

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 337**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/02** (2006.01)

**C12N 9/90** (2006.01)

**C12P 7/64** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.07.2011 PCT/EP2011/061106**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.01.2012 WO2012001144**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2011 E 11729114 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.11.2016 EP 2588599**

54 Título: **Optimización de la síntesis y de la acumulación de lípidos**

30 Prioridad:

**01.07.2010 FR 1055331**

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

**16.06.2017**

73 Titular/es:

**INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE  
AGRONOMIQUE (100.0%)  
147, rue de l'Université  
75007 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**DULERMO, THIERRY y  
NICAUD, JEAN-MARC**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

ES 2 617 337 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Optimización de la síntesis y de la acumulación de lípidos.

5 Se aplican varias tecnologías, tales como la fermentación a gran escala, para la producción industrial de aceite a partir de microorganismos utilizando como sustrato unas materias grasas o glicerol. En el marco de estos proyectos, los microorganismos se utilizan como fábrica celular redirigiendo su metabolismo celular hacia la producción de compuestos de interés industrial o alimenticio, tales como los ésteres cerosos, los isoprenoides, los polihidroxicanoatos y los ácidos grasos hidroxilados. La mayoría de estas tecnologías tienen como objetivo la  
10 producción de lípidos de reserva con una estructura y/o una composición específica. Éstos comprenden los aceites enriquecidos en ácidos grasos poliinsaturados esenciales, que se pueden utilizar potencialmente como complemento alimenticio, teniendo los lípidos unas similitudes de composición con manteca de cacao y unos aceites no específicos destinados a ser utilizados en la síntesis de biocarburantes.

15 De este modo, se observa un interés creciente por mejorar la composición y el contenido en aceite de los microorganismos, particularmente levaduras.

Los microorganismos oleaginosos son unos organismos capaces de acumular unas reservas lipídicas que pueden superar el 20% de la materia seca de la célula. La levadura *Yarrowia lipolytica* es, entre estos microorganismos, una  
20 de las más estudiadas y más utilizadas, debido a su capacidad para acumular unos lípidos celulares hasta el 40% de su peso seco.

Las levaduras, y en particular *Y. lipolytica* son capaces de utilizar eficazmente unos sustratos hidrófobos, por ejemplo unos alcanos, unos ácidos grasos y unos aceites como única fuente de carbono (Fickers *et al.*, FEMS Yeast Research, 5(6-7): 527-543, 2005). Las cadenas alifáticas ingeridas pueden ser utilizadas para la producción de  
25 energía o acumuladas en formas intercambiadas o modificadas.

Las moléculas de almacenamiento tales como los triglicéridos (TG) y/o los ésteres de esterol (esteriléster; SE), incapaces de integrarse en las bicapas de fosfolípidos, se agrupan para formar el núcleo hidrófobo de cuerpos  
30 lipídicos (lipid bodies; LB).

Dichos cuerpos lipídicos han sido considerados durante mucho tiempo como un almacenamiento de lípidos neutros que pueden ser movilizados durante un periodo de privación. Sin embargo, la imagen de dichos cuerpos lipídicos como simple compartimento de almacenamiento ha tenido que ser revisada desde que se han identificado  
35 numerosas proteínas de dichos cuerpos lipídicos como unas enzimas implicadas en el metabolismo lipídico, en particular en la síntesis y/o la degradación de los triglicéridos.

En las levaduras, la síntesis de los triglicéridos sigue la vía Kennedy. Los ácidos grasos libres se activan para la coenzima A (CoA) y se utilizan para la acilación del glicerol, que es fundamental para la síntesis de los triglicéridos.  
40

En la primera etapa de ensamblaje de los triglicéridos, el glicerol-3-fosfato (G-3-P) es acilado por la aciltransferasa específica del glicerol-3-fosfato (glicerol-3-fosfato aciltransferasa o *SCT1*) para dar el ácido lisofosfatídico, que es acilado después por la aciltransferasa específica del ácido lisofosfatídico (Phosphatidic acid acyltransferase o *SLC1*) para dar el ácido fosfatídico (PA). Éste es desfosforilado después por una fosfohidrolasa específica del ácido  
45 fosfatídico (phosphatidic acid phosphohydrolase (PAP)) para liberar diacilglicerol (DAG).

