

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 608 968**

21 Número de solicitud: 201531283

51 Int. Cl.:

**C12N 1/19** (2006.01)

**C11B 1/00** (2006.01)

12

## SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**08.09.2015**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**17.04.2017**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2016/070634**

71 Solicitantes:

**NEOL BIOSOLUTIONS, S.A. (100.0%)  
C/ Blanca de Navarra, 7  
28010 Madrid ES**

72 Inventor/es:

**FILLET, Sandy ;  
RONCHEL BARRENO, Carmen ;  
SUÁREZ GONZÁLEZ, Beatriz ;  
VELASCO ÁLVAREZ, Javier y  
ADRIO FONDEVILA, José Luis**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

54 Título: **PRODUCCIÓN DE ACEITES MICROBIANOS CON ALTO CONTENIDO EN ÁCIDOS GRASOS DE CADENA MUY LARGA**

57 Resumen:

Producción de aceites microbianos con alto contenido en ácidos grasos de cadena muy larga.

La presente invención se refiere a la producción de aceites microbianos con alto contenido en ácidos grasos de cadena muy larga mediante el cultivo de un microorganismo de la especie *Rhodospiridium toruloides*, mediante la inserción de al menos un gen que codifica una enzima con actividad C<sub>18</sub> 3-cetoacetyl-CoA sintasa que permite producir aceites microbianos con alto contenido en ácidos grasos de cadena muy larga en presencia de diferentes fuentes de carbono.

## DESCRIPCIÓN

### PRODUCCIÓN DE ACEITES MICROBIANOS CON ALTO CONTENIDO EN ACIDOS GRASOS DE CADENA MUY LARGA

5

#### CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a la producción de aceites microbianos con un alto contenido en ácidos grasos de cadena muy larga que presentan, al menos, 20 átomos de carbono, mediante el cultivo de un microorganismo en presencia de diferentes fuentes de carbono.

10

#### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los oleoquímicos constituyen una clase de moléculas alifáticas derivadas de los lípidos. Los oleoquímicos se utilizan en un amplio rango de aplicaciones que incluyen combustibles para el transporte, productos para el consumidor (ej. cosméticos, champús, geles, etc.), y productos industriales (ej. pinturas, lubricantes, bioplásticos, revestimientos, etc.) (Biermann y col. 2011. Angew Chem Int Ed, 50 3854-3871). Los oleoquímicos más comunes son los surfactantes, lubricantes y el biodiesel.

20

Actualmente, la mayoría de los oleoquímicos se producen a partir de fuentes de lípidos relativamente baratas como los aceites vegetales y grasas animales. La creciente demanda de oleoquímicos, y en particular de biodiesel, ha conllevado un aumento de la producción de cultivos vegetales y ha incrementado la preocupación sobre la sostenibilidad y el impacto ambiental de la producción de semillas vegetales oleaginosas.

25

Por ello, el interés por encontrar materias primas alternativas para la producción de oleoquímicos, como aceites usados, residuos grasos cárnicos, o lípidos de origen microbiano (algas u otros microorganismos) ha crecido notablemente durante la última década. De todos ellos, los microorganismos representan un enorme potencial ya que son capaces de producir lípidos a partir de una gran variedad de materias primas como los azúcares amiláceos, azúcares lignocelulósicos, dióxido de carbono o gas natural, entre otros (Keasling. 2010. Science, 330: 1355-1358; Lennen y Pfleger. 2013. Curr Opin Biotechnol, 24: 1044-1053.).

35

Los aceites vegetales son las materias primas más utilizadas para la producción de oleoquímicos. El uso de aceites vegetales se puede dividir en tres categorías: alimentación, biodiesel y oleoquímicos. De los 157 millones de toneladas consumidas en 2012-2013, el 77% se utilizaron en la producción de alimentos, un 12% en la producción de biodiesel y el restante 11% en la producción de oleoquímicos (OECD. 2014. Oilseeds: World markets and trade).

Como consecuencia de la creciente demanda de oleoquímicos, la producción de aceites vegetales se ha incrementado de manera constante (un 14%) pasando de 149 millones de toneladas en 2010-2011 a 170 millones de toneladas en 2013-2014, y las previsiones indican que todavía crecerá más, hasta un 28% más en el año 2023 con respecto a las cifras de 2013-2014. Otras estimaciones (Carlsson y col. 2011. Eur J Lipid Sci Technol, 113: 812-831) señalan que en el año 2030 las necesidades globales de aceites se triplicarán (390 MT/año) debido al incremento de la población y al mayor consumo calórico (150 MT/año para alimentación humana) y, sobre todo, por ya mencionado incremento en el uso de aceites para aplicaciones industriales (240 MT/año). Este incremento en producción no será posible con los cultivos oleaginosos actuales. Por ello, la producción de aceites y sus derivados (ácidos grasos, alcoholes grasos, metil ésteres, etc.) mediante microorganismos puede suponer una buena fuente alternativa para la futura obtención de estos productos a partir de materias primas sostenibles y renovables.

Los ácidos grasos de cadena muy larga (AGCML), aquellos que contienen más de 18 átomos de carbono, están presentes comúnmente en semillas y ceras de plantas pertenecientes a las familias *Cruciferaeae*, *Limnathaceae*, *Simmondsiaceae* y *Tropaeolaceae*. El ácido erúxico (ácido cis-docosa-13-enoico, 22:1  $\Delta$ 13) es el AGCML más abundante en el aceite de semilla de varias especies como las variedades HEAR (del inglés, *high erucic acid rapeseed*) de *Brassica napus*, *B. napa* o *B. carinata*, en las que llega a representar un 45-55% del total de los ácidos grasos. Sin embargo, su cultivo está muy restringido ya que está condicionado por las condiciones climáticas y, por ejemplo, crecen de forma muy pobre en zonas cálidas y secas.

El ácido erúxico es de gran interés ya que es una materia prima valiosa con más de 1.000 aplicaciones industriales patentadas. En la actualidad, el principal derivado del este ácido es la erucamida, que se utiliza como aditivo de activación superficial en recubrimientos y en la producción de films plásticos. Existen muchas otras aplicaciones previstas para el ácido erúxico y su derivado hidrogenado, ácido behénico, como, por ejemplo, lubricantes para

altas temperaturas, surfactantes aniónicos de alto peso molecular, surfactantes viscoelásticos, surfactantes EOR (del inglés, *enhanced oil recovery*), detergentes, recubrimientos plásticos y adhesivos, geles y resinas epoxi, formulaciones cosméticas, fotografía y farmacia.

5

El ácido nervónico (ácido cis-tetracosa-15-enoico; 24:1  $\Delta$ 15) es otro AGCML estratégico que existe en la naturaleza como producto de la elongación del ácido oleico (18:1  $\Delta$ 9), siendo su precursor inmediato el ácido erúcico. El ácido nervónico se ha identificado en los aceites de semillas de muy pocas plantas como *Lunaria annua* (planta de la plata), *Borago officinalis* (borraja), *Cannabis sativa* (cáñamo), *Acer truncatum* (arce), *Tropaeolum speciosum* (flor de llama) y *Cardamine graeca* (berro amargo). Este ácido tiene también uso en las aplicaciones industriales ya señaladas para el ácido erúcico.

10

Por lo tanto, existe un gran potencial de mercado para la expansión y desarrollo de nuevas fuentes renovables de aceites ricos en AGCML como el ácido erúcico y nervónico entre otros.

15

Dos soluciones potenciales incluyen la producción de lípidos en algas fotoautotróficas o la conversión de biomasa vegetal utilizando microorganismos modificados genéticamente. Con respecto a la primera, y aunque se han realizado numerosos avances, todavía existen numerosos retos (Wijffels y Barbosa. 2010. *Science*, 329: 796-799). Por su parte, las tecnologías desarrolladas para la producción de etanol celulósico pueden ser utilizadas para la producción de biodiesel y oleoquímicos con la ayuda de nuevos catalizadores microbianos. Los oleoquímicos son sintetizados vía reacciones enzimáticas que utilizan ácidos grasos libres o acil-tioésteres como sustratos. Por lo tanto, las estrategias para la producción de oleoquímicos en microorganismos comienza por redirigir el flujo de carbono del metabolismo de los ácidos grasos hacia el producto deseado.

20

25

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 microorganismos se consideren como unos candidatos muy atractivos para ser utilizados como cepas hospedadoras para la producción de aceites o compuestos derivados de los mismos como ácidos o alcoholes grasos.

35

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 a que están limitadas por sus bajas tasas de crecimiento. Las cianobacterias y microalgas oleaginosas son hospedadores atractivos para la producción de aceites y derivados de ácidos grasos principalmente por su capacidad fotosintética que les permite convertir la energía solar y reciclar el CO<sub>2</sub>. 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.

Existe por tanto una necesidad en el estado de la técnica de lograr un alto rendimiento, producción y productividad de aceites de origen microbiano ricos en AGCML y lograr que estos procesos puedan llegar a ser competitivos con los utilizados hoy en día.

## SUMARIO DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han modificado genéticamente un microorganismo de la cepa *Rhodosporidium toruloides*, mediante la inserción de genes heterólogos que codifican una o varias enzimas con actividad C<sub>18</sub> 3-cetoacil-CoA sintasa que permite producir aceites con un alto contenido en ácidos grasos de cadena muy larga (igual o superior a 20 átomos de carbono). La producción de aceite mediante el empleo de dicho microorganismo se sitúa por encima de 50 g/L y el contenido en ácidos grasos de cadena muy larga es superior al 35% del total de los ácidos grasos presentes.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención se relaciona con un microorganismo de la especie *Rhodosporidium toruloides* modificado genéticamente con al menos un gen que codifica una enzima con actividad C<sub>18</sub> 3-cetoacetyl-CoA sintasa.

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un procedimiento para obtener una biomasa microbiana enriquecida en aceite rico en ácidos grasos de cadena muy larga 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; y
- 5 ii) separar la biomasa microbiana del caldo de cultivo.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una biomasa microbiana enriquecida en aceite rico en ácidos grasos de cadena muy larga obtenida mediante el procedimiento para obtener una biomasa microbiana enriquecida en aceite rico en ácidos grasos de cadena muy  
10 larga de la invención.

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un procedimiento para obtener una preparación enriquecida en aceite rico en ácidos grasos de cadena muy larga 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;
- ii) separar la biomasa microbiana del caldo de cultivo; y
- 20 iii) extraer el aceite rico en ácidos grasos de cadena muy larga de la biomasa microbiana obtenida en la etapa (ii).

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

- 25 i) obtener una biomasa microbiana enriquecida en aceite rico en ácidos grasos de cadena muy larga en donde dicha obtención se lleva a cabo según el procedimiento para obtener una preparación enriquecida en aceite rico en ácidos grasos de cadena muy larga de la presente invención;
- ii) refinar el aceite rico en ácidos grasos de cadena muy larga obtenido en la etapa i); y
- 30 iii) convertir el aceite rico en ácidos grasos de cadena muy larga obtenido en la etapa (ii) en biolubricantes.

Finalmente, la invención se relaciona con el uso del microorganismo de la invención para obtener una biomasa microbiana enriquecida en aceite rico en ácidos grasos de cadena muy larga. La presente invención también se relaciona con el uso del microorganismo de la

invención para obtener una preparación enriquecida en aceite rico en ácidos grasos de cadena muy larga. La presente invención también se relaciona con el uso del microorganismo de la invención para obtener biolubricantes.

## 5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Figura 1:** casetes integrativos en *Rhodosporidium toruloides*

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

10

En un primer aspecto, la presente invención se relaciona con un microorganismo, en adelante "microorganismo de la invención", de la especie *Rhodosporidium toruloides* modificado genéticamente con al menos un gen que codifica una enzima con actividad C<sub>18</sub> 3-cetoacil-CoA sintasa.

15

El término "gen", tal y como se usa en el presente documento, se refiere a una cadena de desoxirribonucleótidos que codifica una proteína. En una realización particular de la invención, dicho término se refiere a una cadena de desoxirribonucleótidos que codifica una enzima con actividad C<sub>18</sub> 3-cetoacil-CoA sintasa.

20

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.

25

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 C<sub>18</sub> 3-cetoacil-CoA sintasa, comparado con un microorganismo control no modificado correspondiente de la misma cepa. En el contexto de la presente invención, la enzima que tiene actividad C<sub>18</sub> 3-cetoacil

30

CoA sintasa puede estar codificada por un gen que codifica dicha enzima en otro organismo.

Generalmente, el gen que codifica una enzima que tiene actividad C<sub>18</sub> 3-cetoacil-CoA sintasa 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 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:

- 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.
- 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.
- 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  $\text{C}_{18}$  3-cetoacil-CoA sintasa en dichos transformantes puede determinarse mediante cualquier 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 " $\text{C}_{18}$  3-cetoacil-coA sintasa", "acil-Coa elongasa", "beta-cetoacil CoA sintasa", "3-oxoacil CoA sintasa de cadena muy larga", o "elongasa de ácidos grasos" tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a un polipéptido que pertenece a la familia de enzimas E.C. 2.3.1.199 y que cataliza la adición de dos carbonos a ácidos grasos saturados o insaturados de 18-26 carbonos en su extremo carboxilo. De esta forma, la enzima con actividad  $\text{C}_{18}$  3-cetoacil-CoA sintasa de la invención es capaz de elongar en dos átomos de carbono ácidos grasos saturados o insaturados de al menos 18 carbonos para dar lugar a los correspondientes ácidos grasos. En una forma de realización particular y preferida de la



invención, dicha enzima elonga en dos átomos de carbono ácidos grasos saturados o insaturados cuya cadena hidrocarbonada comprende de 18 a 26 carbonos.

