio, pretratamiento con ácido diluido, pretratamiento con álcalis diluida, exposición a disolventes, explosión de vapor, molienda, extrusión), métodos de pretratamiento biológico (por ejemplo, la aplicación de microorganismos lignina-solubilizantes) y combinaciones de los mismos.

La molienda consiste en un proceso de trituración de la materia vegetal hasta su reducción a partículas de diferentes tamaños que pueden ser separadas por procedimientos mecánicos.

La extrusión es un procedimiento mediante el cual el material vegetal es forzado a fluir bajo una o más de una variedad de condiciones de mezclado, calentamiento y cizallamiento, a través de una boquilla diseñada para dar forma o expandir los ingredientes. Puede realizarse en frío donde el material se extruye sin expansión o en caliente, donde las macromoléculas de los componentes pierden su estructura nativa discontinua y se forma una masa continua y viscosa que dextriniza y gelatiniza el almidón, se desnaturalizan las proteínas, se inactivan las enzimas responsables de posibles deterioros, se destruyen algunos compuestos no nutricionales y se destruye al carga microbiana.

La hidrólisis ácida consiste en tratar el material vegetal con ácidos como ácido sulfúrico o ácido clorhídrico empleando altas temperaturas. Mediante este proceso se favorece la hidrólisis de la celulosa pero requiere una neutralización del pH al finalizar la hidrólisis para permitir el crecimiento posterior de microorganismos.

El tratamiento con álcalis consiste en la adición de bases diluidas a la biomasa vegetal. La eficiencia de este procedimiento depende del contenido de lignina de los materiales. El hidróxido de sodio diluido produce un hinchamiento, permitiendo un incremento en el área de superficie interna reduciendo el grado de polimerización y cristalinidad de la celulosa, causando la separación de las uniones estructurales entre la lignina y los carbohidratos.

El tratamiento con disolventes orgánicos consiste en utilizar solventes como el metanol, etanol o acetona para la ruptura de los enlaces de la lignina y la celulosa. La remoción de los solventes del sistema es necesaria, ya que inhiben el crecimiento de los organismos.

El tratamiento con líquidos iónicos (por ejemplo, con una disolución de cloruro sódico) favorece la degradación de la celulosa debido a que los átomos de hidrógeno y oxígeno que

forman parte de la misma interactúan por separado con el solvente de manera que se produce la ruptura de los enlaces puentes de hidrógeno entre las cadenas de celulosa.

5 El tratamiento con explosión de vapor consiste en tratar la biomasa con vapor saturado a una temperatura de 160-260°C (0,69-4,83 MPa) durante un cierto tiempo que dependerá del tipo de material vegetal de origen.

10 El tratamiento con microorganismos lignina-solubilizantes consiste en tratar a la biomasa con microorganismos que producen enzimas con capacidad de degradar el material lignocelulósico como por ejemplo, *Trichoderma reesei*, *Fusarium oxysporium*, *Piptopus betulinus*, *Penicillium echinalatum*, *Penicillium purpurogenum*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Anaeromyces sp.*, *Caecomices sp.*, *Cyllumcyces sp.*, *Neocallimastix sp.*, *Orpinomyces sp.*, *Piromyces sp.*, *Sporotrichum thermophile*, *Scytaalidium thermophilu*, *Thermonospora cubata*, *Rhodospirillum rubrum*, *Cellulomonas fimi*, *Clostridium*  
 15 *stercocarium*, *Bacillus polymyxa*, *Pyrococcus furiosus*, *Acidothermus cellulotycus*, *Saccharophagus degradans*, etc.

Como el experto en la materia entenderá, el hidrolizado de biomasa lignocelulósica puede obtenerse de diferentes orígenes vegetales o subproductos de los mismos. El término  
 20 "subproducto", tal y como se utiliza en la presente invención, hace referencia al producto resultante de someter a dicho vegetal a procedimientos físico y/o químicos. En una realización particular, el medio de cultivo comprende como fuente de carbono un hidrolizado de biomasa lignocelulósica que se obtiene a partir de paja de trigo, bagazo de caña de azúcar, racimos vacíos de palma aceitera, poda de palma aceitera, fibra de palma aceitera,  
 25 poda de vid, poda de olivo y combinaciones de las mismas. En una realización preferida, dicho hidrolizado procede de paja de trigo. En otra realización preferida, dicho hidrolizado procede de bagazo de caña. En otra realización preferida, dicho hidrolizado procede de racimos vacíos de palma aceitera.

30 Preferiblemente, dichas combinaciones de hidrolizados mencionadas anteriormente tienen al menos un 5%, al menos un 10%, al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 40% de biomasa lignocelulósica hidrolizada.

En otra realización particular, la fuente de carbono empleada para el cultivo del  
 35 microorganismo de la invención procede de una mezcla de un hidrolizado de biomasa lignocelulósica y glicerol. Como entenderá el experto en la materia, la proporción de

hidrolizado y glicerol podrá variar para que las condiciones de crecimiento y de producción lipídica del microorganismo de la invención sean óptimas. Así, preferiblemente la relación de hidrolizado de biomasa:glicerina es 60:40; más preferiblemente, la relación de hidrolizado de biomasa:glicerina es 70:30; y aún más preferiblemente la relación de hidrolizado de biomasa:glicerina es 75:25. El experto en la materia entenderá que el glicerol puede obtenerse de diferentes orígenes. En realizaciones preferidas de la invención el glicerol como fuente de carbono proviene de una fuente de glicerina cruda. En otra realización preferida de la invención, el glicerol se obtiene de aguas glicerinosas procedentes de procesos de esterificación o transesterificación de aceites o grasas.

En otra realización particular, la fuente de carbono se selecciona del grupo que consiste en glucosa, glicerol, glicerina, melazas, xilosa, arabinosa, manosa, fructosa, acetato, almidones y combinaciones de las mismas. En una realización preferida, la fuente de carbono es glucosa. En otra realización preferida, la fuente de carbono es xilosa. En una realización más preferida, la concentración de xilosa en el medio de cultivo es de 20 g/l. En otra realización más preferida, la concentración de xilosa en el medio es de 40 g/l.

En otra realización particular, la fuente de la fuente de nitrógeno se selecciona del grupo que consiste en extracto de levadura, peptona, líquido macerado de maíz, urea, glutamato sódico, diferentes fuentes de nitrógeno inorgánico, como sales de amonio y combinaciones de las mismas. En una realización preferida, la fuente de nitrógeno es una sal de amonio, preferiblemente cloruro de amonio.

En otra realización particular, el medio de cultivo comprende inhibidores sólidos. El término "inhibidores sólidos", tal y como se utiliza en la presente invención, hace referencia a compuestos que inhiben el metabolismo microbiano y afectan negativamente al crecimiento del organismo. En una forma de realización más particular, dichos inhibidores sólidos proceden de la degradación de la biomasa sin detoxificar (por ejemplo, proceden de la degradación de la lignocelulosa) y se seleccionan del grupo formado por ácido acético, ácido fórmico, ácido levulínico, ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido succínico, 4-hidroxibenzaldehído, vainillina, ácido vaníllico, siringaldehído, ácido 4-hidroxibenzoico, catecol, guaiacol, ácido siríngico, furfural, 5-hidroximetilfurfural y combinaciones de los mismos. Métodos adecuados para determinar la capacidad de una cepa de *R. toruloides* de crecer en presencia de inhibidores sólidos procedentes de hidrolizados de biomasa sin detoxificar incluyen, por ejemplo, métodos que permiten determinar la adaptación del microorganismo a un medio de cultivo en el que se incrementa progresivamente la concentración de inhibidores.