En la primera etapa, el diacilglicerol es acilado o bien por una diacilgliceril aciltransferasa, o bien por una fosfolípido diacilglicerol aciltransferasa para producir unos triglicéridos.

50 La tabla 1 describe los genes implicados en el metabolismo de los ácidos grasos en las levaduras, particularmente en *Yarrowia lipolytica*, (YL). Las secuencias son accesibles por sus nombres o números de acceso en la dirección <http://cbi.labri.fr/Genolevures/index.php#>.

La solicitud PCT WO 2005/118814 divulga un conjunto de modificaciones genéticas que permite que la levadura  
55 *Saccharomyces cerevisiae* sintetice unos ácidos grasos poliinsaturados.

En las levaduras, la degradación de los ácidos grasos se produce por una beta-oxidación, un proceso en varias etapas que necesita cuatro actividades enzimáticas diferentes.

60 En las levaduras, las enzimas son esencialmente localizadas en los peroxisomas, al contrario que los mamíferos en los que están localizadas en las mitocondrias y los peroxisomas.

La movilización de los lípidos acumulados se produce durante tres fases distintas:

65 (i) durante la fase exponencial, los compuestos lipídicos almacenados se utilizan para la síntesis de los lípidos membranaarios con el fin de sostener el crecimiento y la división celular,

(ii) durante la fase estacionaria, durante el agotamiento de los nutrientes, se liberan los ácidos grasos libres, más bien lentamente, a partir de los triglicéridos y son sometidos a la  $\beta$ -oxidación peroxisomal;

5 (iii) a la salida de la fase de carencia, por ejemplo cuando las células salen de la fase estacionaria y vuelven a entrar en la fase de crecimiento vegetativo con suplementación en carbono, los depósitos lipídicos se degradan muy rápidamente en ácidos grasos libres.

10 El glicerol-3-fosfato (G3P) es un agente crucial en el metabolismo de los triglicéridos.

Existen dos vías de síntesis para el glicerol-3-fosfato.

- En la primera, el glicerol-3-fosfato se deriva del glicerol por medio de la glicerol quinasa codificada por el gen *GUT1*.
- 15 • En la segunda vía, el glicerol-3-fosfato se sintetiza directamente a partir del dihidroxiacetona fosfato (DHAP). Esta reacción es catalizada por la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (codificada por el gen *GPD1*). Esta última reacción es reversible y la formación de DHAP a partir de glicerol-3-fosfato es catalizada por una segunda isoforma de la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, cuyo gen se denomina *GUT2*.

20 Los presentes inventores han demostrado anteriormente que la inactivación del gen *GUT2* conlleva una acumulación incrementada de lípidos en las levaduras, particularmente en *Y. lipolytica* (WO 2010/004141; Beopoulos *et al.*, Appl Environ Microbiol., 74(24): 7779-7789, 2008). El gen *GUT2* codifica el isoforma Gut2p de la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, la cual cataliza la reacción de oxidación del glicerol-3-fosfato en DHAP.

25 De manera sorprendente e inesperada, la sobreexpresión de la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa codificada por el gen *GDP1* (SEC ID n°: 1; SEC ID n°: 2), que es la enzima que cataliza la reacción de síntesis del glicerol-3-fosfato a partir del DHAP, no tiene ningún efecto sobre la acumulación de lípidos en una cepa que es, por otra parte, salvaje. Asimismo, la sobreexpresión de *GPD1* en un mutante inactivado para el gen *GUT2* no tiene ningún efecto sobre la acumulación de lípidos en las levaduras.

30 Por otra parte, los inventores han demostrado que era posible obtener una acumulación de lípidos sobreexpresando el gen *GPD1* en levaduras en las que la beta-oxidación de los ácidos grasos es deficiente.

35 Esta acumulación es mucho más importante que todo lo que se ha descrito anteriormente en la técnica anterior. En particular, mientras que las cepas en las que *GUT2* está inactivado, acumulan como máximo un 50% de lípidos cuando se cultivan en presencia de ácido oleico (WO 2010/004141; Beopoulos *et al.*, Appl Environ Microbiol., 74(24): 7779-7789, 2008), las cepas que son deficientes en la beta-oxidación y que sobreexpresan el gen *GPD1* acumulan, en las mismas condiciones, más del 60% de lípidos.