Preferiblemente, el enzima con actividad C<sub>18</sub> 3-cetoacil-CoA sintasa cataliza la reacción de elongación mencionada anteriormente empleando como único sustrato ácidos grasos monoinsaturados de, al menos, 18 carbonos. En una realización particular y preferida de la invención, dicha enzima emplea como único sustrato el ácido oleico, es decir, tiene alta especificidad por dicho sustrato, obteniéndose ácido gondoico como producto de la reacción de elongación.

En otra realización particular y preferida de la invención, dicha enzima emplea como único sustrato el ácido gondoico, es decir, tiene alta especificidad por dicho sustrato, obteniéndose ácido erúcico como producto de la reacción de elongación.

En otra realización particular y preferida de la invención, dicha enzima emplea como único sustrato el ácido erúcico, es decir, tiene alta especificidad por dicho sustrato, obteniéndose ácido nervónico como producto de la reacción de elongación.

No obstante, enzimas con actividad C<sub>18</sub> 3-cetoacil-CoA sintasa adecuadas para su uso en la presente invención incluyen también aquellas enzimas que poseen especificidad por más de un sustrato, en cuyo caso presentan una especificidad sustancialmente superior sobre ácidos grasos saturados e insaturados, preferiblemente monoinsaturados, de 18 átomos de carbono o más, que sobre aquellos de menor longitud (por ejemplo, ácidos grasos de 14-16 átomos de carbono). Así, enzimas con actividad C<sub>18</sub> 3-cetoacil-CoA sintasa adecuadas para su uso en la presente invención incluyen aquellas que muestran una especificidad frente a ácidos grasos saturados de, al menos, 18 carbonos que es de, al menos 1,5 veces, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces, al menos 40 veces, al menos 50 veces, al menos 60 veces, al menos 70 veces, al menos 80 veces, al menos 90 veces, al menos 100 veces, o más con respecto a la especificidad frente a ácidos grasos de longitud menor a 18 carbonos, por ejemplo, frente a ácidos grasos de 14-16 átomos de carbono. Dicha definición también incluye enzimas que catalizan la adición de dos átomos de carbonos a un ácido graso monoinsaturado o poliinsaturado de, al menos, 18 carbonos con una especificidad mayor que la especificidad que presentan por un ácido graso monoinsaturado o poliinsaturado de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 carbonos. El término “especificidad”, tal y como se utiliza en el presente documento, hace referencia a la eficiencia con la que el enzima transforma un sustrato determinado en el producto de reacción. El término

“especificidad mayor”, tal y como se usa en el presente documento, se refiere a que la eficiencia con la que el enzima de la invención transforma un ácido graso de al menos 18 carbonos, preferiblemente un ácido graso de 18 a 26 átomos de carbono y en particular, el ácido oleico, el ácido gondoico y/o el ácido erúxico, en los productos de reacción correspondientes, es decir, en ácido gondoico, ácido erúxico y ácido nervónico, respectivamente, es de al menos 1,5 veces, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces, al menos 40 veces, al menos 50 veces, al menos 60 veces, al menos 70 veces, al menos 80 veces, al menos 90 veces, al menos 100 veces o más, mayor que la especificidad de dicha enzima por un ácido graso cuya longitud sea menor de 18 carbonos, en particular por un ácido graso de 16 carbonos, como por ejemplo, un ácido graso de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 carbonos. En una forma preferida de realización, se entiende que un enzima con actividad C<sub>18</sub> 3-cetoacil-CoA sintasa es específica frente a ácido oleico y su especificidad de sustrato es superior a la observada frente a un sustrato con un número distinto de átomos de carbono y que presente al mismo número de insaturaciones que el ácido oleico.

En otra forma preferida de realización, se entiende que un enzima con actividad C<sub>18</sub> 3-cetoacil-CoA sintasa es específica frente a ácido gondoico y su especificidad de sustrato es superior a la observada frente a un sustrato con un número distinto de átomos de carbono y que presente al mismo número de insaturaciones que el ácido gondoico.

En otra forma preferida de realización, se entiende que un enzima con actividad C<sub>18</sub> 3-cetoacil-CoA sintasa es específica frente a ácido erúxico y su especificidad de sustrato es superior a la observada frente a un sustrato con un número distinto de átomos de carbono y que presente al mismo número de insaturaciones que el ácido erúxico.

En otra forma preferida de realización, se entiende que un enzima con actividad C<sub>18</sub> 3-cetoacil-CoA sintasa es específica frente a ácido araquídico y su especificidad de sustrato es superior a la observada frente a un sustrato con un número distinto de átomos de carbono y que presente al mismo número de insaturaciones que el ácido araquídico.

La especificidad de un enzima se puede determinar midiendo la constante de especificidad (Kcat/Km). El experto en la materia conoce que los sustratos preferidos para las enzimas son aquellos para los que los valores de Km son bajos y los valores de Kcat son altos en comparación con sustratos por los que no muestra especificidad o por los que muestra una menor especificidad. La determinación de la especificidad del enzima con actividad C<sub>18</sub> 3-

cetoacil-CoA sintasa de la invención puede determinarse, por ejemplo, cuantificando el número de moléculas de sustrato transformadas en producto por unidad de tiempo (Kcat) en presencia de distintos sustratos y dividiendo dicho valor por la concentración de cada uno de dichos sustratos a la cual la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima (Km).

5 A modo ilustrativo, la especificidad del enzima con actividad C<sub>18</sub> 3-cetoacil-CoA sintasa de la invención por un ácido graso de 18 carbonos, por ejemplo el ácido oleico, frente a la especificidad de dicha enzima por un ácido graso de 16 carbonos, por ejemplo el ácido palmitoleico, puede determinarse comparando el ratio de la concentración del ácido graso de 16 carbonos/ácido graso de 18 carbonos (ácido palmitoleico/ácido oleico) a la cual a la  
10 cual la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima frente a el ratio de la concentración del ácido graso de 20 carbonos (producto de elongación del ácido graso de 18 carbonos)/la concentración del ácido graso de 18 carbonos (producto de elongación del ácido graso de 16 carbonos) a la cual a la cual la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima. La concentración de un ácido graso puede determinarse mediante  
15 cualquier técnica conocida en el estado de la técnica apropiada para ello como, por ejemplo, técnicas espectrofotométricas o cromatográficas.

El término “ácidos grasos”, tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a biomoléculas de naturaleza lipídica formadas por una larga cadena hidrocarbonada lineal, de diferente longitud o número de átomos de carbono que presentan un grupo alquilo en un  
20 extremo y un grupo ácido en el otro extremo. Dicho término incluye ácidos grasos saturados y ácidos grasos insaturados. Los primeros no poseen dobles enlaces en la cadena hidrocarbonada que los conforma y son flexibles y sólidos a temperatura ambiente mientras que, los segundos poseen dobles o triples enlaces, son rígidos a nivel de estos enlaces y presentan una temperatura líquida o viscosa a temperatura ambiente. En este último grupo,  
25 además podemos diferenciar entre ácidos grasos monoinsaturados o MUFA (del inglés “*monounsaturated fatty acid*”) y ácidos grasos polinsaturados o PUFA (del inglés “*polyunsaturated fatty acid*”).

El término “ácido oleico” o “ácido cis-9-actadienoico”, tal y como se utiliza en el presente  
30 documento, se refiere a un ácido graso monoinsaturado de la serie omega 9 típico de los aceites vegetales como aceite de oliva, de aguacate etc. y cuya fórmula empírica es C<sub>18</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub>.

El término “ácido araquídico” o “ácido eicosanoico”, tal y como se utiliza en el presente  
35 documento, se refiere a un ácido graso saturado típico de los aceites vegetales como el cacahuete o manteca de cacao y cuya fórmula empírica es C<sub>20</sub>H<sub>40</sub>O<sub>2</sub>.

El término “ácido gondoico” o “ácido cis-11-eicosenoico”, tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a un ácido graso monoinsaturado de la serie omega 9 típico de los aceites vegetales como el de jojoba y cuya fórmula empírica es  $C_{20}H_{38}O_2$ .

5 El término “ácido erúcico” o “ácido cis-13-docosaenoico”, tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a un ácido graso monoinsaturado de la serie omega 9 típico de los aceites vegetales como el de mostaza y cuya fórmula empírica es  $C_{22}H_{42}O_2$ .

10 El término “ácido nervónico” o “ácido cis-15-tetracosenoico”, tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a un ácido graso monoinsaturado de la serie omega 9 típico de los aceites vegetales como el de la flor de la plata o moneda del Papa y cuya fórmula empírica es  $C_{24}H_{46}O_2$ .

En una realización particular de la invención, el gen que codifica la enzima que tiene actividad  $C_{18}$  3-cetoacil-CoA sintasa tiene codones optimizados para la expresión en el microorganismo recombinante, es decir en *R. toruloides*.

15 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. Los métodos y herramientas de software para la optimización de codones son bien conocidos en el estado de la técnica.

20 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 *R. toruloides* 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 condiciones adecuadas que permitan la expresión  
25 del gen que tiene actividad  $C_{18}$  3-cetoacil-CoA sintasa y de esta manera, producir ácidos grasos de cadena muy larga. 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  
30 levadura, peptona, sales de amonio, líquido macerado de maíz, urea o glutamato sódico.

Preferiblemente, dicho gen se introduce en un vector (casete) de expresión o construcción de ADN replicativo que permite la expresión del gen que codifica una enzima con actividad  $C_{18}$  3-cetoacil-CoA sintasa 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 C<sub>18</sub> 3-cetoacil-CoA sintasa 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 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 en la presente invención.

En el caso de células eucariotas, estas 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:

- 5 - 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).
- 10 - 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.
- 15 - 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).
- 20

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 las enzimas con actividad C<sub>18</sub> 3-cetoacil-CoA sintasa con capacidad para incrementar la concentración de ácidos grasos de cadena muy larga 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.

5 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 (YEp 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.
- 10 - 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).
- 15 - 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.
- 20

En una realización aún más particular y preferida de la invención, dichos genes que codifican enzimas  $C_{18}$  3-cetoacil-CoA sintasa se expresan bajo control del promotor glicerol-3-fosfato deshidrogenasa de *R. toruloides*.

25

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

30

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*.

- 5 Como se ha mencionado anteriormente, la invención contempla formas de realización en donde los vectores empleados para la expresión del gen que codifica una enzima con actividad C<sub>18</sub> 3-cetoacil-CoA sintasa 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
- 10 secuencias promotoras, terminadoras y codones optimizados para la expresión el 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 con actividad C<sub>18</sub> 3-cetoacil-CoA sintasa en el microorganismo de la
- 15 invención.

En una realización particular, el gen que codifica una enzima con actividad C<sub>18</sub> 3-cetoacil-CoA sintasa comprende al menos una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y variantes funcionalmente equivalentes de las mismas.

- 20 En una realización particular, el gen que codifica una enzima con actividad C<sub>18</sub> 3-cetoacil-CoA sintasa es el gen *AtFAERt* de *Arabidopsis thaliana* cuya enzima comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1 o una variante funcionalmente equivalente de la misma.

- 25 En otra realización particular, el gen que codifica una enzima con actividad C<sub>18</sub> 3-cetoacil-CoA sintasa es el gen *LaKCS* de *Lunaria annua* cuya enzima comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 2 o una variante funcionalmente equivalente de la misma.

En otra realización particular, el gen que codifica una enzima con actividad C<sub>18</sub> 3-cetoacil-CoA sintasa es el gen *CgKCS* de *Cardamine graeca* cuya enzima comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 3 o una variante funcionalmente equivalente de la misma.

- 30 En otra realización particular, el gen que codifica una enzima con actividad C<sub>18</sub> 3-cetoacil-CoA sintasa es el gen *CraFAERt* de *Crambe abyssinica* cuya enzima comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 4 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 5 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 10 documento, se refiere a todos aquellos polipéptidos derivados de las secuencias de las enzimas con actividad C<sub>18</sub> 3-cetoacil-CoA sintasa mostradas en las SEQ ID NO: 1-4 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 de incrementar la concentración de 15 ácidos grasos de cadena muy larga de, al menos, 18 átomos de carbono, particularmente del ácido oleico, gondoico y erúxico. Métodos para determinar la producción estos ácidos a partir de sus precursores son conocidos en el estado de la técnica. A modo ilustrativo, la determinación de la producción de ácidos grasos de cadena larga puede llevarse a cabo mediante cualquier método que permita detectar componentes orgánicos en una muestra 20 como por ejemplo, métodos cromatográficos que incluyen cromatografía de gases y cromatografía de masas. Técnicas que permiten la extracción del aceite del interior celular son conocidas en el estado de la técnica y comprenden métodos de extracción mecánica como prensado y métodos de extracción química sólido-líquido.