Adicionalmente, si se desea, el medio de cultivo comprende otros medios específicos para conseguir la producción del metabolito deseado. Dichos medios de cultivo son ampliamente conocidos en el estado de la técnica y prepararlos constituye práctica rutinaria para el experto en la materia. Típicamente, el cultivo es sometido un estrés metabólico, de forma que produzcan y acumulen intracelularmente grandes cantidades de alcoholes grasos (intermediarios del metabolismo de los lípidos). El estrés metabólico se puede inducir por un exceso de fuente de carbono en relación con la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo. La acumulación de triglicéridos se produce cuando una fuente de carbono se encuentra en exceso y la fuente de nitrógeno limita el crecimiento. Bajo estas condiciones de crecimiento, las células utilizan la fuente de carbono para la síntesis de lípidos neutros y sus intermediarios (acil-CoA). En realizaciones preferidas, el microorganismo de la invención está manipulado genéticamente para favorecer la acumulación de alcoholes grasos y obtener una biomasa rica en alcoholes grasos de acuerdo al primer procedimiento de la invención, mediante la delección del gen DAG1 y/o del gen LROP y/o del gen DAG3.

Los métodos para el cultivo de microorganismos son estándares en la técnica y son ampliamente conocidos por el experto en la materia. El cultivo puede llevarse a cabo en matraces o biorreactores hasta alcanzar una producción máxima de alcoholes grasos. La duración del cultivo es variable, aunque típicamente el cultivo se realiza durante de 2 o 3 días.

El término "condiciones adecuadas para el crecimiento del microorganismo de la invención", tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a condiciones que soportan el crecimiento del microorganismo de la invención. Tales condiciones pueden incluir pH, nutrientes, temperatura, humedad, oxigenación, ambiente y otros factores.

En una realización particular, las condiciones adecuadas para el crecimiento de dicho microorganismo de la etapa i) comprenden

- una temperatura en un rango entre 18 °C y 37 °C, preferentemente entre 23 °C y 32 °C, más preferentemente entre 28 °C y 30°C,
- una concentración de oxígeno disuelto de al menos el 20%, y/o
- agitación constante.

Las condiciones en las que se lleva a cabo el cultivo del microorganismo de la invención pueden ajustarse para aumentar el porcentaje de alcoholes grasos por unidad de peso seco en la biomasa microbiana resultante. Por ejemplo, es posible cultivar el microorganismo en

presencia de concentraciones limitantes de algún nutriente, como por ejemplo, nitrógeno, fósforo o azufre a la vez que se mantiene un exceso de la fuente carbono. La limitación de la fuente de nitrógeno permite aumentar el rendimiento en alcoholes grasos de la biomasa por unidad de peso seco. El microorganismo se puede cultivar en condiciones limitantes de alguno de los nutrientes durante todo el tiempo de cultivo o se puede cultivar alternando ciclos de cultivo en concentraciones limitantes y ciclos de cultivo sin concentraciones limitantes.

El cultivo de acuerdo al primer procedimiento de la invención se lleva a cabo hasta que se ha alcanzado la cantidad de biomasa deseada y/o hasta que la biomasa contiene la cantidad intracelular de alcoholes grasos deseada. El experto entenderá que es posible llevar a cabo una monitorización del cultivo para determinar la cantidad de biomasa alcanzada a lo largo del tiempo (por ejemplo, mediante la determinación de la densidad óptica a 600 nm o mediante la determinación del peso sólido por unidad de volumen de cultivo). El experto entenderá que es posible llevar a cabo una monitorización del cultivo para determinar el porcentaje de alcoholes grasos que se acumulan en la biomasa a lo largo del tiempo (por ejemplo, mediante la determinación de la cantidad de alcoholes por unidad de masa en el cultivo usando cualquier método apropiado para ello conocido en el estado de la técnica).

Realizaciones preferidas de la invención contemplan la utilización de medios de cultivo que favorecen la excreción de un porcentaje de los metabolitos producidos por el microorganismo de la invención. Aún más preferiblemente, dichos medios de cultivo favorecen la excreción de al menos el 50% del total de alcoholes grasos producidos por el microorganismo de la invención al medio de cultivo. Todavía más preferiblemente, dichos medios de cultivo favorecen la excreción de al menos el 60% del total de alcoholes grasos producidos por el microorganismo de la invención al medio de cultivo. Todavía más preferiblemente, dichos medios de cultivo favorecen la excreción de al menos el 70% del total de alcoholes grasos producidos por el microorganismo de la invención al medio de cultivo. Todavía más preferiblemente, dichos medios de cultivo favorecen la excreción de al menos el 80% del total de alcoholes grasos producidos por el microorganismo de la invención al medio de cultivo. Todavía más preferiblemente, dichos medios de cultivo favorecen la excreción de al menos el 85% del total de alcoholes grasos producidos por el microorganismo de la invención al medio de cultivo. Todavía más preferiblemente, dichos medios de cultivo favorecen la excreción de al menos el 90% del total de alcoholes grasos producidos por el microorganismo de la invención al medio de cultivo. Todavía más preferiblemente, dichos medios de cultivo favorecen la excreción de al menos el 95% del

total de alcoholes grasos producidos por el microorganismo de la invención al medio de cultivo. Medios apropiados para la excreción de al menos un 90% de los alcoholes grasos producidos por el microorganismo de la invención al medio de cultivo se ilustran en el ejemplo 3.

5

Una vez alcanzada la cantidad de biomasa deseada y/o la cantidad intracelular de alcoholes grasos deseada, en una segunda etapa, el primer procedimiento de la invención comprende separar la biomasa microbiana del caldo de cultivo. Las células se recogen mediante alguno de los procedimientos habitualmente utilizados para este fin, tales como, centrifugación, 10 filtración, decantación, flotación o sedimentación, adicionalmente ayudados por floculación o evaporación para eliminar parte o la totalidad del agua o del medio de la fracción acuosa del medio de cultivo.

En una realización particular, la segunda etapa del primer procedimiento de la invención se realiza mediante un método seleccionado del grupo que consiste en filtración, microfiltración, 15 centrifugación, presión, decantamiento y combinaciones de los mismos.

En una realización particular, el procedimiento de la invención comprende además secar la biomasa microbiana obtenida en la segunda etapa.

20

#### Biomasa microbiana

En otro aspecto, la presente invención también se refiere a la biomasa microbiana rica en alcoholes grasos obtenible según el primer procedimiento de la invención, en adelante 25 "biomasa microbiana de la invención". El término "biomasa microbiana" se ha descrito con anterioridad y es de aplicación en el presente aspecto.

La biomasa microbiana generada de acuerdo al primer método de la invención comprende no solo los microorganismos sino también todos aquellos componentes del cultivo 30 generados por los microorganismos o que se han incorporado a los microorganismos a partir del cultivo durante su crecimiento y proliferación, tales como ácidos nucleicos, proteínas, polisacáridos, lípidos o productos intermediarios de los mismos. La biomasa microbiana de acuerdo a la invención comprende microorganismos de acuerdo a la presente invención.

El término “microorganismo de la invención”, así como las realizaciones particulares y preferidas del mismo han sido detallados en el contexto del primer aspecto de la invención y aplican de igual manera a la biomasa microbiana de la invención.

- 5 En una realización particular, la biomasa rica en alcoholes grasos tiene un contenido en alcoholes grasos de al menos el 10% del peso seco, al menos el 20% del peso seco, al menos el 30% del peso seco, al menos el 40% del peso seco, al menos 50% del peso seco al menos 60% del peso seco, al menos 70% del peso seco, al menos 80% del peso seco o al menos el 90% del peso seco.

10

Procedimiento para obtener una preparación enriquecida en alcoholes grasos

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un procedimiento para obtener una preparación rica en alcoholes grasos, en adelante “segundo procedimiento de la  
15 invención”, que comprende

15

- i) cultivar el microorganismo de la invención en un medio de cultivo que comprende al menos una fuente de carbono y al menos una fuente de nitrógeno, en condiciones adecuadas para el crecimiento de dicho microorganismo, y
- 20 ii) separar la biomasa microbiana del caldo de cultivo,
- iii) extraer los alcoholes grasos de la biomasa microbiana y/o del caldo de cultivo obtenidos en la etapa (ii).