40 Además, las cepas que presentan una deficiencia de la beta-oxidación y que sobreexpresan el gen *GPD1* presentan la particularidad de lisar fácilmente, lo cual no es el caso con las cepas de la técnica anterior. Esta propiedad presenta un interés desde un punto de vista industrial, ya que facilita la lisis de las células para recuperar los lípidos producidos.

45 Por lo tanto, se describe en la presente memoria una cepa de levadura en la que la beta-oxidación de los ácidos grasos es deficiente y que sobreexpresa el gen *GPD1*, siendo dicha cepa mutante capaz de acumular unos lípidos.

50 Se entiende por el término "levadura" las cepas de levadura en general, es decir que este término comprende, entre otros, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces sp.*, *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia pastoris*, *Pichia finlandica*, *Pichia trehalophila*, *Pichia koclamae*, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia minuta* (*Ogataea minuta*, *Pichia lindneri*), *Pichia opuntiae*, *Pichia thermotolerans*, *Pichia salictaria*, *Pichia guercuum*, *Pichia pipperi*, *Pichia stiptis*, *Pichia methanolica*, *Pichia sp.*, *Kluyveromyces sp.*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida albicans*.

55 Las levaduras de la invención son las levaduras oleaginosas (Ratledge, en: Ratledge C, Wilkinson SG editors, Microbial lipids, Vol 2. London: Academic press 1988). Mientras que la sobreexpresión del gen *GPD1* conduce en *S. cerevisiae*, en cualquier fondo genético, esencialmente a una acumulación de glicerol, en las levaduras oleaginosas deficientes para la beta-oxidación de los ácidos grasos da lugar a una acumulación de lípidos.

60 La presente cepa es, por lo tanto preferentemente, una cepa de levadura oleaginosa en la que la beta-oxidación de los ácidos grasos es deficiente y sobreexpresa el gen *GPD1*, siendo dicha cepa mutante capaz de acumular unos lípidos.

65 Las levaduras oleaginosas más conocidas incluyen los géneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Rhizopus*, *Trichosporon*, *Lypomyces*, *Yarrowia*. Las levaduras particularmente preferidas en el sentido de la invención

comprenden *Yarrowia lipolytica*, *Rhodotura glutinis* y *Rhodospiridium torulides*. Una levadura preferida en el sentido de la presente invención es *Yarrowia lipolytica*.

La beta-oxidación es la vía de degradación de los ácidos grasos. Hace intervenir 4 reacciones sucesivas durante las cuales intervienen una acil-CoA oxidasa cuyas 6 isoformas son codificadas por los 6 genes *POX*, una enzima multifuncional codificada por el gen *MFE1* y una 3-oxoacil-CoA tiasina codificada por el gen *POT1*. Como se ha indicado anteriormente, la beta-oxidación en las levaduras se desarrolla exclusivamente en el peroxisoma, un orgánulo citoplásmico cuya biogénesis está controlada por los genes *PEX* (véase la tabla 2). Cuando el peroxisoma no está ensamblado correctamente, o cuando no es funcional, los ácidos grasos no se degradan correctamente (WO 2006/064131; Thevenieau *et al.*, Fungal Genet Biol., 44(6): 531-42, 2007).

De manera general, las mutaciones que afectan a la beta-oxidación son unas mutaciones de pérdida de función que conllevan una disminución muy fuerte, incluso una ausencia total, de la beta-oxidación. Las mutaciones de pérdida de función pueden corresponder a unas mutaciones puntuales, a unas inserciones, a unas deleciones totales o parciales, a unas sustituciones de genes o a cualquier otra causa molecular que lleva a una disminución sustancial de la beta-oxidación.

Las cepas de levadura en las que la beta-oxidación de los ácidos grasos es deficiente comprenden todas las cepas que llevan por lo menos una mutación de pérdida de función en por lo menos un gen que codifica una enzima directamente implicada en la beta-oxidación, pero también todas las cepas que llevan por lo menos una mutación de pérdida de función que afecta a la beta-oxidación sólo de manera indirecta, en particular a través de la biogénesis o la función de las peroxisomas. Por supuesto, se entiende que las cepas descritas en la presente memoria comprenden también todas las cepas que llevan unas combinaciones de las mutaciones descritas anteriormente. Por ejemplo, entran también en el marco de la presente descripción las cepas que llevan por lo menos una mutación de pérdida de función que afecta directamente a la beta-oxidación y por lo menos una mutación de pérdida de función que afecta a la beta-oxidación sólo de manera indirecta.