25 Variantes funcionalmente equivalentes de la C<sub>18</sub> 3-cetoacil-CoA sintasa de la invención 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 30 al menos un 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a las secuencias SEQ ID NO: 1-4 de las C<sub>18</sub> 3-cetoacil-CoA sintasas indicadas anteriormente.

El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse por 35 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.

5

En una realización preferida de la invención, dicho gen que codifica una enzima con actividad C<sub>18</sub> 3-cetoacil-CoA sintasa consiste en la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1.

10 En otra realización preferida de la invención, dicho gen que codifica una enzima con actividad C<sub>18</sub> 3-cetoacil-CoA sintasa consiste en la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 2.

En otra realización preferida de la invención, dicho gen que codifica una enzima con actividad C<sub>18</sub> 3-cetoacil-CoA sintasa consiste en la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 3.

15 En otra realización preferida de la invención, dicho gen que codifica una enzima con actividad C<sub>18</sub> 3-cetoacil-CoA sintasa consiste en la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 4.

20 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.

25 La cepa *Rhodospiridium toruloides* CECT 13085 se refiere a un microorganismo de la especie *Rhodospiridium toruloides* que tiene la capacidad de crecer en 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.

30 En una realización particular, el gen *FAD2* del microorganismo de la invención no es funcional. El término “FAD2” tal y como se usa en el presente documento, se refiere al gen que codifica la enzima con actividad delta-12 desaturasa que cataliza la introducción de un doble enlace en la posición delta-12 de un ácido graso de cadena muy larga. La secuencia de la proteína *FAD2* de *R. toruloides* se encuentra depositada en la base de datos GenBank  
35 (versión del 20 de marzo de 2015) bajo el número EMS18237.1. En una realización preferida

de la invención, dicho gen codifica una enzima con actividad delta-12 desaturasa cuya secuencia se muestra en la secuencia SEQ ID NO: 5.

La expresión “el gen *FAD2* no es funcional” tal y como se usa en el presente documento, se refiere a que dicho gen codifica una proteína *FAD2* cuya capacidad de introducir un doble enlace en la posición delta-12 de la cadena carbonada de un ácido graso de cadena muy larga está disminuida con respecto a la capacidad de llevar a cabo dicha síntesis por una proteína codificada por dicho gen *FAD2* funcional. De acuerdo a la presente invención, el microorganismo de la invención presenta un gen *FAD2* no funcional si la capacidad de introducir un doble enlace en la posición delta-12 de la cadena carbonada de un ácido graso de cadena muy larga por la proteína *FAD2* codificada por dicho gen *FAD2* 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 *FAD2* funcional. El gen *FAD2* de *R. toruloides*, preferiblemente de *R. toruloides* CECT 13085 puede ser no funcional consecuencia de una mutación en la secuencia de dicho gen.

La expresión “gen *FAD2* 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 *FAD2* deleccionado en su totalidad. La determinación de la funcionalidad del gen *FAD2* 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 *FAD2*. A modo ilustrativo, la determinación de la producción de ácidos grasos de cadena larga en donde se ha introducido una insaturación como consecuencia de la actividad enzimática de *FAD2* 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 término “mutación” se refiere a sustituciones, inserciones o delecciones 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 encuentra 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 entiende la pérdida de uno o más nucleótidos. Las delecciones pueden ser totales o parciales. El término “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. El término “deleción 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%, 20%, 30%, 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, existen métodos apropiados en el estado de la técnica para realizar mutaciones en la secuencia de un gen como, por ejemplo, la mutagénesis de sitio dirigido por PCR o mutagénesis de sitio dirigido por PCR en un plásmido.

10 En una realización todavía más particular, el gen *KU70* y/o el gen *KU80* del microorganismo de la invención, preferiblemente de la cepa *R. toruloides* CECT 13085, no es funcional.

El término “*KU70*”, tal y como se utiliza en el presente documento se refiere al gen de *R. toruloides* que codifica una proteína que participa en la recombinación no homóloga durante el proceso de reparación del ADN. La secuencia de *KU70* de *R. toruloides* se encuentra depositada en la base de datos GenBank (versión del 27 de mayo de 2014) bajo el número KF850470.

La expresión “gen *KU70* no es funcional”, tal y como se usa en el presente documento, se refiere a que dicho gen codifica una proteína *KU70* cuya capacidad de unión al ADN dañado y/o cuya capacidad de reclutamiento de las proteínas que intervienen en la reparación de dicho ADN está disminuida con respecto a la capacidad de llevar a cabo dicha función por una proteína codificada por dicho gen *KU70* funcional. De acuerdo a la presente invención, el microorganismo de la invención presenta un gen *KU70* no funcional si la capacidad mencionada anteriormente 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 *KU70* funcional. El gen *KU70* de *R. toruloides*, preferiblemente de *R. toruloides* CECT 13085 puede ser no funcional consecuencia de una mutación en la secuencia de dicho gen.

30 En otra realización preferida de acuerdo a la presente invención, la expresión “gen *KU70* no es funcional” también se refiere a que dicho gen está ausente en el genoma del microorganismo de la invención, consecuencia de una deleción total de la secuencia de dicho gen. En una realización preferida de la invención, el microorganismo de la invención presenta el gen *KU70* delecionado en su totalidad. La determinación de la funcionalidad del gen *KU70* 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 *KU70* como, por ejemplo, mediante técnicas que permitan detectar la sensibilidad a agentes que producen daños en el ADN.

5 El término “*KU80*”, tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere al gen de *R. toruloides* que codifica una proteína que participa en la recombinación no homóloga durante el proceso de reparación del ADN. La secuencia de *KU80* de *R. toruloides* se encuentra depositada en la base de datos GenBank (versión del 27 de mayo de 2014) bajo el número KF850471.

10

La expresión “gen *KU80* no es funcional”, tal y como se usa en el presente documento, se refiere a que dicho gen codifica una proteína *KU80* cuya capacidad de unión al ADN dañado y/o cuya capacidad de reclutamiento de las proteínas que interviene en la reparación de dicho ADN está disminuida con respecto a la capacidad de llevar a cabo dicha función por una proteína codificada por dicho gen *KU80* funcional. De acuerdo a la presente invención, el microorganismo de la invención presenta un gen *KU80* no funcional si la capacidad mencionada anteriormente 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 *KU80* funcional. El gen *KU80* de *R. toruloides*, preferiblemente de *R. toruloides* CECT 13085, puede ser no funcional consecuencia de una mutación en la secuencia de dicho gen.

20

En otra realización preferida de acuerdo a la presente invención, la expresión “gen *KU80* no es funcional” también se refiere a que dicho gen está ausente en el genoma del microorganismo de la invención, consecuencia de una deleción total de la secuencia de dicho gen. En una realización preferida de la invención, el microorganismo de la invención presenta el gen *KU80* delecionado en su totalidad. La determinación de la funcionalidad del gen *KU80* 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 *KU80* como por ejemplo, mediante técnicas que permitan detectar la sensibilidad a agentes que producen daños en el ADN.

30

En otra realización particular y preferida, el microorganismo de la invención comprende un gen que codifica una enzima con actividad C<sub>16</sub> 3-cetoacil CoA sintasa.

35

El término "C<sub>16</sub> 3-cetoacil-coA sintasa", tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a un polipéptido que pertenece a la familia de enzimas E.C. 2.3.1.199 y que cataliza la adición de dos carbonos a un ácido graso de 16 carbonos en su extremo carboxilo. De esta forma, la enzima con actividad C<sub>16</sub> 3-cetoacil-CoA sintasa de la invención es capaz de elongar en dos átomos de carbono un ácido graso de 16 carbonos, para dar lugar a un ácido graso de 18 carbonos.

Preferiblemente, el enzima con actividad C<sub>16</sub> 3-cetoacil-CoA sintasa cataliza la reacción de elongación mencionada anteriormente empleando como único sustrato ácidos grasos de 16 carbono. En una realización particular y preferida de la invención, dicha enzima emplea como sustratos al ácido palmítico o palmitoléico, es decir, tiene especificidad preferente por dichos sustratos, obteniéndose ácido esteárico y, preferentemente, oleico como productos de la reacción de elongación. No obstante, enzimas con actividad C<sub>16</sub> 3-cetoacil-CoA sintasa adecuadas para su uso en la presente invención incluyen también aquellas enzimas que poseen especificidad por más de un sustrato, en cuyo caso presentan una especificidad sustancialmente superior sobre ácidos grasos de 16 átomos de carbono que sobre átomos de carbono de mayor (por ejemplo, ácidos grasos de 18 átomos de carbono) o de menor longitud (por ejemplo, ácidos grasos de 14 átomos de carbono). Así, enzimas con actividad C<sub>16</sub> 3-cetoacil-CoA sintasa adecuadas para su uso en la presente invención incluyen aquellas que muestran una especificidad frente a ácidos grasos de 16 átomos de carbono que es de al menos 1,5 veces, al menos 3 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, al menos 10 veces, al menos 20 veces, al menos 30 veces, al menos 40 veces, al menos 50 veces, al menos 60 veces, al menos 70 veces, al menos 80 veces, al menos 90 veces, al menos 100 veces o más con respecto a la especificidad frente a ácidos grasos de 18 átomos de carbono. Dicha definición también incluye enzimas que catalizan la adición de dos carbonos a un ácido graso de 16 carbonos en su extremo carboxilo con una especificidad mayor que la especificidad que presentan por un ácido graso de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 20 carbonos o más.

Los términos "especificidad", "especificidad mayor" así como técnicas que permiten determinar la especificidad de un enzima, han sido previamente definidos en el presente documento. En una forma preferida de realización, se entiende que un enzima con actividad C<sub>16</sub> 3-cetoacil-CoA sintasa es específica frente a un sustrato de 16 átomos de carbono si su especificidad de sustrato es superior a la observada frente a un sustrato con número distinto de átomos de carbono y que presente al mismo número de insaturaciones que el sustrato de 16 átomos de carbono.

En una realización más particular y preferida de la invención, dicho gen que codifica una enzima con actividad C<sub>16</sub> 3-cetoacil-CoA sintasa es el gen *EloR1* de *R. toruloides* cuya enzima comprende la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 6 o una variante funcionalmente equivalente de la misma. El término “variante funcionalmente equivalente” se ha definido con anterioridad en el presente documento. En concreto, las variantes funcionalmente equivalentes de dicha C<sub>16</sub> 3-cetoacil-CoA sintasa mantendrán la capacidad de incrementar la concentración de ácido oleico a partir de ácidos de 16 carbonos, particularmente del ácido palmítico y palmitoleico. Métodos para determinar la producción ácido oleico a partir de dichos precursores son conocidos en el estado de la técnica. A modo ilustrativo, la determinación de la producción de ácido oleico 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. Técnicas que permiten la extracción del aceite del interior celular son conocidas en el estado de la técnica y comprenden métodos de extracción mecánica como prensado y métodos de extracción química sólido-líquido.

Variantes funcionalmente equivalentes de dicha C<sub>16</sub> 3-cetoacil-CoA sintasa 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 SEQ ID NO: 6 de dicha C<sub>16</sub> 3-cetoacil-CoA sintasa indicada anteriormente.

En una realización todavía más particular y preferida de la invención, dicho gen que codifica una enzima con actividad C<sub>16</sub> 3-cetoacil-CoA sintasa consiste en la SEQ ID NO: 6

#### Procedimiento para obtener una biomasa microbiana rica en aceite rico en ácidos grasos de cadena muy larga

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un procedimiento para obtener una biomasa microbiana enriquecida en aceite rico en ácidos grasos de cadena muy larga, en adelante “primer procedimiento de la invención”, 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, y

ii) separar la biomasa microbiana del caldo de cultivo,

5 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

10 tipo de producto tal como biocombustible. En el caso particular de la presente invención, la biomasa microbiana está enriquecida en aceite rico en ácidos grasos de cadena muy larga.

El término "aceite", tal y como se utiliza en el presente documento, hace referencia a una composición grasa formada por acilglicéridos, es decir ésteres en los que uno, dos o tres

15 moléculas de ácidos grasos se unen a una molécula de glicerina, formando monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos, respectivamente. Además, dicho aceite puede comprender ácidos grasos libres, y otras sustancias liposolubles tales como fosfolípidos, esfingolípidos o esteroides. Típicamente, el aceite está compuesto por triacilgliceroides en más de un 90% del total de la composición.

20 El término "biomasa microbiana enriquecida en aceite rico en ácidos grasos de cadena muy larga", tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a una biomasa microbiana con un contenido en aceite rico en ácidos grasos de cadena muy larga de, al menos, el 40%, al menos, el 50%, al menos, el 60% o, al menos, el 70% de su peso seco total. Dicho

25 término también se refiere a una biomasa microbiana cuyo contenido en ácidos grasos de cadena muy larga representan, al menos el 5% (p/p), al menos el 10% (p/p), al menos el 20%, al menos el 25% (p/p), al menos, el 30% (p/p), al menos, el 35% (p/p), al menos, el 40% (p/p), o, al menos, el 50% (p/p) con respecto al total de ácidos grasos de dicho microorganismo.