20

La primera etapa del segundo procedimiento de la invención comprende cultivar el  
25 microorganismo de la invención en un medio de cultivo que comprende al menos una fuente de carbono y al menos una fuente de nitrógeno, en condiciones adecuadas para el crecimiento de dicho microorganismo. Los términos “microorganismo de la invención”, “cultivar”, “medio de cultivo”, “condiciones adecuadas para el crecimiento del microorganismo de la invención” así como las realizaciones particulares y preferidas de  
30 dichos términos han sido detallados anteriormente y se interpretan de igual manera en el contexto del segundo procedimiento de la invención.

30

La segunda etapa comprende separar la biomasa microbiana del caldo de cultivo. La biomasa microbiana puede separarse del caldo de cultivo mediante cualquier método  
35 apropiado conocido del estado de la técnica. Métodos que permiten separar la biomasa microbiana del caldo han sido detallados en el contexto del primer procedimiento de la

35

invención. Dichos métodos incluyen pero no están limitados a filtración, microfiltración, centrifugación, presión, decantamiento y combinaciones de los mismos.

El término “caldo de cultivo”, tal y como se usa en el presente documento, se refiere al medio de cultivo obtenido tras el cultivo del microorganismo de la invención y que comprende nutrientes procedentes del medio de cultivo y compuestos producidos por el microorganismo de la invención como consecuencia de su metabolismo, como, alcoholes grasos.

5 En una realización preferida, la concentración de alcoholes grasos en el caldo de cultivo como consecuencia de la excreción por parte del microorganismo de la invención de, al menos 0,1 g/L; en otra realización preferida, la concentración de alcoholes grasos en el caldo de cultivo es de, al menos, 0,2 g/L; en otra realización preferida, la concentración de alcoholes grasos en el caldo de cultivo es de al menos 0,3 g/L; en otra realización preferida, la concentración de alcoholes grasos en el caldo de cultivo es de, al menos, 0,4 g/L; en otra realización preferida, la concentración de alcoholes grasos en el caldo de cultivo es de al menos 0,5 g/L; en otra realización preferida, la concentración de alcoholes grasos en el caldo de cultivo es de, al menos, 0,6 g/L; en otra realización preferida, la concentración de alcoholes grasos en el caldo de cultivo es de al menos 0,7 g/L; en otra realización preferida, la concentración de alcoholes grasos en el caldo de cultivo es de, al menos, 0,8 g/L; en otra realización preferida, la concentración de alcoholes grasos en el caldo de cultivo es de, al menos, 0,9 g/L; en otra realización preferida, la concentración de alcoholes grasos en el caldo de cultivo es de, al menos, 1 g/L, en otra realización preferida, la concentración de alcoholes grasos en el caldo de cultivo es de, al menos, 1,1 g/L; en otra realización preferida, la concentración de alcoholes grasos en el caldo de cultivo es de, al menos, 1,2 g/L, en otra realización preferida, la concentración de alcoholes grasos en el caldo de cultivo es de, al menos, 1,3 g/L, en otra realización preferida, la concentración de alcoholes grasos en el caldo de cultivo es de, al menos, 1,4 g/L, en otra realización preferida, la concentración de alcoholes grasos en el caldo de cultivo es de, al menos, 1,5 g/L; en otra realización preferida, la concentración de alcoholes grasos en el caldo de cultivo es de, al menos, 1,6 g/L, en otra realización preferida, la concentración de alcoholes grasos en el caldo de cultivo es de, al menos, 1,7 g/L, en otra realización preferida, la concentración de alcoholes grasos en el caldo de cultivo es de, al menos, 1,8 g/L; en otra realización preferida, la concentración de alcoholes grasos en el caldo de cultivo es de, al menos, 1,9 g/L; en otra realización preferida, la concentración de alcoholes grasos en el caldo de cultivo es de, al menos, 2 g/L o más.

Una vez retirada la biomasa microbiana, el caldo de cultivo puede filtrarse a través de un filtro estéril con un diámetro de poro de de 0,22  $\mu\text{m}$  o centrifugarse para eliminar los restos celulares. Asimismo, si el caldo de cultivo no va a utilizarse de manera inmediata, puede conservarse en frío, por ejemplo, a 4°C, a -20°C o a -80°C hasta su uso.

La tercera etapa del segundo procedimiento de la invención comprende extraer los alcoholes grasos de la biomasa microbiana y/o del caldo de cultivo obtenido en la segunda etapa de dicho procedimiento.

Los microorganismos que acumulan alcoholes grasos y que forman parte de la biomasa microbiana de acuerdo la presente invención se puede lisar para producir un lisado, que se usa como material de partida para la extracción de alcoholes grasos. La etapa de lisis se puede llevar a cabo usando cualquier método conocido para un experto, como por ejemplo, lisis por calor, lisis en medio básico, lisis en medio ácido, lisis enzimática usando enzimas tales como proteasas o enzimas que degradan polisacáridos (amilasas), lisis mediante ultrasonidos, lisis mecánica, lisis mediante choque osmótico, Estos métodos se pueden llevar a cabo de forma individual o combinada y, en caso de uso combinado, se pueden llevar a cabo de forma simultanea o secuencial. El grado de rotura celular se puede determinar mediante análisis microscópico.

Preferiblemente, la etapa de lisis requiere de la rotura de al menos en torno a un 70% de las células, al menos en torno a un 80% de las células, al menos en torno a un 90% de las células o, preferiblemente, al menos en torno a un 100% de las células.

Una vez obtenidos los lisados celulares, el presente procedimiento comprende la extracción de los alcoholes grasos presentes en dichos lisados celulares y/o de los alcoholes grasos presente en el caldo de cultivo. En una realización preferida dicho procedimiento comprende la extracción de alcoholes grasos de los lisados celulares y del caldo de cultivo. En otra realización preferida de la invención, el procedimiento para obtener una preparación rica en alcoholes grasos comprende extraer los alcoholes grasos del caldo de cultivo.

Métodos adecuados para separar alcoholes grasos de los lisados celulares incluyen cualquier método de extracción mecánica y dentro de estos, cualquier método de extracción sólido-líquido o mecánico químico conocidos en el estado de la técnica. La extracción de los

alcoholes grasos del caldo de cultivo puede llevarse a cabo mediante cualquier técnica de extracción líquido-líquido.

5 En una realización particular, el método de extracción mecánica se realiza utilizando prensa de tornillo, prensa francesa o molino de bolas.

10 Por otra parte, la extracción de los alcoholes grasos de la biomasa microbiana y/o del caldo de cultivo también se puede llevar a cabo aprovechando diferencias de solubilidad de los mismos en un determinado disolvente. En el caso favorable de una mezcla de sólidos en la cual uno de los compuestos es soluble en un determinado disolvente (normalmente un disolvente orgánico), mientras que los otros son insolubles, se puede realizar una extracción consistente en añadir este disolvente a la mezcla contenida en un vaso de precipitados, un matraz o una cápsula de porcelana, en frío o en caliente, agitar o triturar con ayuda de una varilla de vidrio y separar por filtración la disolución que contiene el producto extraído y la fracción insoluble. La extracción sólido-líquido suele ser mucho más eficiente cuando se hace de manera continua con el disolvente de extracción caliente en un sistema cerrado, utilizando una metodología similar a la explicada anteriormente, basada en la maceración con disolvente orgánico de la mezcla sólida a extraer, previa al vaporizado en un matraz y condensado en un refrigerante. El paso del disolvente orgánico con parte del producto extraído al matraz inicial, permite que el mismo disolvente orgánico vuelva a ser vaporizado, repitiendo un nuevo ciclo de extracción, mientras que el producto extraído, no volátil, se concentra en el matraz.