Las cepas deficientes en la beta-oxidación de los ácidos grasos comprenden, según un aspecto preferido de la invención, cualquier cepa que lleva una mutación de pérdida de función en uno de los genes *PEX* listados en la tabla 2. Según otro aspecto preferido de la invención, las cepas deficientes en la beta-oxidación de los ácidos grasos comprenden las cepas que llevan por lo menos una mutación de pérdida de función en uno de los genes siguientes: *POX1*, *POX2*, *POX3*, *POX4*, *POX5*, *POX6*, *MFE1*, *POT1*. Más preferentemente, las cepas según la invención comprenden por lo menos una mutación de pérdida de función en uno por lo menos de los genes *POX1*, *POX2*, *POX3*, *POX4*, *POX5* y *POX6*. De manera aún más preferida, las cepas según la invención comprenden unas mutaciones en cada uno de los genes *POX1*, *POX2*, *POX3*, *POX4*, *POX5* y *POX6*.

Según un modo particular de realización, la invención tiene por lo tanto por objeto una nueva cepa de levadura oleaginosa, más particularmente una cepa de *Y. lipolytica*, mutante, que sobreexpresa el gen *GPD1* y que comprende por lo menos una mutación de pérdida de función en uno de los genes responsables de la beta-oxidación de los ácidos grasos, siendo dicha cepa de levadura capaz de acumular unos lípidos. Dicha cepa de levadura comprende por lo menos una mutación de pérdida de función en por lo menos uno de los genes seleccionados entre los genes *PEX*, *POX*, *MFE1* y *POT1*. De manera más particularmente preferida, los genes *POX* son parcial (*POX2* a *POX5*) o totalmente (*POX1* a *POX6*) inactivados en la cepa mutante de la invención, siendo dicha cepa mutante capaz de acumular unos lípidos.

Además de las mutaciones de pérdida de función antes citadas, que conducen a una deficiencia de la beta-oxidación, la presente cepa de levadura puede comprender una o varias mutaciones adicionales en por lo menos un gen que codifica una enzima implicada en el metabolismo de los ácidos grasos. Esta o estas mutaciones adicionales pueden tener por efecto aumentar aún más la capacidad de la cepa para acumular unos lípidos. Alternativamente, puede o pueden alterar el perfil de los ácidos grasos almacenados. Así, los presentes inventores han demostrado también que la expresión de los genes *TGL3* y *TGL4* aumenta cuando los genes *POX* se inactivan. Los genes *TGL3* y *TGL4* codifican unas lipasas implicadas en la degradación de los ácidos grasos (Kurat *et al.*, J. Biol. Chem., 281: 491-500, 2006). Sin querer estar ligado a una teoría, se puede pensar que el aumento de la expresión de estos dos genes sirve sin duda para compensar la ausencia de una vía de beta-oxidación funcional para la degradación de los ácidos grasos. La invención tiene por lo tanto también por objeto una cepa de levadura, preferentemente una cepa de levadura oleaginosa, más particularmente una cepa de *Y. lipolytica*, mutante, deficiente para la beta-oxidación, deficiente para los productos de los genes *TGL3* y *TGL4*, sobreexpresando dicha cepa el gen *GPD1* y siendo capaz de acumular unos lípidos.

Según otro modo de realización preferido de la invención, la cepa de levadura, oleaginosa, preferentemente *Y. lipolytica*, mutante, deficiente para la beta-oxidación, sobreexpresando dicha cepa el gen *GPD1* y siendo capaz de acumular unos lípidos, comprende además una mutación de pérdida de función en el gen *GUT2*.

Se ha demostrado también que la inactivación del gen *YALI0B10153g*, que codifica una  $\Delta 12$  desaturasa de ácido graso, permite aumentar la proporción de ácidos grasos de C18:1 (WO 2005/047485). Es por lo tanto también un objetivo de la presente invención proporcionar una cepa de levadura, en particular de levadura oleaginosa,

preferentemente de *Y. lipolytica*, mutante, deficiente para la beta-oxidación, que sobreexpresa el gen *GPD1* y es capaz de acumular unos lípidos, y que, además, comprenda un gen *YAL10B10153g* inactivado.