30 En una realización particular de la invención, dichos ácidos grasos de cadena muy larga representan, al menos, un 15% (p/p) con respecto al total de los ácidos grasos de dicho microorganismo. En otra realización particular de la invención, dichos ácidos grasos de cadena muy larga representan, al menos un 20% (p/p), al menos un 25% (p/p), al menos un

35 30% (p/p), al menos un 35% (p/p), al menos un 40% (p/p), al menos un 50% (p/p) o más con respecto al total de los ácidos grasos de dicho microorganismo.



En una realización más particular, dichos ácidos grasos de cadena muy larga se seleccionan de un grupo que consiste en ácido araquídico, ácido gondoico, ácido erúcico, ácido nervónico, ácido behénico, ácido lignocérico, ácido eicosadienoico, ácido docosadienoico, o combinaciones de los mismos.

En una realización todavía más particular de la invención, el ácido gondoico representa al menos el 20% (p/p) con respecto al total de ácidos grasos de dicho microorganismo. En otra realización todavía más particular de la invención, el ácido erúcico representa al menos el 20% (p/p) con respecto al total de ácidos grasos de dicho microorganismo. En otra realización todavía más particular de la invención, el ácido nervónico representa al menos el 5% (p/p) con respecto al total de ácidos grasos de dicho microorganismo. Técnicas para determinar el contenido en ácidos grasos se han mencionado anteriormente en el contexto del primer aspecto de la 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 al primer procedimiento de la invención.

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.

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 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 carbono y una fuente de nitrógeno. Ejemplos no limitativos de medios de cultivo líquidos adecuados para llevar a cabo el primer procedimiento de la invención incluyen 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, liquido macerado de maíz 9.6 g/L pH 6.0, glicerina 110 g/L), medio MBO3-11 (liquido macerado de maíz 9.6 g/L, azúcares de hidrolizado de paja de trigo 110 g/L, pH 6.0) y medio MBO3-12 (liquido macerado de maíz 9.6 g/L, azúcares de melazas de remolacha 40 g/L, pH 5.0). En una forma de realización particular, el medio de cultivo es un medio sólido. Ejemplos no limitativos de medios de cultivo sólidos adecuados para llevar a cabo el primer procedimiento de la invención incluyen el 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, liquido macerado de maíz 9.6 g/L pH 6.0, glicerina 110 g/L, agar 2%).

10

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

15

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.

20

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.

25

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.

30

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 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 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,

35

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 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 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).

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 la 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.

5 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.

10 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.

15 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.

20 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*, *Scytalidium thermophilu*, *Thermonospora cubata*, *Rhodosporillum rubrum*, *Cellulomonas fimi*, *Clostridium stercocarium*, *Bacillus polymyxa*, *Pyrococcus furiosus*, *Acidothermus cellulotycus*,  
25 *Saccharophagus degradans*, etc.

30 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 "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,  
poda de vid, poda de olivo y combinaciones de las mismas. En una realización preferida,  
35 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.

Preferiblemente, dichas combinaciones de hidrolizados mencionadas anteriormente tienen al  
5 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  
10 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  
15 biomasa:glicerina es 75:25.

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  
20 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  
25 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  
30 “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  
35 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. 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 una 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 ácidos grasos. 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 ácidos grasos de cadena muy larga con al menos un gen que codifica una enzima con actividad C<sub>18</sub> 3-cetoacil-CoA sintasa y, con la delección del gen *FAD2* y, adicionalmente con un gen que codifica una enzima con actividad C<sub>16</sub> 3-cetoacil-CoA sintasa.

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 ácido oleico. La duración del cultivo es variable, aunque típicamente el cultivo se realiza durante 5 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.

5

Las condiciones en las que se lleva a cabo el cultivo del microorganismo de la invención pueden ajustarse para aumentar el porcentaje de aceite 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 aceite 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.

15

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 aceite rico en ácidos grasos de cadena larga deseados. El experto en la materia 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 en la materia entenderá que es posible llevar a cabo una monitorización del cultivo para determinar el porcentaje de un determinado ácido graso de cadena larga que se acumule en la biomasa a lo largo del tiempo (por ejemplo, mediante la determinación de la cantidad de ácido gondoico, erúcico o nervónico por unidad de masa en el cultivo usando cualquier método apropiado para ello conocido en el estado de la técnica).

Una vez alcanzada la cantidad de biomasa deseada y/o la cantidad intracelular de aceite rico en ácidos grasos de cadena muy larga 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, 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.

35



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, centrifugación, presión, decantación y combinaciones de los mismos.

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

Biomasa microbiana

- 10 En otro aspecto, la presente invención también se refiere a la biomasa microbiana enriquecida en aceite rico en ácidos grasos de cadena muy larga obtenible según el primer procedimiento de la invención, en adelante "biomasa microbiana de la invención". El término "biomasa microbiana" se ha descrito en el segundo aspecto de la invención y se aplica de igual manera en el presente aspecto.

15

En una realización particular, la biomasa enriquecida en aceite rico en ácidos grasos de cadena muy larga tiene un contenido en aceite de al menos el 40% del peso seco, al menos el 50% del peso seco, al menos el 60% del peso seco, o al menos el 70% del peso seco.

- 20 En una realización particular, los ácidos grasos de cadena muy larga representan, al menos, el 15% (p/p), al menos, el 20% (p/p), al menos, el 25% (p/p), al menos, el 30% (p/p), al menos, el 35% (p/p), al menos, el 40% (p/p), al menos, el 50% (p/p) o más con respecto al total de ácidos grasos del microorganismo de la invención.

- 25 En una realización más particular, dichos ácidos grasos de cadena muy larga se seleccionan de un grupo que consiste en ácido araquídico, ácido gondoico, ácido erúxico, ácido nervónico, ácido behénico, ácido lignocérico, ácido eicosadienoico, ácido docosadienoico, o combinaciones de los mismos.

- 30 En una realización todavía más particular de la invención, el ácido gondoico representa al menos el 20% (p/p) con respecto al total de ácidos grasos de dicho microorganismo. En otra realización todavía más particular de la invención, el ácido erúxico representa al menos el 20% (p/p) con respecto al total de ácidos grasos de dicho microorganismo. En otra realización todavía más particular de la invención, el ácido nervónico representa al menos el  
35 5% (p/p) con respecto al total de ácidos grasos de dicho microorganismo. Técnicas para

determinar el contenido en ácidos grasos se han mencionado anteriormente en el contexto del primer aspecto de la invención.

5 Procedimiento para obtener una preparación enriquecida en aceite rico en ácidos grasos de cadena muy larga

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con un procedimiento para obtener una preparación enriquecida en aceite rico en ácidos grasos de cadena muy larga, en adelante  
10 “segundo procedimiento de la invención”, 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,
- 15 ii) separar la biomasa microbiana del caldo de cultivo,
- iii) extraer el aceite rico en ácidos grasos de cadena muy larga de la biomasa microbiana obtenida en la etapa (ii).

La primera etapa del segundo procedimiento de la invención comprende cultivar el  
20 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”, “biomasa microbiana” así como las realizaciones  
25 particulares y preferidas de dichos términos han sido detallados anteriormente y se interpretan de igual manera en el contexto del segundo procedimiento de la invención.

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

35

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.

5

La tercera etapa del segundo procedimiento de la invención comprende extraer el aceite rico en ácidos grasos de cadena muy larga de la biomasa microbiana obtenida en la segunda etapa de dicho procedimiento.

10 Métodos adecuados para extraer dicho aceite 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.

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

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 el presente documento, se refiere a una sustancia que disuelve un soluto cuyas  
20 moléculas contienen átomos de carbono. El término “disolvente orgánico inmiscible en agua”, tal y como se utiliza en el presente documento, se refiere a un disolvente orgánico con poca o ninguna capacidad para mezclarse con el agua. Ejemplos ilustrativos no limitativos de disolventes orgánicos inmiscibles en agua incluyen n-hexano, acetato de etilo, éter de petróleo, éter-etílico, terc-butil-metil éter, acetato de etilo, acetona, etil-metil cetona,  
25 benceno, tolueno, xileno. Así, en una realización preferida, dicho disolvente orgánico inmiscible en agua se selecciona del grupo que consiste en éter de petróleo, éter etílico, terc-butil-metil éter, acetato de etilo, acetona, etil-metil cetona, benceno, tolueno, xileno y combinaciones de los mismos.

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

Procedimiento para obtener biolubricantes

La preparación enriquecida en ácidos grasos de cadena muy larga obtenida a partir de la biomasa microbiana de acuerdo a la presente invención puede ser procesada químicamente para dar lugar a productos de interés en la industria.

5 Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención se relaciona con un procedimiento para obtener biolubricantes a partir de la preparación enriquecida en aceite rico en ácidos grasos de cadena muy larga, obtenida según el segundo procedimiento de la invención, en adelante “tercer procedimiento de la invención”, que comprende:

- 10 i) obtener una preparación enriquecida en aceite rico en ácidos grasos de cadena muy larga en donde dicha obtención se lleva a cabo según el procedimiento para obtener una preparación enriquecida en aceite rico en ácidos grasos de cadena muy larga de la presente invención
- ii) refinar el aceite rico en ácidos grasos de cadena muy larga obtenido en la etapa (i)
- 15 iii) convertir el aceite rico en ácidos grasos de cadena muy larga obtenido en la etapa (ii) en biolubricantes.

El término “biolubricante”, tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a un lubricante que se deriva de la biomasa, tal como residuos animales, de plantas o  
20 microbianos que no es tóxico para la vida animal ni para la vida acuática y que puede degradarse mediante la acción de microorganismos en un periodo de tiempo relativamente breve. En una realización preferida de la invención dichos biolubricantes se obtienen a partir de una biomasa microbiana enriquecida en aceite rico en ácidos grasos de cadena muy larga. El término “biomasa microbiana enriquecida en aceite rico en ácidos grasos de  
25 cadena muy larga” ha sido definido previamente en el contexto del primer método de la invención y aplica de igual manera en el contexto del tercer procedimiento de la invención.

En una primera etapa, el tercer procedimiento de la invención comprende obtener una preparación enriquecida en aceite rico en ácidos grasos de cadena muy larga según el  
30 procedimiento del segundo aspecto de la invención.

En una segunda etapa, el tercer procedimiento de la invención comprende refinar el aceite rico en ácidos grasos de cadena muy larga obtenido a partir del segundo procedimiento de la invención.

35

El término “refinación” o “refino”, tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere al proceso de purificación de una sustancia química obtenida muchas veces a partir de un recurso natural. Numerosos métodos son conocidos en el estado de la técnica para la refinación de sustancias. Por ejemplo, la refinación de aceites, tal como un aceite rico en ácido gundóico, erúxico o nervónico, se logra a menudo a través de la destilación o fraccionamiento. Un gas se puede refinar también de esta manera enfriándolo o comprimiéndolo hasta su licuefacción. Los gases y líquidos también se pueden refinar por extracción con un solvente que disuelva la sustancia de interés o bien las impurezas.

5 En una realización particular, el aceite rico en ácidos grasos de cadena muy larga obtenido de acuerdo al segundo procedimiento de la invención se refina mediante alcoholisis en medio ácido. En esta reacción se puede utilizar un catalizador para mejorar la velocidad y el rendimiento final. La alcoholisis en medio ácido se realiza empleando un ácido como catalizador. La acidificación puede realizarse mediante el uso de cualquier ácido como, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido fosfórico. El alcohol utilizado en la reacción está preferentemente en exceso entre 5 y 40 veces con respecto a la biomasa microbiana de la que se obtiene la preparación enriquecida en aceite rico en ácidos grasos de cadena muy larga. Típicamente, la reacción se deja proceder con agitación constante entre 20 y 36 horas a una temperatura de entre 40 y 70°C. De manera preferida, al alcoholisis se realiza con alcoholes que presentan 1, 2, 3 o 4 carbonos, siendo el metanol el alcohol más preferido.

En una tercera etapa, el tercer procedimiento de la invención comprende convertir el aceite rico en ácidos grasos de cadena muy larga refinado obtenido en la etapa ii) en biolubricantes. El experto en la materia entenderá que existen en la técnica numerosos procedimientos para convertir ácidos grasos, tales como ácido gundóico, ácido erúxico o ácido nervónico, en biolubricantes que incluyen, sin limitación los procedimientos mostrados en el documento US8357643 B2. Dichos métodos están basados en una etapa de modificación química de los ácidos grasos obteniendo derivados epoxi en presencia de un catalizador básico para la obtención de un diéster, seguida de una etapa de hidrogenación que da lugar a mono alcoholes y de acilación que finalmente genera monoésteres.

Típicamente, las modificaciones químicas realizadas a dichos ácidos grasos libres incluyen reacciones de alquilación, adición de un radical, acilación, reacciones eno, aminoalquilación, co-oligomerización, hidroformilación, epoxidación y aciloxilación.

35

A modo ilustrativo, no limitativo la obtención de biolubricantes de acuerdo a la tercera etapa de dicho tercer procedimiento de la invención puede llevarse a cabo mediante un primer paso de epoxidación de los ácidos grasos y un segundo paso en donde se lleva a cabo una reacción entre dichos ácidos grasos modificados con anhídridos carboxílicos en presencia de un catalizador dando lugar a un biolubricante. Dicha tercera etapa también puede llevarse a cabo mediante un primer paso de epoxidación de los ácidos grasos, un segundo paso de hidrogenación de dichos ácidos grasos obteniéndose así un intermediario con grupos hidroxilos y un tercer paso de acilación de dichos grupos hidroxilos con un agente acilante teniendo como resultado la obtención de un biolubricante. Típicamente los catalizadores básicos comprenden una amina terciaria como la trietilamina.