25 Así, en otra realización particular, el método de extracción sólido-líquido se realiza usando un disolvente orgánico inmiscible en agua. El término “disolvente orgánico”, tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a una sustancia que disuelve un soluto cuyas moléculas contienen átomos de carbono. El término “disolvente orgánico inmiscible en agua”, tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a un disolvente orgánico con poca o ninguna capacidad para mezclarse con el agua. Ejemplos no limitativos de disolventes orgánicos inmiscibles en agua incluyen n-hexano, acetato de etilo, éter de petróleo y éter-etílico. Así, en una realización preferida, dicho disolvente orgánico inmiscible en agua se selecciona del grupo que consiste en n-hexano, acetato de etilo, éter de petróleo, éter-etílico y combinaciones de los mismos. En una realización aún más preferida, dicho disolvente orgánico inmiscible en agua es acetato de etilo. La extracción de alcoholes grasos de la biomasa microbiana y del caldo de cultivo puede llevarse a cabo tal y como se ilustra en el ejemplo 4 del presente documento. Así, la etapa de extracción de alcoholes

grasos del caldo de cultivo comprende un método de extracción líquido-líquido con un disolvente orgánico apropiado, como, por ejemplo acetato de etilo. La extracción puede repetirse tantas veces como se desee, preferiblemente hasta que hasta que no se obtenga una fase orgánica (donde estarán los alcoholes grasos). A continuación, los  
5 alcoholes grasos presentes en dichos sobrenadantes se precipitan mediante el empleo de un agente apropiado para ello, por ejemplo, sulfato sódico anhidro. La adición del agente precipitante se realiza en condiciones que favorezcan la precipitación de los alcoholes grasos, por ejemplo, durante un tiempo apropiado (entre 15 minutos y una hora), típicamente, 30 minutos y con agitación suave. Posteriormente, el sobrenadante  
10 se filtra y el disolvente es evaporado en un rotavapor hasta obtener un sólido. Posteriormente, dicho sólido es tratado convenientemente para analizar el contenido en alcoholes grasos mediante cualquier método apropiado para ello, como cromatografía gases-masas.

#### 15 Procedimiento para obtener biosurfactantes

Los alcoholes grasos obtenidos a partir de la biomasa microbiana y del caldo de cultivo de acuerdo a la presente invención pueden ser procesados químicamente para dar lugar a productos de interés en la industria. Ejemplos de modificaciones químicas que  
20 pueden ser aplicadas a los alcoholes grasos de acuerdo a la invención incluyen sin limitación, epoxidación, oxidación, hidrólisis, sulfatación, sulfonación, etoxilación, propoxilación, amidación y saponificación.

Como consecuencia de dichas modificaciones, a partir de los alcoholes grasos se  
25 obtienen productos de interés industrial como, por ejemplo sulfatos de alcoholes grasos, resinas, emulsionantes, cosméticos, jabones, jabones metálicos, etoxilatos de alcoholes grasos, sulfatos de ésteres de alcoholes grasos, productos químicos industriales (por ejemplo, productos de limpieza, auxiliares de tratamiento de textiles, plastificantes, estabilizantes o aditivos), revestimientos, pinturas y lacas, productos aislantes del  
30 cableado eléctrico y alcanos superiores.

Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención se relaciona con un procedimiento para obtener biosurfactantes a partir de los alcoholes grasos obtenidos en el segundo procedimiento de la invención, en adelante "tercer procedimiento de la invención", que  
35 comprende:

- i) cultivar el microorganismo de la invención en un medio de cultivo que comprende al menos una fuente de carbono y al menos una fuente de

nitrógeno en condiciones adecuadas para el crecimiento de dicho microorganismo;

ii) separar la biomasa microbiana del medio de cultivo

iii) extraer los alcoholes grasos de la biomasa microbiana y/o del caldo de cultivo  
5 obtenidos en la etapa (ii); y

iv) convertir la mezcla de alcoholes grasos obtenidos en la etapa (iii) en biosurfactantes.

El término "biosurfactante", tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a un  
10 compuesto anfipático con capacidad para interactuar con compuestos hidrofóbicos e hidrofílicos al mismo tiempo, que se deriva de la biomasa, tal como residuos animales, de plantas o microbianos. Dicho término incluye sin limitación ramnolípidos, trehalolípidos, soforolípidos, celobiolípidos, lípidos polioles, diglicosil diglicéridos, lipopolisacáridos, arthrofactin, surfactina, viscosina, fosfolípidos y sulfonilípidos.

15

En una primera etapa, el tercer procedimiento de la invención comprende cultivar el microorganismo de la invención en un medio de cultivo que comprende al menos una fuente de carbono y al menos una fuente de nitrógeno en condiciones adecuadas para el crecimiento de dicho microorganismo. Los términos "microorganismo de la invención",  
20 "cultivar", "medio de cultivo", "condiciones adecuadas para el crecimiento del microorganismo de la invención" así como las realizaciones particulares y preferidas de dichos términos han sido detallados anteriormente y se interpretan de igual manera en el contexto del tercer procedimiento de la invención.

25 La segunda etapa comprende separar la biomasa microbiana del caldo de cultivo. La biomasa microbiana puede separarse del caldo de cultivo mediante cualquier método apropiado conocido del estado de la técnica. Métodos que permiten separar la biomasa microbiana del caldo han sido detallados en el contexto del primer procedimiento de la invención. Dichos métodos incluyen pero no están limitados a filtración, microfiltración,  
30 centrifugación, presión, decantamiento y combinaciones de los mismos.

La tercera etapa del tercer procedimiento de la invención comprende extraer los alcoholes grasos de la biomasa microbiana y/o del caldo de cultivo. Métodos para extraer los alcoholes grasos acumulados en el microorganismo de la invención y en el caldo de cultivo han sido  
35 detallados en el contexto del segundo procedimiento de la invención y aplican de igual manera al contexto del tercer procedimiento de la invención.

En una cuarta etapa, el sexto procedimiento de la invención comprende convertir la mezcla de alcoholes grasos obtenidos en la tercera etapa en biosurfactantes. El experto en la materia entenderá que existen en la técnica numerosos procedimientos para convertir  
5 alcoholes grasos en biosurfactantes que incluyen, sin limitación, procedimientos de esterificación, acilación, transesterificación, saponificación, acetalización o neutralización (ver por ejemplo O'Lenick. 1999. Surfactants: Chemistry & Properties; Levinson. 2008. Surfactant production, pp: 1-37. CRC Press.)

10 En una forma preferida de realización, el surfactante es un alquil poliglucósido (APG) que se obtiene a partir de un alcohol graso, que puede obtenerse a partir de la biomasa microbiana y/o el caldo de cultivo de acuerdo a la invención mediante un proceso de acetalización (o transacetalización) de dicho alcohol graso. La acetalización es una reacción orgánica que implica la formación de un acetal.

15 En otra forma preferida de realización, el surfactante es un éster de ácido graso, que puede obtenerse mediante la condensación con etanolamina para dar lugar a los etoxilatos.

#### Usos de la invención

20 En otro aspecto, la presente invención se relaciona con el uso del microorganismo de la invención, en adelante "primer uso de la invención", para obtener una biomasa microbiana rica en alcoholes grasos según el primer procedimiento de la invención.

25 En otro aspecto, la presente invención se relaciona con el uso del microorganismo de la invención, en adelante "segundo uso de la invención", para obtener una preparación rica en alcoholes grasos según el segundo procedimiento de la invención.

30 En otro aspecto, la presente invención se relaciona con el uso del microorganismo de la invención, en adelante "tercer uso de la invención", para obtener surfactantes según el tercer procedimiento de la invención.

Los términos "microorganismo", "biomasa microbiana" y "surfactante" y sus particularidades han sido descritos en el contexto del microorganismo y del primer procedimiento de la  
35 invención, y son aplicables al segundo uso de la invención. Asimismo, también son

aplicables de igual manera los modos de realización particulares y preferidos del microorganismo y del segundo procedimiento de la invención.

\*\*\*

- 5 La invención se describe en detalle a continuación por medio de los siguientes ejemplos, que han de interpretarse como meramente ilustrativos y no limitativos del alcance de la invención.

## EJEMPLOS

10

### **Ejemplo 1: Construcción de un casete integrativo conteniendo la acil-CoA reductasa (FAR) de *Marinobacter aquaeolei* VT8**

Utilizando como molde la secuencia proteica de la acil-CoA reductasa de *Marinobacter aquaeoli* VT8 depositada en Genbank (YP\_959486.1), se sintetizó el gen empleando en uso  
 15 de codones de *R. toruloides* y la secuencia proteica obtenida es la que se muestra en la SEQ ID NO:1. El vector de clonación conteniendo el gen sintetizado fue digerido con las enzimas de restricción *PacI* y *XbaI*. El fragmento de 1564 pb extraído se trató con la polimerasa “Klenow” (Takara) para su clonación en un vector bajo control del promotor de la glicerol-3-fostato deshidrogenasa de *R. toruloides* y del terminador *Tnos* de *Agrobacterium tumefaciens* dando lugar a pNEOL71. A continuación, el vector pNEOL71 obtenido se digirió  
 20 con la endonucleasa mitocondrial *I-SceI* y el casete de expresión, conteniendo el promotor, el gen *maqRt* y *Tnos*, se clonó en el vector pNEOL85. El vector pNEOL85 contiene otro casete conteniendo el gen de resistencia a la geneticina con uso de codón de *R. toruloides* (*G418Rt*) bajo el control del promotor de la fosfoglicerato quinasa de *R. toruloides* (pPGK) y  
 25 del terminador T35S del virus mosaico de la coliflor. Por otro lado, se modificó el plásmido de tipo Ti de *A. tumefaciens* pUR5750, insertando un sitio múltiple de clonación (*KpnI*-*SmaI*/*XmaI*-*I* *SceI*-*SpeI*-*PacI*-*XbaI*) entre los sitios de restricciones *KpnI* y *XbaI*, dando lugar al plásmido pNEOL57. Por último, el vector pNEOL85 se cortó con *PacI* y un fragmento de 5 kb, portando los dos casetes de expresión, se clonó en el plásmido pNEOL57 dando lugar al  
 30 plásmido integrativo pNEOL102 (Figura 1).

### **Ejemplo 2: Transformación de *R. toruloides***

La transformación de *R. toruloides* CECT 13085 se realizó mediante el sistema de transformación mediado por *Agrobacterium tumefaciens* (ATMT). Para ello, se cultivaron el  
 35 pre-inóculo de *A. tumefaciens* llevando el plásmido pNEOL102 en el medio de crecimiento MM (preparado según Hooykaas y col., 1979) y el pre-inóculo de *R. toruloides* CECT 13085

en medio YPD (extracto de levadura 10g/L, glucosa 20g/L, peptona 20g/L) durante 24h. A partir del pre-inoculo de *Agrobacterium*, se inocula 10 mL de medio MI (preparado según Bundock y col., 1995) suplementado en acetosiringona a 200  $\mu$ M con una DO<sub>600</sub> inicial de 0.5, y se incuba 6h a 30°C, con agitación de 250 rpm. En paralelo, se inocula la cepa *R. toruloides* CECT 13085 en 10 mL de YPD con una DO<sub>600</sub> inicial de 1.5. Tras 6h de incubación se recogen 100 $\mu$ l de cada cultivo y se realiza un co-cultivo sobre una membrana de nitrocelulosa de 0.45  $\mu$ m en medio MI suplementado en acetosiringona a 200  $\mu$ M, se incuba a 25°C durante 72h. A continuación, el co-cultivo o mezcla de transformación se recoge con 2 mL de medio YPD y se siembra en placas de Petri con medio YPD suplementado con cefotaxima (200  $\mu$ g/mL) y geneticina (35  $\mu$ g/mL).

Los transformantes se picaron en medio YPD suplementado con geneticina (35  $\mu$ g/mL) y se comprobó la integración del casete conteniendo la acil-CoA reductasa (*maqRt*) en el genoma de la levadura mediante PCR con oligonucleótidos específicos (O21+, ggactagtCGCCGGGATGCCAACGTCGTT (SEQ ID NO: 2); O22-, ccactagtaaattgataattgcgggactc (SEQ ID NO: 3); O66+, GAGATCGCCACCTCGTCGGT (SEQ ID NO: 4); O66-, AGCGAGAGGATGATCGAGTT (SEQ ID NO: 5)) y mediante Southern blot. Para ello, se extrajo el ADN genómico de los transformantes seleccionados con el método clásico de extracción utilizando el fenol-CIA. A continuación, los ADNs genómicos fueron digeridos con dos enzimas de restricción: KpnI o BglII. Se sintetizó una sonda de 785 pb, específica del gen *maqRt*, con los oligonucleótidos O66+ y O66-, dicha sonda se marcó según el protocolo descrito en el kit de Roche (*DIG High Prime DNA labeling and detection Starter kit I*) y se hibridó en el ADN genómico de los transformantes seleccionados. Tanto las membranas de Southern como los geles de agarosa de PCR confirmaron que el casete de expresión *maqRt* se había integrado en el genoma de *R. toruloides* CECT 13085.

### **Ejemplo 3: Producción de alcoholes grasos en diferentes medios de cultivo**

Los clones confirmados en el ejemplo anterior se cultivaron en matraces de 500 mL conteniendo 100 mL de los siguientes medios de cultivo: MBO3-1 (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0.7 g/L, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0.4 g/L, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.4 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.75 g/L, liquido macerado de maíz 9,6 g/L a pH6, glucosa 110 g/L), MBO3-2 (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0.7 g/L, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0.4 g/L, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.4 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.75 g/L, liquido macerado de maíz 9,6 g/L a pH6, glicerina 110 g/L), MBO3-3 (extracto de levadura 10 g/L, glucosa 40 g/L, peptona 20 g/L), MBO3-4 (extracto de levadura 10 g/L, sacarosa 40 g/L, peptona 20 g/L), MBO3-5 (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0.28 g/L, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0.4 g/L, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0.4 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.75 g/L, extracto de levadura 1.5 g/L, sacarosa 40

g/L), MBO3-6 (glucosa 70 g/L, xilosa 40 g/L, liquido macerado de maíz 19,2 g/L a pH6, ácido acético 4,5 g/L, ácido fórmico 0,4 g/L, furfural 0,15 g/L), MBO3-7 (NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0.28 g/L, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.4 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.4 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.75 g/L, extracto de levadura 1.5 g/L, glucosa 40 g/L), MBO3-8 (glucosa 70 g/L, xilosa 40 g/L, liquido macerado de maíz 9,6 g/L a pH6). Los cultivos crecieron a 250 rpm, 30°C durante 72 h.

En la mayoría de las muestras observamos un sólido blanco, ausente en la cepa parental, tras centrifugar el cultivo 10 min a 10.000xg. La Figura 2 muestra los resultados obtenidos en algunos de los medios de cultivo ensayados tras 24 h o 36 h de cultivo. La extracción de los alcoholes grasos se realizó como se indica en el ejemplo 4 y su detección y cuantificación se describe en el ejemplo 5. El microorganismo de la invención es capaz de producir entre 0,5 y 2 g/L de alcoholes grasos en 24-36 h dependiendo del medio de cultivo utilizado (ver figura 2). En la mayoría de los casos, excepto en el medio MBO3-6, y dependiendo del tiempo de incubación, entre el 60% y el 95% del total de los alcoholes producidos se secretaron al medio de cultivo. Por el contrario, en el medio MBO3-6 el 80% de los alcoholes quedaron retenidos en el interior de las células. Los tres alcoholes grasos producidos en todos los medios fueron oleil (C18:1-OH), cetil (C16:0-OH) y esteáril (C18:0-OH). En todos los casos el oleil fue el alcohol mayoritario ().