#### Usos de la invención

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 enriquecida en aceite rico en ácidos grasos de cadena muy larga según el primer procedimiento de la invención.

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 enriquecida en aceite rico en ácidos grasos de cadena muy larga según el segundo procedimiento de la invención.

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 biolubricantes según el tercer procedimiento de la invención.

Los términos "microorganismo", "biomasa microbiana", "biolubricantes" y sus particularidades han sido descritos en el contexto del microorganismo y del primer procedimiento de la invención, y son aplicables al primer, segundo y tercer uso de la invención. Asimismo, también son aplicables de igual manera los modos de realización particulares y preferidos del microorganismo y del primer, segundo y tercer procedimiento de la invención.

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.

## 5 EJEMPLOS

### **Ejemplo 1: Construcción de casetes integrativos en *Rhodospiridium toruloides*.**

A partir de las secuencias depositadas en Genbank se sintetizaron los genes que codifican las enzimas con actividad C<sub>18</sub>-cetoacil-CoA sintasa (elongasa). Las secuencias de estos polipéptidos son las que se muestran en las SEQ ID NO: 1-4 y 6. Los fragmentos obtenidos se clonaron 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 pNEOL86-119-148-149. A continuación, estos vectores se digirieron con la endonucleasa mitocondrial I-SceI y cada casete de expresión, conteniendo el promotor, el gen de la elongasa y Tnos, se clonó en los vectores pNEOL85, pNEOL111 o pNEOL112, originando los vectores pNEOL120-136-154-155. El vector pNEOL85 contiene otro casete de expresión 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* (pPGK47) y del terminador T35S del virus mosaico de la coliflor. El vector pNEOL111 es idéntico al vector pNEOL85 salvo que su promotor pPGK está truncado y solo contiene unos 580 pb (pPGK47-t). El vector pNEOL112 es idéntico al vector pNEOL111 salvo el marcador de selección está cambiado por un gen de resistencia a higromicina (*hphRt*). Por último, los vectores pNEOL120-136-154-155 se cortaron con PacI y un fragmento de unos 4 kb, portando los distintos casetes de expresión, se clonaron en los plásmidos Ti pNEOL57 o pNEOL105, dando lugar a los casetes integrativos pNEOL126-136-163-164 (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 pre-inóculo de *A. tumefaciens* llevando el plásmido integrativo 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 µM con una DO<sub>660</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  $DO_{600}$  inicial de 1.5. Tras 6h de incubación se recogen 100µl de cada cultivo y se realiza un co-cultivo sobre una membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm en medio MI suplementado en acetosiringona a 200 µM, se incubaba 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 µg/mL) y geneticina (35 µg/mL) o higromicina (40 µg/mL).

Los transformantes se picaron en medio YPD suplementado con geneticina (35 µg/mL) o higromicina (40 µg/mL). La integración de los casetes conteniendo las diferentes elongasas en el genoma de la levadura se comprobó mediante PCR utilizando oligonucleótidos específicos O21+ (SEQ ID NO: 7), O22- (SEQ ID NO: 8).

La presencia de los casetes en el genoma de la levadura también se comprobó mediante hibridación. Para ello, ADN genómico de los transformantes se cortó con una enzima de restricción (KpnI) y en cada caso se hibridaron con una sonda, amplificada con los oligonucleótidos O65+ (SEQ ID NO: 9) y O65- (SEQ ID NO: 10), específica del dominio conservado de las elongasas. La sonda se marcaron según el protocolo descrito en el kit de Roche (*DIG High Prime DNA labeling and detection Starter kit I*). Tanto los ensayos de hibridación como los de PCR confirmaron la integración de los casetes de expresión en el genoma de los diferentes transformantes.

Clones conteniendo al menos una copia del gen *AtFAERt* (*Arabidopsis thaliana*) según SEQ ID NO:1, o del gen *LaKCSRt* (*Lunaria annua*) según SEQ ID NO:2 se cultivaron en placas de medio MBO3-2 a 30°C durante 2 días. La Tabla 1 muestra los resultados de algunos de los clones analizados y de la cepa parental CECT 13085. Aproximadamente 0,5 g de células se recogieron y la biomasa se secó en una estufa a 65°C durante 24 horas. El aceite se extrajo con n-hexano y la composición de los ácidos grasos se determinó mediante CG-FID. El aceite extraído a partir de los clones seleccionados mostró la presencia de ácido gondoico (>20% del total de los ácidos grasos) así como pequeñas cantidades de ácido erúxico, todos ellos ausentes en el aceite extraído de la cepa parental. El contenido de ácidos grasos de cadena muy larga (superior a 20 átomos de carbono) en el aceite se incrementó entre 6 y 7 veces.



**Tabla 1: Producción ácido gondoico. Composición del aceite (ácidos grasos) en clones recombinantes expresando el gen *AtFAERt* o el gen *LaKCSRt***

		C16:0	C18:0	C18:1Δ9	C18:2Δ9,12	C20:0	<b>C20:1Δ11</b>	C22:1Δ13	%AG ≥ C20
-	CECT 13085	21,2	10,0	42,2	19,9	5,3	<b>0,0</b>	0,0	5,3
<i>AtFAERt</i>	T126-3	17,3	2,3	28,8	16,0	8,9	<b>22,1</b>	4,6	35,6
	T126-4	16,8	2,1	27,9	14,0	9,0	<b>24,3</b>	5,9	39,2
	T126-7	13,5	1,5	23,5	15,9	11,2	<b>25,0</b>	9,3	45,5
	T126-10	18,0	2,5	29,7	16,6	9,1	<b>20,7</b>	3,5	33,2
	T126-25	16,0	3,6	28,8	15,3	6,9	<b>22,4</b>	7,2	36,4
	T126-28	12,3	0,0	28,2	21,0	10,3	<b>21,2</b>	7,0	38,5
<i>LaKCSRt</i>	T163-15	15,0	3,5	27,8	16,9	5,9	<b>20,6</b>	4,2	30,7
	T163-18	17,0	3,5	29,2	14,1	5,1	<b>21,0</b>	3,9	30,1
	T163-27	16,7	3,9	30,1	14,5	5,1	<b>20,3</b>	3,5	28,9
	T163-28	15,7	3,6	28,2	15,9	5,5	<b>21,0</b>	4,1	30,6
	T163-36	15,2	3,7	28,5	15,9	5,6	<b>20,8</b>	4,2	30,6
	T163-39	14,2	3,1	26,5	15,2	5,8	<b>22,9</b>	5,6	30,6

5 El clon T126-25 se cultivó en matraces de 500 mL conteniendo 100 mL de los medios de cultivo 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, liquido macerado de maíz 9.6 g/L a pH6, glicerina 110 g/L), MBO3-11 (liquido macerado de maíz 9.6 g/L, azúcares de hidrolizado de paja de trigo 110 g/L, a pH 6.0) y MBO3-12 (liquido macerado de maíz 9.6 g/L, azúcares de melazas de remolacha 40

10 g/L, a pH 5.0). Los cultivos crecieron a 250 rpm, 30°C durante 96 h. Finalizados los cultivos, las células se recogieron por centrifugación y la biomasa de cada matraz se secó en una estufa a 65°C durante 24 horas. A partir de la biomasa de cada matraz se determinó el contenido en aceite por gravimetría mediante extracción con n-hexano. La composición de los ácidos grasos de los aceites se determinó mediante CG-FID. Los resultados obtenidos

15 (Tabla 2) confirmaron de nuevo la presencia del ácido gondoico (>20% de los ácidos grasos totales) y de pequeñas cantidades de ácido erúxico. Por el contrario, el aceite extraído de la cepa parental no mostró ninguno de estos ácidos grasos en su composición. En estos casos el contenido de ácidos grasos de cadena muy larga en el aceite se incrementó más de 10 veces.

20

**Tabla 2: Producción ácido gondoico. Composición del aceite (ácidos grasos) en clones recombinantes expresando el gen *AtFAERt* (medios líquidos)**

		C14: 0	C16: 0	C16: 1	C18: 0	C18:1 Δ9	C18:2Δ9, 12	C20: 0	<b>C20:1Δ 11</b>	C22:1Δ 13	%AG ≥ C20
MBO3- 2	CECT 13085	1,4	27,9	1,1	7,0	51,7	9,7	1,3	<b>0,0</b>	0,0	1,3
	T126-25	1,3	22,4	2,7	2,6	35,9	7,7	1,2	<b>22,6</b>	2,7	26,5
MBO3- 11	CECT 13085	1,6	28,0	0,8	7,9	53,4	6,7	1,4	<b>0,0</b>	0,0	1,4
	T126-25	1,1	16,9	1,8	1,8	36,3	7,0	1,9	<b>24,8</b>	8,3	35,0
MBO3- 12	CECT 13085	1,2	25,0	0,6	4,6	55,7	10,6	2,4	<b>0,0</b>	0,0	2,4
	T126-25	0,9	17,5	1,4	1,7	35,5	13,1	3,3	<b>20,2</b>	5,1	28,6

**Ejemplo 4: Producción de aceite enriquecido en ácido gondoico mediante expresión de dos cetoacil-CoA sintasas**

5

Clones conteniendo al menos una copia del gen *AtFAERt* (*Arabidopsis thaliana*) según SEQ ID NO:1, y al menos una copia del gen del gen *Elo1Rt* (*R. toruloides*) según SEQ ID NO:6 se cultivaron en placas de medio MBO3-2 a 30°C durante 2 días. La Tabla 3 muestra los resultados de algunos de los clones analizados y de la cepa parental CECT 13085. Aproximadamente 0,5 g de células se recogieron y la biomasa se secó en una estufa a 65°C durante 24 horas. El aceite se extrajo con n-hexano y la composición de los ácidos grasos se determinó mediante CG-FID. El aceite extraído a partir de los clones seleccionados mostró la presencia de ácido gondoico (>20% del total de los ácidos grasos) así como pequeñas cantidades de ácido erúxico, todos ellos ausentes en el aceite extraído de la cepa parental. Debido a este cambio, el contenido de ácidos grasos de cadena muy larga en el aceite se incrementó entre 7 y 10 veces.

10

15

**Tabla 3: Producción ácido gondoico. Composición del aceite (ácidos grasos) en clones recombinantes expresando el gen *AtFAERt* y el gen *Elo1Rt***

	C16:0	C18:0	C18:1Δ9	C18:2Δ9,12	C20:0	<b>C20:1Δ11</b>	C22:1Δ13	%AG ≥ C20
CECT 13085	22,8	12,1	43,5	17,5	3,9	<b>0,0</b>	0,0	3,9
T116-126-26	13,7	4,7	31,2	16,5	6,9	<b>21,1</b>	3,9	31,9
T116-126-37	12,9	4,7	31,0	15,9	6,8	<b>21,3</b>	4,6	32,7
T116-126-38	13,5	5,5	30,8	16,5	6,6	<b>20,4</b>	3,9	30,9
T116-126-40	13,1	5,4	31,6	16,5	6,7	<b>20,1</b>	3,8	30,6
T116-126-64	10,4	2,5	25,9	16,4	8,2	<b>22,0</b>	12,4	42,6
T116-126-68	15,3	5,4	30,7	17,2	7,0	<b>18,7</b>	3,3	29,0

20

El clon T116-126-64 se cultivó en matraces de 500 mL conteniendo 100 mL de los medios de cultivo MBO3-2, MBO3-11 o MBO3-12. Los cultivos crecieron a 250 rpm, 30°C durante 96 h. Finalizados los cultivos, las células se recogieron por centrifugación y la biomasa de cada matraz se secó en una estufa a 65°C durante 24 horas. La extracción de aceite y la composición de los ácidos grasos se determinaron como se indica en el ejemplo 3. Los resultados obtenidos (Tabla 4) confirmaron la presencia del ácido gondoico (>24% de los ácidos grasos totales) y de ácido erúxico. El aceite extraído de la cepa parental no mostró ninguno de estos ácidos grasos en su composición. En estos casos el contenido de ácidos grasos de cadena muy larga en el aceite se incrementó más de 10 veces.