#### 20 **Ejemplo 4: Extracción de alcoholes grasos**

La presencia de alcoholes grasos se determinó tras centrifugar 100 mL de caldo de cultivo a 10000g/10min. El sobrenadante se extrajo tres veces con 30 mL de acetato de etilo y las fases orgánicas obtenidas en cada extracción se juntaron. A esta fase orgánica, contenida en un recipiente cerrado, se le añadió Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se mezcló agitando ligeramente la mezcla cada 5-10min durante 30min. A continuación se filtró y se evaporó el disolvente hasta sequedad en un rotavapor. La extracción de los alcoholes contenidos en el interior de las células se realizó según el procedimiento descrito por Schneiter y Daum (Schneiter y Daum. 2006. *Methods in Molecular Biology*, Vol. 313: Yeast Protocols. Xiao, Wei (Ed.) 2nd. Humana Press). Para ello, 2 g de biomasa se lavan con una solución salina (0.9% NaCl, centrifugar a 10000xg/10min), la biomasa lavada se mezcla con metanol, 13 mL, y se introduce en un frasco de 100 mL. Se añaden 20 g de perlas de vidrio (0.25-0.3mm) y se completa la lisis celular con algunos de estos métodos o combinación de los mismos: agitación 1000-1500rpm/1-10min y/o sonicación durante 1-20 min. Añadimos 26 mL de cloroformo y se agita al menos durante 20-60 min en un agitador orbital (100-400 rpm). La mezcla de lisis resultante se filtra y el filtrado se lava sucesivamente con una solución de Cl<sub>2</sub>Mg (0.034%), otra disolución KCl 2N:metanol (1:1 v/v), y otra, mezcla

cloroformo/metanol/agua (3:48:7 v/v). después de cada lavado se centrifuga (3000xg/5min) y se desprecia la fase ligera. Se repiten estos lavados hasta que la interfase aparezca clara. La fase orgánica se evapora en rotavapor hasta sequedad.

#### 5 **Ejemplo 5: Análisis y caracterización de los alcoholes grasos**

La presencia de alcoholes grasos se realizó empleando CG-MS. Para ello el sólido obtenido mediante la extracción con acetato de etilo se trató de dos formas diferentes bien disolviéndolo directamente en cloroformo bien realizando una silanización (patrones puros). Para llevar a cabo dicha silanización se pesó aproximadamente 1 mg de cada uno de los patrones puros y se les adicionó 2 mL de N,N-dimetilformamida y 0,5 mL de N,O-Bis (Trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) con 1% trimetilsilyl chloride. La disolución resultante se agita vigorosamente en vortex y se mantienen en un baño de agua a 60°C durante 30 min. Transcurrido este tiempo, las muestras se dejan enfriar hasta temperatura ambiente, se centrifugan a 6500 r.p.m. durante 5 minutos (en caso necesario) y se recoge el sobrenadante.

Las muestras tratadas de una u otra forma se analizaron usando un equipo Agilent modelo 6890 GC acoplado a un espectrómetro de masas Agilent 5973 MS equipado con una columna ZB-5ms (30 m de longitud por 250 µm de diámetro interno y 0.25 µm de espesor de fase). Para el análisis un volumen de inyección de 1 microlitro de cada muestra es inyectado en el GC-MS mediante un automuestreador y separado en la columna en modo splitless. El Helio se usó como gas portador con una velocidad de flujo constante de 0.8 mL/min. La temperatura de inyector es 280°C y la temperatura de la fuente del MS se mantuvo a 290°C. El programa de temperatura del horno fue: temperatura inicial de 80°C mantenida durante 0.5 min a continuación una rampa de 5°C/min hasta una temperatura final de 250°C y posteriormente una rampa de 40°C/min hasta una temperatura de 290°C mantenida durante 5 minutos. Las condiciones del espectrofotómetro de masas son: solvent delay de 4 min, ionización por impacto electrónico (70 eV) y dwell time de 100 ms.

Los cromatogramas se registraron en modo SCAN y en modo SIR estableciéndose un rango de masas de 50-400 m/z para el modo SCAN y fijando los iones 299.1 / 313.2 / 325.2 / 340.2 / 327.2 / 341.3 para el modo SIM.

Los análisis de GC-MS identificaron 3 alcoholes grasos producidos por el microorganismo de la invención. Las muestras se compararon con los patrones inyectados a través de los tiempos de retención así como los m/z característicos obtenidos para cada uno de ellos en

su correspondiente espectro de masas. En los cromatogramas obtenidos (tanto en modo SCAN como en modo SIM) a partir de las muestras silanizadas con BSTFA se puede apreciar la aparición de 3 picos mayoritarios con tiempos de retención 24.09 min, 27.27 min y 27.78 min correspondientes al alcohol cetílico, al alcohol oleico y al alcohol esteárico, respectivamente. El análisis de los espectros de masas de estos compuestos verificaron su identidad ya que en cada uno de ellos se aprecia el fragmento correspondiente a [M+73-1] ó [M+73-2] típico de las muestras silanizadas con BSTFA y otro fragmento correspondiente a la pérdida de un grupo metilo [M+73-1]-15 ó [M+73-2]-15. En la siguiente tabla se puede observar un resumen de los resultados obtenidos.

10

<b>Compuesto</b>	<b>T<sub>R</sub>(min)</b>	<b>m/z característico</b>
Alcohol cetílico	24.09	313/299
Alcohol oleico	27.27	340/325
Alcohol esteárico	27.78	341/327

**REIVINDICACIONES**

1. Un microorganismo de la especie *Rhodosporidium toruloides* modificado genéticamente con un gen que codifica una enzima con actividad acil-CoA reductasa, en donde dicha enzima tiene capacidad de producir alcoholes grasos.  
5
2. Un microorganismo según la reivindicación 1, en donde dicho gen se expresa bajo control de un promotor constitutivo y/o en donde dicho gen contiene codones optimizados para su expresión en *R. toruloides*.  
10
3. Un microorganismo según las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicho gen que codifica una enzima con actividad acil-CoA reductasa se selecciona del gen acil-CoA reductasa que comprende la secuencia SEQ ID NO: 1 o una variante funcionalmente equivalente de la misma.  
15
4. Un microorganismo según las reivindicaciones 1 a 3 en donde el microorganismo de la especie *Rhodosporidium toruloides* en el que se ha introducido el gen que codifica una enzima con actividad acil-CoA reductasa pertenece a la cepa *R. toruloides* CECT 13085.  
20
5. Un procedimiento para obtener una biomasa microbiana rica en alcoholes grasos que comprende:  
25
  - i) cultivar un microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en un medio de cultivo que comprende al menos una fuente de carbono y al menos una fuente de nitrógeno en condiciones adecuadas para el crecimiento de dicho microorganismo; y
  - ii) separar la biomasa microbiana del caldo de cultivo.
6. Procedimiento según la reivindicación 5, en donde la fuente de carbono se selecciona del grupo que consiste en glucosa, sacarosa, glicerol, melazas, xilosa, arabinosa, manosa, fructosa, acetato y combinaciones de las mismas.  
35

7. Procedimiento según la reivindicación 5, en donde la fuente de carbono es un hidrolizado de biomasa lignocelulósica.
- 5 8. Procedimiento, según la reivindicación 7, en donde el hidrolizado se obtiene de paja de trigo, bagazo de caña de azúcar, bagazo de maíz, racimos vacíos de palma aceitera, poda de palma aceitera, fibra de palma aceitera, poda de vid, poda de olivo y combinaciones de las mismas.
- 10 9. Procedimiento según la reivindicación 6, en donde la fuente de carbono es glucosa.
10. Procedimiento según la reivindicación 6, en donde la fuente de carbono es xilosa.
- 15 11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10, en donde la fuente de nitrógeno se selecciona del grupo que consiste en extracto de levadura, peptona, líquido macerado de maíz, urea, glutamato sódico, fuentes de nitrógeno inorgánico y combinaciones de las mismas.
- 20 12. Procedimiento según la reivindicación 11, en donde la fuente de nitrógeno es una sal de amonio, preferiblemente cloruro de amonio.
- 25 13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 12, en donde el medio de cultivo contiene inhibidores sólidos seleccionados de: ácido acético, ácido fórmico, ácido levulínico, ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido succínico, 4-hidroxibenzaldehído, vanillina, ácido vanílico, siringaldehído, ácido 4-hidroxibenzoico, catecol, guaiacol, ácido siríngico, furfural, 5-hidroximetilfurfural y combinaciones de los mismos.
- 30 14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 13, en donde las condiciones adecuadas para el crecimiento de dicho microorganismo de la etapa (i) comprenden
- temperatura en un rango entre 18 °C y 37 °C,
  - 35 - concentración de oxígeno disuelto de al menos el 20%, y/o
  - agitación constante.

15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 14 en donde la etapa (ii) se realiza mediante un método seleccionado del grupo que consiste en filtración, microfiltración, centrifugación y combinaciones de los mismos.
- 5 16. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 15, que comprende además secar la biomasa microbiana de la etapa (ii).
17. Biomasa microbiana rica en alcoholes grasos obtenible según el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 5 a 16.
- 10 18. Procedimiento para obtener una preparación enriquecida en alcoholes grasos que comprende
- i) cultivar un microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en un medio de cultivo que comprende al menos una fuente de
  - 15 carbono y al menos una fuente de nitrógeno en condiciones adecuadas para el crecimiento de dicho microorganismo;
  - ii) separar la biomasa microbiana del caldo de cultivo; y
  - iii) extraer los alcoholes grasos de la biomasa microbiana y/o del caldo de cultivo obtenidos en la etapa (ii)
- 20 19. Procedimiento según la reivindicación 18, en donde la extracción de la etapa (iii) se lleva cabo mediante métodos mecánicos, o mediante un método de extracción sólido-líquido, o un método de extracción líquido-líquido.
- 25 20. Procedimiento según la reivindicación 19, en donde el método de extracción mecánica se realiza usando prensa de tornillo, prensa francesa o molino de bolas.
- 30 21. Procedimiento según la reivindicación 19, en donde el método de extracción sólido-líquido o líquido-líquido se realiza usando un disolvente orgánico inmiscible en agua.
- 35 22. Procedimiento según la reivindicación 21, en donde dicho disolvente orgánico inmiscible en agua se selecciona del grupo que consiste en n-hexano, acetato de etilo, éter de petróleo, éter-etílico y combinaciones de los mismos.
23. Procedimiento para obtener biosurfactantes que comprende:

- 5
- i) cultivar un microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en un medio de cultivo que comprende al menos una fuente de carbono y al menos una fuente de nitrógeno en condiciones adecuadas para el crecimiento de dicho microorganismo;
  - ii) separar la biomasa microbiana del medio de cultivo
  - iii) extraer los alcoholes grasos de la biomasa microbiana y/o del caldo de cultivo obtenidos en la etapa (ii); y
  - iv) convertir la mezcla de alcoholes grasos obtenidos en la etapa (iii) en biosurfactantes.
- 10

24. Uso del microorganismo según las reivindicaciones 1 a 4 para obtener una biomasa microbiana rica en alcoholes grasos, para obtener una preparación enriquecida en alcoholes grasos o para obtener biosurfactantes.

15

.....

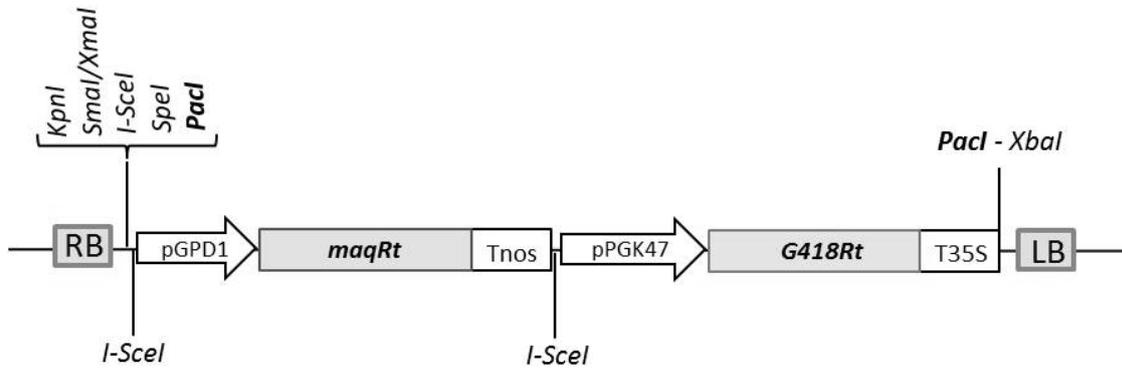


Figura 1

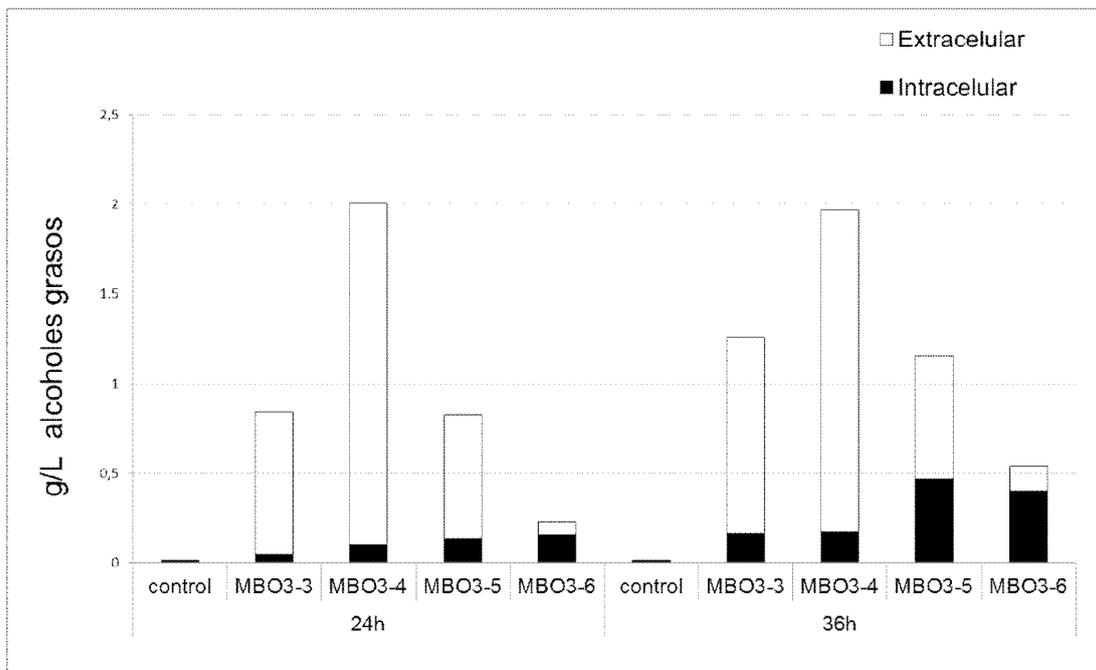


Figura 2

# ES 2 579 384 B1

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> NEOL BIOSOLUTIONS, S.A.