10

**Tabla 4: Producción ácido gondoico. Composición del aceite (ácidos grasos) en clones recombinantes expresando el gen *AtFAERt* y el gen *Elo1Rt* (medios líquidos)**

		C14: 0	C16: 0	C16: 1	C18: 0	C18:1Δ 9	C18:2Δ9, 12	C20: 0	C20:1Δ1 1	C22:1Δ1 3	%AG ≥ C20
MBO3-2	CECT 13085	1,4	28,6	1,2	6,7	52,4	8,6	1,1	0,0	0,0	1,1
	T116-126- 64	1,2	19,9	1,3	2,8	32,6	7,3	1,6	24,2	4,5	30,3
MBO3- 11	CECT 13085	1,7	28,8	0,8	7,7	53,4	6,3	1,3	0,0	0,0	1,3
	T116-126- 64	0,9	12,8	1,3	1,2	33,9	7,3	2,2	24,8	9,2	36,1
MBO3- 12	CECT 13085	1,3	26,4	0,7	4,8	55,7	9,0	2,1	0,0	0,0	2,1
	T116-126- 64	0,9	14,9	1,1	1,2	32,0	10,7	3,3	23,3	7,8	34,4

#### **Ejemplo 5: Producción de aceite enriquecido en ácido erúxico**

Clones conteniendo al menos una copia del gen *CraFAERt* de *Crambe abyssinica* según SEQ ID NO:4 se cultivaron en placas de medio MBO3-2 a 30°C durante 2 días. La Tabla 5 muestra los resultados de algunos de los clones analizados y de la cepa parental CECT 13085. Aproximadamente 0,5 g de células se recogieron y la biomasa se secó en una estufa a 65°C durante 24 horas. El aceite se extrajo con n-hexano y la composición de los ácidos grasos se determinó mediante CG-FID. El aceite extraído a partir de los clones seleccionados mostró la presencia de ácido erúxico (>20% del total de los ácidos grasos), así como pequeñas cantidades de ácido gondoico y nervónico, todos ellos ausentes en el aceite extraído de la cepa parental. El contenido de ácidos grasos de cadena muy larga en el aceite se incrementó unas 4-5 veces.

**Tabla 5: Producción ácido erúxico. Composición del aceite (ácidos grasos) en clones recombinantes expresando el gen *CraFAERt***

	C16: 0	C16: 1	C18: 0	C18:1Δ 9	C18:2Δ9,1 2	C20: 0	C20:1Δ1 1	<b>C22:1Δ1 3</b>	C24:1Δ1 5	%AG ≥ C20
CECT 13085	24,3	3,5	4,0	43,5	16,7	8,0	0,0	<b>0,0</b>	0,0	8,0
T170-13	14,8	10,0	1,6	21,9	12,0	9,8	2,5	<b>24,0</b>	2,2	38,5
T170-15	18,1	8,2	1,6	26,5	13,5	9,2	3,8	<b>17,7</b>	1,3	32,1
T170-16	14,8	9,9	1,4	21,8	12,1	8,9	2,8	<b>24,7</b>	2,4	38,8
T170-25	16,9	8,8	1,6	24,8	12,9	9,1	3,3	<b>19,7</b>	1,8	33,9
T170-33	17,5	8,0	1,7	26,0	13,2	9,0	3,6	<b>17,9</b>	1,8	32,2
T170-39	13,9	10,4	1,6	20,5	13,9	9,5	2,4	<b>23,9</b>	2,7	38,5

### Ejemplo 6: Producción de aceite enriquecido en ácido nervónico.

Clones conteniendo al menos una copia del gen *CgKCSRt* de *Cardamine graeca* según SEQ ID NO:3 se cultivaron inicialmente en placas de medio MBO3-2 a 30°C durante 2 días.

- 5 La Tabla 6 muestra los resultados del análisis de algunos clones y de la cepa parental CECT 13085. Aproximadamente 0,5 g de células se recogieron y la biomasa se secó en una estufa a 65°C durante 24 horas. El aceite se extrajo con n-hexano y la composición de los ácidos grasos se determinó mediante CG-FID. El aceite extraído a partir de los clones seleccionados mostró la presencia de ácido nervónico (4-19% del total de los ácidos grasos), así como pequeñas cantidades de ácido gondoico y erúxico, todos ellos ausentes
- 10 en el aceite extraído de la cepa parental. El contenido de ácidos grasos de cadena muy larga (superior a 20 átomos de carbono) en el aceite se incrementó unas 4-6 veces.

**Tabla 6: Producción ácido nervónico. Composición del aceite (ácidos grasos) en clones recombinantes expresando el gen *CgKCSRt***

	C16: 0	C16: 1	C18: 0	C18:1Δ 9	C18:2Δ9,1 2	C20: 0	C20:1Δ1 1	C22:1Δ1 3	<b>C24:1Δ1 5</b>	%AG ≥ C20
CECT 13085	21,6	1,1	6,8	42,5	21,2	5,6	0,0	0,0	<b>0,0</b>	5,6
T164-28	16,3	2,6	2,4	29,3	23,1	9,2	3,2	5,1	<b>4,3</b>	21,7
T164-31	17,0	2,7	2,0	30,2	18,9	7,6	2,8	5,7	<b>7,7</b>	23,8
T164-59	12,5	6,9	1,4	23,2	17,6	7,1	2,0	5,6	<b>19,1</b>	33,9
T164-86	17,4	3,1	2,5	29,2	19,9	7,2	3,8	5,9	<b>5,8</b>	22,7
T164-88	15,6	3,3	2,2	27,4	23,0	8,4	3,1	5,7	<b>6,4</b>	23,6
T164-90	18,7	2,8	2,8	30,5	19,4	6,6	4,1	5,6	<b>4,6</b>	20,8

15

El clon T164-59 se cultivó en matraces de 500 mL conteniendo 100 mL de medio MBO3-2 o MBO3-12. Los cultivos se crecieron a 250 rpm, 30°C durante 96 h. La extracción de aceite y la composición de los ácidos grasos se determinaron como se indica en el ejemplo 3.

Los resultados obtenidos (Tabla 7) confirmaron la presencia del ácido nervónico (más de un 5% de los ácidos grasos totales) así como similares cantidades de los ácidos gondoico y erúcico. El aceite extraído de la cepa parental no mostró ninguno de estos ácidos grasos en su composición. En estos casos el contenido de ácidos grasos de cadena muy larga en el aceite se incrementó más de 10 veces.

**Tabla 7: Producción ácido nervónico. Composición del aceite (ácidos grasos) en clones recombinantes expresando el gen *CgKCSRt* (medios líquidos)**

		C16: 0	C16: 1	C18: 0	C18:1 Δ9	C18:2Δ9, 12	C20: 0	C20:1Δ 11	C22:1Δ 13	<b>C24:1Δ 15</b>	%AG ≥ C20
MBO3- 2	CECT 13085	29,1	1,4	7,6	50,7	8,6	1,1	0,0	0,0	<b>0,0</b>	1,1
	T164-59	25,1	2,1	3,7	35,7	8,1	1,5	6,0	7,8	<b>5,4</b>	20,6
MBO3- 12	CECT 13085	25,8	0,0	6,0	55,5	8,9	2,5	0,0	0,0	<b>0,0</b>	2,5
	T164-59	23,6	1,5	2,3	39,4	10,8	3,3	4,9	5,5	<b>5,9</b>	19,7

**REIVINDICACIONES**

1. Un microorganismo de la especie *Rhodosporidium toruloides* modificado genéticamente con al menos un gen que codifica una enzima con actividad C<sub>18</sub> 3-cetoacil-CoA sintasa.
- 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*.
3. Un microorganismo según las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicha enzima con actividad C<sub>18</sub> 3-cetoacil-CoA sintasa comprende al menos una secuencia seleccionada de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, y variantes funcionalmente equivalentes de las mismas.
- 10 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 C<sub>18</sub> 3-cetoacil-CoA sintasa pertenece a la cepa *R. toruloides* CECT 13085.
- 15 5. Un microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho microorganismo comprende adicionalmente un gen que codifica un enzima con actividad C<sub>16</sub> 3-cetoacil-CoA sintasa.
- 20 6. Un microorganismo según la reivindicación 5, en donde dicho gen que codifica un enzima con actividad C<sub>16</sub> 3-cetoacil-CoA sintasa comprende la secuencia SEQ ID NO: 6 o una variante funcionalmente equivalente de la misma.
- 25 7. Un procedimiento para obtener una biomasa microbiana enriquecida en aceite rico en ácidos grasos de cadena muy larga que comprende:
  - 30 i) cultivar un microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 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

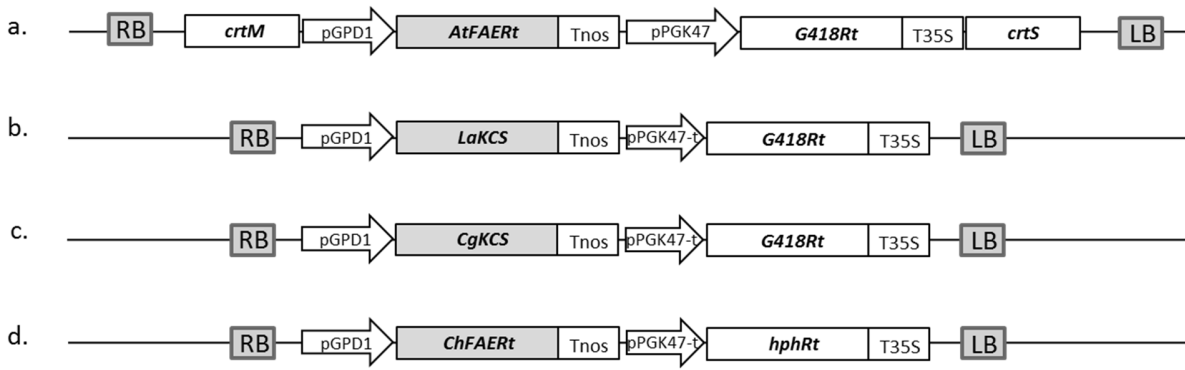
- ii) separar la biomasa microbiana del caldo de cultivo.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, en donde la fuente de carbono se selecciona del grupo que consiste en glucosa, sacarosa, glicerol, melazas, xilosa, arabinosa, manosa, fructosa, acetato y combinaciones de las mismas.
- 5
9. Procedimiento según la reivindicación 8 en donde la fuente de carbono es un hidrolizado de biomasa lignocelulósica.
- 10
10. Procedimiento, según la reivindicación 9, 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.
- 15
11. Procedimiento según la reivindicación 8, en donde la fuente de carbono es glucosa.
12. Procedimiento según la reivindicación 8, en donde la fuente de carbono es xilosa.
13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, 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
14. Procedimiento según la reivindicación 13, en donde la fuente de nitrógeno es una sal de amonio, preferiblemente cloruro de amonio.
- 25
15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 14, 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

16. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 15, 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
  - concentración de oxígeno disuelto de al menos el 20%, y/o
  - agitación constante.
17. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 16 en donde la etapa (ii) se realiza mediante un método seleccionado del grupo que consiste en filtración, microfiltración, centrifugación y combinaciones de los mismos.
18. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 17 que comprende además secar la biomasa microbiana de la etapa (ii).
19. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 18, en donde dichos ácidos grasos de cadena muy larga representan, al menos, un 30% (p/p) con respecto al total de ácidos grasos de dicho microorganismo.
20. Procedimiento según la reivindicación 19, en donde dichos ácidos grasos de cadena muy larga se seleccionan de un grupo que consiste en ácido araquídico, ácido gondoico, ácido erúxico, ácido nervónico, ácido behénico, ácido lignocérico, ácido eicosadienoico, ácido docosadienoico, o combinaciones de los mismos.
21. Procedimiento según la reivindicación 20, en donde dicho ácido gondoico representa, al menos, un 20% (p/p) con respecto al total de ácidos grasos de dicho microorganismo.
22. Procedimiento según la reivindicación 20, en donde dicho ácido erúxico representa, al menos, un 20% (p/p) con respecto al total de ácidos grasos de dicho microorganismo.
23. Procedimiento según la reivindicación 20, en donde dicho ácido nervónico representa, al menos, un 5% (p/p) con respecto al total de ácidos grasos de dicho microorganismo.



24. Biomasa microbiana enriquecida en aceite rico en ácidos grasos de cadena muy larga obtenida según el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 23.
- 5 25. Procedimiento para obtener una preparación enriquecida en aceite rico en ácidos grasos de cadena muy larga que comprende:
- 10 i) cultivar un microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 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; y
  - iii) extraer el aceite rico en ácidos grasos de cadena muy larga de la biomasa microbiana obtenida en la etapa (ii).
- 15 26. Procedimiento según la reivindicación 25, en donde la extracción de la etapa (iii) se lleva a cabo mediante métodos mecánicos, mediante métodos de extracción sólido-líquidos o combinaciones de los mismos.
- 20 27. Procedimiento según la reivindicación 26, en donde el método de extracción mecánica se realiza usando prensa de tornillo, prensa francesa o molino de bolas.
- 25 28. Procedimiento según la reivindicación 26, en donde el método de extracción sólido-líquido se realiza usando un disolvente orgánico inmiscible en agua.
- 30 29. Procedimiento según la reivindicación 28, en donde dicho disolvente orgánico inmiscible en agua se selecciona del grupo que consiste en éter de petróleo, éter-etílico, terc-butil-metil éter, acetato de etilo, acetona, etil-metil cetona, benceno, tolueno, xileno y combinaciones de los mismos.
- 30 30. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 25 a 29, que comprende además secar la biomasa microbiana de la etapa (ii).

31. Uso del microorganismo según las reivindicaciones 1 a 6 para obtener una biomasa microbiana enriquecida en aceite rico en ácidos grasos de cadena muy larga, para obtener una preparación enriquecida en ácidos grasos de cadena muy larga o para obtener biolubricantes



**Figura 1**

# ES 2 608 968 A1

## SEQUENCE LISTING

<110> NEOL BIOSOLUTIONS S.A.  
<120> PRODUCCIÓN DE ACEITES MICROBIANOS CON ALTO CONTENIDO EN ACIDOS GRASOS DE CADENA MUY LARGA  
<130> P12272ES00  
<160> 10  
<170> PatentIn version 3.5  
<210> 1  
<211> 506  
<212> PRT  
<213> Arabidopsis thaliana  
<400> 1

Met Thr Ser Val Asn Val Lys Leu Leu Tyr Arg Tyr Val Leu Thr Asn  
1 5 10 15

Phe Phe Asn Leu Cys Leu Phe Pro Leu Thr Ala Phe Leu Ala Gly Lys  
20 25 30

Ala Ser Arg Leu Thr Ile Asn Asp Leu His Asn Phe Leu Ser Tyr Leu  
35 40 45

Gln His Asn Leu Ile Thr Val Thr Leu Leu Phe Ala Phe Thr Val Phe  
50 55 60

Gly Leu Val Leu Tyr Ile Val Thr Arg Pro Asn Pro Val Tyr Leu Val  
65 70 75 80

Asp Tyr Ser Cys Tyr Leu Pro Pro Pro His Leu Lys Val Ser Val Ser  
85 90 95

Lys Val Met Asp Ile Phe Tyr Gln Ile Arg Lys Ala Asp Thr Ser Ser  
100 105 110

Arg Asn Val Ala Cys Asp Asp Pro Ser Ser Leu Asp Phe Leu Arg Lys  
115 120 125

Ile Gln Glu Arg Ser Gly Leu Gly Asp Glu Thr Tyr Ser Pro Glu Gly  
130 135 140

Leu Ile His Val Pro Pro Arg Lys Thr Phe Ala Ala Ser Arg Glu Glu

# ES 2 608 968 A1

145		150		155		160									
Thr	Glu	Lys	Val	Ile	Ile	Gly	Ala	Leu	Glu	Asn	Leu	Phe	Glu	Asn	Thr
				165					170					175	
Lys	Val	Asn	Pro	Arg	Glu	Ile	Gly	Ile	Leu	Val	Val	Asn	Ser	Ser	Met
			180					185					190		
Phe	Asn	Pro	Thr	Pro	Ser	Leu	Ser	Ala	Met	Val	Val	Asn	Thr	Phe	Lys
		195					200					205			
Leu	Arg	Ser	Asn	Ile	Lys	Ser	Phe	Asn	Leu	Gly	Gly	Met	Gly	Cys	Ser
	210					215					220				
Ala	Gly	Val	Ile	Ala	Ile	Asp	Leu	Ala	Lys	Asp	Leu	Leu	His	Val	His
225					230					235					240
Lys	Asn	Thr	Tyr	Ala	Leu	Val	Val	Ser	Thr	Glu	Asn	Ile	Thr	Gln	Gly
				245					250					255	
Ile	Tyr	Ala	Gly	Glu	Asn	Arg	Ser	Met	Met	Val	Ser	Asn	Cys	Leu	Phe
			260					265					270		
Arg	Val	Gly	Gly	Ala	Ala	Ile	Leu	Leu	Ser	Asn	Lys	Ser	Gly	Asp	Arg
		275					280						285		
Arg	Arg	Ser	Lys	Tyr	Lys	Leu	Val	His	Thr	Val	Arg	Thr	His	Thr	Gly
	290					295					300				
Ala	Asp	Asp	Lys	Ser	Phe	Arg	Cys	Val	Gln	Gln	Glu	Asp	Asp	Glu	Ser
305					310					315					320
Gly	Lys	Ile	Gly	Val	Cys	Leu	Ser	Lys	Asp	Ile	Thr	Asn	Val	Ala	Gly
				325					330					335	
Thr	Thr	Leu	Thr	Lys	Asn	Ile	Ala	Thr	Leu	Gly	Pro	Leu	Ile	Leu	Pro
			340					345					350		
Leu	Ser	Glu	Lys	Phe	Leu	Phe	Phe	Ala	Thr	Phe	Val	Ala	Lys	Lys	Leu
		355					360					365			
Leu	Lys	Asp	Lys	Ile	Lys	His	Tyr	Tyr	Val	Pro	Asp	Phe	Lys	Leu	Ala
	370					375					380				

# ES 2 608 968 A1

Val Asp His Phe Cys Ile His Ala Gly Gly Arg Ala Val Ile Asp Glu  
 385 390 395 400

Leu Glu Lys Asn Leu Gly Leu Ser Pro Ile Asp Val Glu Ala Ser Arg  
 405 410 415

Ser Thr Leu His Arg Phe Gly Asn Thr Ser Ser Ser Ser Ile Trp Tyr  
 420 425 430

Glu Leu Ala Tyr Ile Glu Ala Lys Gly Arg Met Lys Lys Gly Asn Lys  
 435 440 445

Ala Trp Gln Ile Ala Leu Gly Ser Gly Phe Lys Cys Asn Ser Ala Val  
 450 455 460

Trp Val Ala Leu Arg Asn Val Lys Ala Ser Ala Asn Ser Pro Trp Gln  
 465 470 475 480

His Cys Ile Asp Arg Tyr Pro Val Lys Ile Asp Ser Asp Leu Ser Lys  
 485 490 495

Ser Lys Thr His Val Gln Asn Gly Arg Ser  
 500 505

<210> 2  
 <211> 505  
 <212> PRT  
 <213> Lunaria annua

<400> 2

Met Thr Ser Ile Asn Val Lys Leu Leu Tyr His Tyr Val Ile Thr Asn  
 1 5 10 15

Phe Phe Asn Leu Cys Phe Phe Pro Leu Thr Ala Ile Leu Ala Gly Lys  
 20 25 30

Ala Ser Arg Leu Thr Thr Asn Asp Leu His His Phe Tyr Ser Tyr Leu  
 35 40 45

Gln His Asn Leu Ile Thr Leu Thr Leu Leu Phe Ala Phe Thr Val Phe  
 50 55 60

# ES 2 608 968 A1

Gly Ser Val Leu Tyr Phe Val Thr Arg Pro Lys Pro Val Tyr Leu Val  
65 70 75 80

Asp Tyr Ser Cys Tyr Leu Pro Pro Gln His Leu Ser Ala Gly Ile Ser  
85 90 95

Lys Thr Met Glu Ile Phe Tyr Gln Ile Arg Lys Ser Asp Pro Leu Arg  
100 105 110

Asn Val Ala Leu Asp Asp Ser Ser Ser Leu Asp Phe Leu Arg Lys Ile  
115 120 125

Gln Glu Arg Ser Gly Leu Gly Asp Glu Thr Tyr Gly Pro Glu Gly Leu  
130 135 140

Phe Glu Ile Pro Pro Arg Lys Asn Leu Ala Ser Ala Arg Glu Glu Thr  
145 150 155 160

Glu Gln Val Ile Asn Gly Ala Leu Lys Asn Leu Phe Glu Asn Thr Lys  
165 170 175

Val Asn Pro Lys Glu Ile Gly Ile Leu Val Val Asn Ser Ser Met Phe  
180 185 190

Asn Pro Thr Pro Ser Leu Ser Ala Met Val Val Asn Thr Phe Lys Leu  
195 200 205

Arg Ser Asn Ile Lys Ser Phe Asn Leu Gly Gly Met Gly Cys Ser Ala  
210 215 220

Gly Val Ile Ala Ile Asp Leu Ala Lys Asp Leu Leu His Val His Lys  
225 230 235 240

Asn Thr Tyr Ala Leu Val Val Ser Thr Glu Asn Ile Thr Gln Asn Ile  
245 250 255

Tyr Thr Gly Asp Asn Arg Ser Met Met Val Ser Asn Cys Leu Phe Arg  
260 265 270

Val Gly Gly Ala Ala Ile Leu Leu Ser Asn Lys Pro Gly Asp Arg Arg  
275 280 285

Arg Ser Lys Tyr Arg Leu Ala His Thr Val Arg Thr His Thr Gly Ala

# ES 2 608 968 A1

290	295	300
Asp 305	Asp Lys Ser Phe 310	Cys Val Arg Gln Glu Glu Asp Asp Ser Gly 315 320
Lys Thr Gly Val 325	Ser Leu Ser Lys Asp 330	Ile Thr Gly Val Ala Gly Ile 335
Thr Val Gln Lys Asn Ile Thr Thr Leu Gly Pro Leu Val Leu Pro Leu 340 345 350		
Ser Glu Lys Ile Leu Phe Val Val Thr Phe Val Ala Lys Lys Leu Leu 355 360 365		
Lys Asp Lys Ile Lys His Tyr Tyr Val Pro Asp Phe Lys Leu Ala Val 370 375 380		
Asp His Phe Cys Ile His Ala Gly Gly Arg Ala Val Ile Asp Val Leu 385 390 395 400		
Glu Lys Asn Leu Gly Leu Ser Pro Ile Asp Val Glu Ala Ser Arg Ser 405 410 415		
Thr Leu His Arg Phe Gly Asn Thr Ser Ser Ser Ser Ile Trp Tyr Glu 420 425 430		
Leu Ala Tyr Ile Glu Ala Lys Gly Arg Met Lys Lys Gly Asn Lys Ala 435 440 445		
Trp Gln Ile Ala Val Gly Ser Gly Phe Lys Cys Asn Ser Ala Val Trp 450 455 460		
Val Ala Leu Arg Asn Val Lys Ala Ser Ala Asn Ser Pro Trp Glu His 465 470 475 480		
Cys Ile His Lys Tyr Pro Val Gln Met Tyr Ser Gly Ser Ser Lys Ser 485 490 495		
Glu Thr Arg Ala Gln Asn Gly Arg Ser 500 505		

<210> 3  
<211> 506



# ES 2 608 968 A1

<212> PRT

<213> Cardamine graeca

<400> 3

Met Thr Ser Ile Asn Val Lys Leu Leu Tyr His Tyr Val Leu Thr Asn  
1 5 10 15

Phe Phe Asn Leu Cys Leu Phe Pro Leu Thr Ala Phe Pro Ala Gly Lys  
20 25 30

Ala Ser Gln Leu Thr Thr Asn Asp Leu His His Leu Tyr Ser Tyr Leu  
35 40 45

His His Asn Leu Ile Thr Val Thr Leu Leu Phe Ala Phe Thr Val Phe  
50 55 60

Gly Ser Ile Leu Tyr Ile Val Thr Arg Pro Lys Pro Val Tyr Leu Val  
65 70 75 80

Asp Tyr Ser Cys Tyr Leu Pro Pro Arg His Leu Ser Cys Gly Ile Ser  
85 90 95

Arg Val Met Glu Ile Phe Tyr Glu Ile Arg Lys Ser Asp Pro Ser Arg  
100 105 110

Glu Val Pro Phe Asp Asp Pro Ser Ser Leu Glu Phe Leu Arg Lys Ile  
115 120 125

Gln Glu Arg Ser Gly Leu Gly Asp Glu Thr Tyr Gly Pro Gln Gly Leu  
130 135 140

Val His Asp Met Pro Leu Arg Met Asn Phe Ala Ala Ala Arg Glu Glu  
145 150 155 160

Thr Glu Gln Val Ile Asn Gly Ala Leu Glu Lys Leu Phe Glu Asn Thr  
165 170 175

Lys Val Asn Pro Arg Glu Ile Gly Ile Leu Val Val Asn Ser Ser Met  
180 185 190

Phe Asn Pro Thr Pro Ser Leu Ser Ala Met Val Val Asn Thr Phe Lys  
195 200 205

# ES 2 608 968 A1

Leu Arg Ser Asn Ile Lys Ser Phe Ser Leu Gly Gly Met Gly Cys Ser  
 210 215 220

Ala Gly Ile Ile Ala Ile Asp Leu Ala Lys Asp Leu Leu His Val His  
 225 230 235 240

Lys Asn Thr Tyr Ala Leu Val Val Ser Thr Glu Asn Ile Thr His Ser  
 245 250 255

Thr Tyr Thr Gly Asp Asn Arg Ser Met Met Val Ser Asn Cys Leu Phe  
 260 265 270

Arg Met Gly Gly Ala Ala Ile Leu Leu Ser Asn Lys Ala Gly Asp Arg  
 275 280 285

Arg Arg Ser Lys Tyr Lys Leu Ala His Thr Val Arg Thr His Thr Gly  
 290 295 300

Ala Asp Asp Gln Ser Phe Arg Cys Val Arg Gln Glu Asp Asp Asp Arg  
 305 310 315 320

Gly Lys Ile Gly Val Cys Leu Ser Lys Asp Ile Thr Ala Val Ala Gly  
 325 330 335

Lys Thr Val Thr Lys Asn Ile Ala Thr Leu Gly Pro Leu Val Leu Pro  
 340 345 350

Leu Ser Glu Lys Phe Leu Tyr Val Val Ser Leu Met Ala Lys Lys Leu  
 355 360 365

Phe Lys Asn Lys Ile Lys His Thr Tyr Val Pro Asp Phe Lys Leu Ala  
 370 375 380

Ile Asp His Phe Cys Ile His Ala Gly Gly Arg Ala Val Ile Asp Val  
 385 390 395 400