5 <120> PRODUCCIÓN DE ALCOHOLES GRASOS

<130> P11761ES00

<160> 5

10 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 513

15 <212> PRT

<213> *Marinobacter aquaeolei*

<400> 1

20 Met Ala Ile Gln Gln Val His His Ala Asp Thr Ser Ser Ser Lys Val  
1 5 10 15

25 Leu Gly Gln Leu Arg Gly Lys Arg Val Leu Ile Thr Gly Thr Thr Gly  
20 25 30

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

Ile Gly Ala Ile Tyr Leu Leu Ile Arg Gly Asn Lys Arg His Pro Asp  
50 55 60

35 Ala Arg Ser Arg Phe Leu Glu Glu Ile Ala Thr Ser Ser Val Phe Asp  
65 70 75 80

40 Arg Leu Arg Glu Ala Asp Ser Glu Gly Phe Asp Ala Phe Leu Glu Glu  
85 90 95

45 Arg Ile His Cys Val Thr Gly Glu Val Thr Glu Ala Gly Phe Gly Ile  
100 105 110

Gly Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Leu Ala Thr Glu Leu Asp Ala Val Ile  
115 120 125

50 Asn Ser Ala Ala Ser Val Asn Phe Arg Glu Glu Leu Asp Lys Ala Leu  
130 135 140

55 Ala Ile Asn Thr Leu Cys Leu Arg Asn Ile Ala Gly Met Val Asp Leu  
145 150 155 160



ES 2 579 384 B1

Ser Lys Pro Phe Leu Ala Val Asn Arg Ala Leu Phe Asp Leu Val Ile  
 385 390 395 400  
 5 Ser Gly Val Arg Leu Pro Leu Ser Leu Thr Asp Arg Val Leu Lys Leu  
 405 410 415  
 10 Leu Gly Asn Ser Arg Asp Leu Lys Met Leu Arg Asn Leu Asp Thr Thr  
 420 425 430  
 15 Gln Ser Leu Ala Thr Ile Phe Gly Phe Tyr Thr Ala Pro Asp Tyr Ile  
 435 440 445  
 20 Phe Arg Asn Asp Glu Leu Met Ala Leu Ala Asn Arg Met Gly Glu Val  
 450 455 460  
 Asp Lys Gly Leu Phe Pro Val Asp Ala Arg Leu Ile Asp Trp Glu Leu  
 465 470 475 480  
 25 Tyr Leu Arg Lys Ile His Leu Ala Gly Leu Asn Arg Tyr Ala Leu Lys  
 485 490 495  
 30 Glu Arg Lys Val Tyr Ser Leu Lys Thr Ala Arg Gln Arg Lys Lys Ala  
 500 505 510  
 35 Ala  
 <210> 2  
 <211> 29  
 40 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> cebador sentido  
 45 <400> 2  
 ggactagtcg ccgggatgcc aacgtcggtt 29  
 50 <210> 3  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 55 <220>  
 <223> cebador antisentido

# ES 2 579 384 B1

<400> 3  
ccactagtaa atgtataatt gcgggactc 29

5 <210> 4  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

10 <220>  
<223> cebador sentido

<400> 4  
gagatcgcca cctcgtcggc 20

15

<210> 5  
<211> 20  
<212> DNA  
20 <213> Artificial Sequence

<220>  
<223> cebador antisentido

25 <400> 5  
agcgagagga tgatcgagtt 20



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201530156

②② Fecha de presentación de la solicitud: 10.02.2015

③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	US 2011000125 A1 (MCDANIEL ROBERT et al.) 06.01.2011, todo el documento.	1-24
A	WO 2012087964 A1 (CODEXIS INC et al.) 28.06.2012, todo el documento.	1-24
A	WO 2013096082 A1 (CODEXIS INC) 27.06.2013, todo el documento.	1-24

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
26.05.2016

Examinador  
M. Á. García Coca

Página  
1/4

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C12N1/19** (2006.01)

**C12P7/04** (2006.01)

**C12N9/02** (2006.01)

**C12R1/645** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12P, C12R, C12N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, XPESP, EMBASE/Elsevier

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.05.2016

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-24	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-24	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	US 2011000125 A1 (MCDANIEL ROBERT et al.)	06.01.2011
D02	WO 2012087964 A1 (CODEXIS INC et al.)	28.06.2012
D03	WO 2013096082 A1 (CODEXIS INC)	27.06.2013

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

El objeto de la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-24, es un microorganismo de la especie *Rhodospiridium toruloides* modificado genéticamente con un gen que codifica una enzima con actividad acil-CoA reductasa, capaz de producir alcoholes grasos (reiv. 1-4). Es también objeto de la invención un procedimiento para la obtención de biomasa microbiana (reiv. 5-16), la biomasa obtenida rica en alcoholes grasos (reiv. 17), un procedimiento para obtener una preparación enriquecida en alcoholes grasos (reiv. 18-22), un procedimiento para obtener biosurfactantes (reiv. 23) y el uso del microorganismo de la invención (reiv. 24).

**Novedad (art. 6.1 de la Ley 11/1986 de Patentes) y Actividad Inventiva (art. 8.1 de la Ley 11/1986 de Patentes).**

El documento D01 divulga métodos para la producción de alcoholes grasos en levaduras oleaginosas a las que se les ha introducido un gen que codifica para una enzima con actividad acil-CoA reductasa, de *Marinobacter aquaeolei*. El documento D01 se centra en la obtención de alcoholes grasos en *Escherichia coli* (ejemplos 2 y 3), en *Saccharomyces cerevisiae* (ejemplo 4) y en la levadura *Yarrowia lipolytica* (ejemplo 5).

El documento D02 divulga levaduras modificadas pertenecientes a la especie *Yarrowia lipolytica*. Estos microorganismos se modifican mediante la introducción de distintos genes implicados en la producción de alcoholes grasos, como genes que codifican para una enzima con actividad acil-CoA reductasa de *Marinobacter aquaeolei*.

El documento D03 divulga microorganismos modificados para la producción de alcoholes grasos, centrándose en concreto en *Escherichia coli*. Estos microorganismos se modifican mediante la introducción de un gen que codifica para una enzima con actividad acil-CoA reductasa, de *Marinobacter aquaeolei* VT8 o de *Marinobacter algicola* DG893.

De los documentos citados del estado de la técnica (D01-D03) ya se conoce la producción de alcoholes grasos a partir de microorganismos modificados genéticamente mediante la introducción de genes implicados en su obtención. Aunque en los documentos citados se indica la posibilidad de que los microorganismos a los que se les introduce el gen que codifica para una enzima con actividad acil-CoA reductasa pueden ser microorganismos oleaginosos como por ejemplo microorganismos de la especie *Rhodospiridium toruloides* (entre otros muchos), no se ha encontrado en el estado de la técnica ningún documento que divulgue en sus formas de realización, un microorganismo como el reivindicado en la presente solicitud. Se considera que, a la vista de lo divulgado en el estado de la técnica, no sería evidente para un experto en la materia la preparación en concreto de un microorganismo como el de la presente solicitud sin la necesaria experimentación, donde la introducción del gen que codifica para una enzima con actividad acil-CoA reductasa permite alcanzar rendimientos elevados por encima de 1 g/L en el caldo de cultivo.

Por lo tanto, ninguno de los documentos del estado de la técnica anterior a la solicitud, tomados solos o en combinación revelan la invención definida en las reivindicaciones 1-24. Además, en los documentos citados no hay sugerencias que dirijan al experto en la materia hacia la invención definida en las reivindicaciones 1-24. Así, la invención contenida en las reivindicaciones 1-24 es con referencia a los documentos D01-D03 nueva y se considera que implica actividad inventiva (art. 6.1 y 8.1 Ley 11/1986 de Patentes).