Leu Glu Lys Asn Leu Ala Leu Ser Pro Val Asp Val Glu Ala Ser Arg  
 405 410 415

Ser Thr Leu His Arg Phe Gly Asn Thr Ser Ser Ser Ser Ile Trp Tyr  
 420 425 430

Glu Leu Ala Tyr Ile Glu Ala Lys Gly Arg Met Lys Lys Gly Asn Lys

# ES 2 608 968 A1

435	440	445
Val Trp Gln Ile Ala Ile Gly Ser Gly Phe Lys Cys Asn Ser Ala Val		
450	455	460
Trp Val Ala Leu Cys Asn Val Lys Pro Ser Val Asn Ser Pro Trp Glu		
465	470	475
His Cys Ile Asp Arg Tyr Pro Val Glu Ile Asn Tyr Gly Ser Ser Lys		
	485	490
		495
Ser Glu Thr Arg Ala Gln Asn Gly Arg Ser		
	500	505
<p>&lt;210&gt; 4          &lt;211&gt; 506          &lt;212&gt; PRT          &lt;213&gt; <i>Crambe abyssinica</i></p>		
<p>&lt;400&gt; 4</p>		
Met Thr Ser Ile Asn Val Lys Leu Leu Tyr His Tyr Val Ile Thr Asn		
1	5	10
15		
Leu Phe Asn Leu Cys Phe Phe Pro Leu Thr Ala Ile Val Ala Gly Lys		
20	25	30
Ala Ser Arg Leu Thr Ile Asp Asp Leu His His Leu Tyr Tyr Ser Tyr		
35	40	45
Leu Gln His Asn Val Ile Thr Ile Ala Pro Leu Phe Ala Phe Thr Val		
50	55	60
Phe Gly Ser Ile Leu Tyr Ile Val Thr Arg Pro Lys Pro Val Tyr Leu		
65	70	75
80		
Val Glu Tyr Ser Cys Tyr Leu Pro Pro Thr Gln Cys Arg Ser Ser Ile		
	85	90
		95
Ser Lys Val Met Asp Ile Phe Tyr Gln Val Arg Lys Ala Asp Pro Phe		
	100	105
		110
Arg Asn Gly Thr Cys Asp Asp Ser Ser Trp Leu Asp Phe Leu Arg Lys		
115	120	125

# ES 2 608 968 A1

Ile Gln Glu Arg Ser Gly Leu Gly Asp Glu Thr His Gly Pro Glu Gly  
 130 135 140

Leu Leu Gln Val Pro Pro Arg Lys Thr Phe Ala Ala Ala Arg Glu Glu  
 145 150 155 160

Thr Glu Gln Val Ile Val Gly Ala Leu Lys Asn Leu Phe Glu Asn Thr  
 165 170 175

Lys Val Asn Pro Lys Asp Ile Gly Ile Leu Val Val Asn Ser Ser Met  
 180 185 190

Phe Asn Pro Thr Pro Ser Leu Ser Ala Met Val Val Asn Thr Phe Lys  
 195 200 205

Leu Arg Ser Asn Val Arg Ser Phe Asn Leu Gly Gly Met Gly Cys Ser  
 210 215 220

Ala Gly Val Ile Ala Ile Asp Leu Ala Lys Asp Leu Leu His Val His  
 225 230 235 240

Lys Asn Thr Tyr Ala Leu Val Val Ser Thr Glu Asn Ile Thr Tyr Asn  
 245 250 255

Ile Tyr Ala Gly Asp Asn Arg Ser Met Met Val Ser Asn Cys Leu Phe  
 260 265 270

Arg Val Gly Gly Ala Ala Ile Leu Leu Ser Asn Lys Pro Arg Asp Arg  
 275 280 285

Arg Arg Ser Lys Tyr Glu Leu Val His Thr Val Arg Thr His Thr Gly  
 290 295 300

Ala Asp Asp Lys Ser Phe Arg Cys Val Gln Gln Gly Asp Asp Glu Asn  
 305 310 315 320

Gly Lys Thr Gly Val Ser Leu Ser Lys Asp Ile Thr Glu Val Ala Gly  
 325 330 335

Arg Thr Val Lys Lys Asn Ile Ala Thr Leu Gly Pro Leu Ile Leu Pro  
 340 345 350

# ES 2 608 968 A1

Leu Ser Glu Lys Leu Leu Phe Phe Val Thr Phe Met Ala Lys Lys Leu  
 355 360 365

Phe Lys Asp Lys Val Lys His Tyr Tyr Val Pro Asp Phe Lys Leu Ala  
 370 375 380

Ile Asp His Phe Cys Ile His Ala Gly Gly Arg Ala Val Ile Asp Val  
 385 390 395 400

Leu Glu Lys Asn Leu Gly Leu Ala Pro Ile Asp Val Glu Ala Ser Arg  
 405 410 415

Ser Thr Leu His Arg Phe Gly Asn Thr Ser Ser Ser Ser Ile Trp Tyr  
 420 425 430

Glu Leu Ala Tyr Ile Glu Ala Lys Gly Arg Met Lys Lys Gly Asn Lys  
 435 440 445

Val Trp Gln Ile Ala Leu Gly Ser Gly Phe Lys Cys Asn Ser Ala Val  
 450 455 460

Trp Val Ala Leu Ser Asn Val Lys Ala Ser Thr Asn Ser Pro Trp Glu  
 465 470 475 480

His Cys Ile Asp Arg Tyr Pro Val Lys Ile Asp Ser Asp Ser Ala Lys  
 485 490 495

Ser Glu Thr Arg Ala Gln Asn Gly Arg Ser  
 500 505

<210> 5  
 <211> 451  
 <212> PRT  
 <213> Rhodosporidium toruloides

<400> 5

Met Ala Ala Thr Leu Arg Gln Arg Ala Ala Ala Gln Pro Ala Pro Arg  
 1 5 10 15

Lys Glu Lys Glu His Asp Val Leu Ala Ser Ser Asp Ser Glu Asp Glu  
 20 25 30

His Asn Gln Asp Pro Ile Lys Ala Leu Glu Asn Glu Tyr Pro Pro Phe  
 35 40 45

# ES 2 608 968 A1

Val Val Pro Asn Tyr Ser Ile Lys Glu Leu Leu Gly Ala Ile Pro Ala  
 50 55 60

His Cys Phe Glu Arg Ser Ala Leu Arg Ser Ser Leu Tyr Val Val Gly  
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Met Leu Ala Gly Leu Gly Tyr Ala Ala Ser His Ile Asp  
 85 90 95

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

Phe Ala Ala Lys Trp Ala Leu Trp Ser Ala Tyr Trp Val Leu Ala Gly  
 115 120 125

Trp Val Gly Thr Gly Val Trp Ile Leu Gly His Glu Cys Gly His Gln  
 130 135 140

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

His Ser Phe Val Leu Val Pro Tyr His Ser Trp Arg Ile Ser His Ala  
 165 170 175

Lys His His Ala Ala Thr Gly His Met Thr Arg Asp Glu Val Phe Val  
 180 185 190

Pro Arg Thr Ala Ser Phe Arg Asn Pro Lys Pro Thr Gly Arg Lys Leu  
 195 200 205

Arg Val Ala Pro Asn Ile Glu Leu Asp Glu Leu Leu Glu Asp Ala Pro  
 210 215 220

Leu Tyr Arg Leu Gly Trp Leu Leu Val Gln Gln Leu Phe Gly Trp Pro  
 225 230 235 240

Ala Tyr Leu Phe Ser Asn Ala Ser Gly Gln Leu Trp Tyr Pro Lys Trp  
 245 250 255

Thr Asn His Phe Asp Pro Ser Ser Leu Val Phe Asp Ala Arg His Arg  
 260 265 270

# ES 2 608 968 A1

Gly Gln Val Leu Ile Ser Asp Ala Phe Leu Ala Gly Met Ile Gly Leu  
 275 280 285

Leu Val Ala Phe Gly Gln Val Val Gly Leu Ala Gly Val Val Lys Tyr  
 290 295 300

Tyr Phe Ile Pro Tyr Leu Phe Val Asn His Trp Leu Val Met Ile Thr  
 305 310 315 320

Tyr Leu Gln His Thr Asp Pro Ser Leu Pro His Tyr Asn Ala Gly Met  
 325 330 335

Trp Asn Phe Gln Arg Gly Ala Leu Cys Thr Ile Asp Arg Asn Met Leu  
 340 345 350

Gly Pro Val Gly Pro Tyr Leu Met His Gly Ile Cys Glu Thr His Val  
 355 360 365

Ala His His Leu Ser Ser Lys Ile Pro His Tyr His Ala Trp Glu Ala  
 370 375 380

Thr Glu Ala Leu Lys Asn Phe Leu Gly Glu His Tyr Asn Tyr Thr Asp  
 385 390 395 400

Glu Pro Met Phe Leu Ser Leu Trp Lys Ala Tyr Arg Gln Cys Arg Tyr  
 405 410 415

Val Asp Asp Glu Gly Asp Val Leu Phe Tyr Arg Asp Ala Tyr Gly Arg  
 420 425 430

Ala Arg Arg Val Ala Val Pro Ala Glu Val Pro Ser Asp Ser Gly Val  
 435 440 445

Glu Gly Leu  
 450

- <210> 6
- <211> 329
- <212> PRT
- <213> Rhodosporidium toruloides

<400> 6

Met Thr Ser Tyr Ala Ala Gln Pro Arg Ala Ser Ser Phe Leu Ala Ser

# ES 2 608 968 A1

1	5	10	15
Phe	Ala	Asp	Gly 20
Pro	Lys	Pro	Pro
Pro	Thr	Pro	Thr
Pro	Thr	Gly	Ile
Pro	Ala	Pro	Pro
25	30		
Leu	Ala	Ser	Thr
35	Tyr	Asp	Leu
			Phe
			Leu
			Asn
			Pro
			Val
			Thr
			Pro
			Leu
			Ala
			45
Phe	Gly	Leu	Val
50	Tyr	Phe	Ala
			Thr
			Ala
			Lys
			Thr
			Leu
			Ser
			His
			Tyr
			Gln
			60
Asn	Gly	Lys	Asn
65	Arg	Ile	Lys
			Gly
			Lys
			Gly
			Trp
			Asp
			Val
			Ala
			Val
			Leu
			80
Val	His	Asn	Ile
			Leu
			Leu
			Ala
			Val
			Tyr
			Ser
			Ala
			Trp
			Thr
			Phe
			Leu
			Gly
			95
Thr	Ala	Pro	Gln
			Ile
			Phe
			Gly
			Ala
			Phe
			Val
			Arg
			Gly
			Tyr
			Met
			Ala
			Asp
			110
Gly	Phe	Ala	Gly
			Leu
			Thr
			His
			Ala
			Phe
			Cys
			Asp
			Ser
			Ser
			Phe
			Ala
			Ile
			125
Trp	Gln	Gln	Thr
130	Thr	Thr	Phe
			Pro
			Lys
			Phe
			Ala
			Tyr
			Leu
			Phe
			Tyr
			Val
			Ser
			140
Lys	Phe	Tyr	Glu
145	Ile	Val	Asp
			Thr
			Ala
			Ile
			Leu
			Leu
			Leu
			Lys
			Gly
			Lys
			160
Lys	Val	Gly	Met
			Leu
			Gln
			Ser
			Tyr
			His
			His
			Met
			Gly
			Ala
			Ile
			Trp
			Thr
			175
Met	Tyr	Ala	Ala
			Tyr
			Ala
			Thr
			Gln
			Ala
			Met
			Pro
			Val
			Trp
			Leu
			Phe
			Val
			190
Val	Phe	Asn	Ser
			Phe
			Ile
			His
			Ser
			Ile
			Met
			Tyr
			Thr
			Tyr
			Tyr
			Ala
			Phe
			195
Ser	Thr	Val	Ser
			Leu
			Pro
			Phe
			Pro
			Arg
			Phe
			Leu
			Lys
			Lys
			Ser
			Leu
			Thr
			210
Arg	Leu	Gln	Ile
225	Thr	Gln	Phe
			Leu
			Val
			Gly
			Gly
			Ser
			Leu
			Ala
			Ala
			Ser
			240
			235
			230



# ES 2 608 968 A1

Tyr Leu Phe Ile Lys Leu Pro Asp Leu Pro Ser Ala Gly Glu Met Ser  
245 250 255

Ala Ala Ala Thr Ser Ser Phe Glu Ala Gly Val Gly Ala Leu Lys Arg  
260 265 270

Asp Gly Pro Thr Cys Leu Val Asn Ala Ala Gln Arg His Ala Thr Leu  
275 280 285

Leu Asn Cys Ala Tyr Leu Val Pro Leu Thr Tyr Leu Phe Val Ala Phe  
290 295 300

Phe Phe Lys Thr Tyr Gln Lys Asn Ser Ala Ala Asn Ala Ala Ala Lys  
305 310 315 320

Ala Lys Ala Asn Ala Lys Lys Ala Asn  
325

<210> 7  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> oligonucleótido específico

<400> 7  
ggactagtcg ccgggatgcc aacgtcgtt 29

<210> 8  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> oligonucleótido específico

<400> 8  
ccactagtaa atgtataatt gcgggactc 29

<210> 9  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> oligonucleótido específico

# ES 2 608 968 A1

<400> 9  
caagtcgttc tcgctcggc 19

<210> 10  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> oligonucleótido específico

<400> 10  
acgacgacga ggtggtgcc 19