5 Según también otro aspecto, la cepa de levadura oleaginoso, preferentemente *Y. lipolytica*, mutante, deficiente para la beta-oxidación, que sobreexpresa el gen *GPD1* y que es capaz de acumular unos lípidos, contiene además un gen cuya expresión permite modificar el perfil en ácido graso de dicha cepa. En efecto, se ha detallado que la expresión ectópica de genes que codifican ciertas desaturasas permite modificar el perfil en ácidos grasos poliinsaturados en una cepa de levadura y en particular en *Y. lipolytica*. Así, la expresión de una  $\Delta 12$  desaturasa de ácido graso permite obtener unos ácidos grasos de C18:2 en mayor cantidad (WO 2005/047485). De la misma manera, la expresión de una  $\Delta 8$  desaturasa o de una  $\Delta 15$  desaturasa conduce a un cambio del perfil de los ácidos grasos en *Y. lipolytica* (WO 2005/047480; WO 2006/012325). La invención tiene por lo tanto también por objeto una cepa de levadura, en particular de *Y. lipolytica*, mutante, deficiente para la beta-oxidación, que sobreexpresa el gen *GPD1* y que es capaz de acumular unos lípidos, y que, además, expresa un gen que codifica para una enzima seleccionada entre una  $\Delta 8$  desaturasa, una  $\Delta 12$  desaturasa y una  $\Delta 15$  desaturasa. Preferentemente, dicha enzima es una  $\Delta 12$  desaturasa. Aún más preferentemente, el gen que codifica dicha  $\Delta 12$  desaturasa es el gen de *Y. lipolytica* cuyo número de acceso es el *YAL10B10153g*.

La presente descripción tiene también por objeto un procedimiento de obtención de una cepa de levadura mutante, siendo dicha cepa mutante capaz de acumular unos lípidos. En un modo preferido de realización, la levadura es una levadura oleaginoso. En un modo de realización más preferido, la levadura es *R. glutinis*, *R. toruloides* o *Y. lipolytica*. En un modo de realización aún más preferido, la levadura es *Y. lipolytica*.

Este procedimiento comprende por lo menos dos etapas, pudiendo dichas etapas ser realizadas o bien simultáneamente, o bien consecutivamente. Si las dos etapas se realizan la una después de la otra, el orden en el que se realizan importa poco. Dicho procedimiento comprende por lo tanto las etapas que consisten en:

- inactivar por lo menos un gen que controla la beta-oxidación, y
- transformar la cepa de levadura por un polinucleótido que permite la expresión del gen *GPD1*.

30 La primera etapa de dicho procedimiento consiste por lo tanto en inactivar un gen responsable de la beta-oxidación. Como se ha indicado anteriormente, estos genes son tanto los genes *POX*, *MFE1*, *POT1* (Tabla 1) como los genes *PEX* (Tabla 2).

La técnica anterior enseña también diferentes métodos que pueden permitir la obtención de cepas de levadura, particularmente de levadura oleaginoso, más particularmente *Y. lipolytica*, en las que un gen está inactivado.

Por ejemplo, se citará el método denominado POP IN/POP OUT que se ha utilizado en las levaduras, particularmente en *Y. lipolytica*, para la delección de los genes *LEU2*, *URA3* y *XPR2* como se describe en la revista de G. Barth *et al.*: (*Yarrowia lipolytica*, en: Nonconventional Yeasts in Biotechnology A Handbook (Wolf, K., Ed.), Vol. 1, 1996, p. 313-388. Springer-Verlag). Consiste en integrar un vector que comprende un gen de interés con delecciones al locus considerado, después en seleccionar la escisión de dicho vector e identificar un clon que, por recombinación, ha eliminado el gen salvaje y conservado el gen mutado.

Preferentemente, se podrá utilizar un método que conduce a la inactivación del gen de interés.

Por "inactivación" o "invalidación de un gen de interés" (los dos términos tal como se utilizan en la presente solicitud son sinónimos y tienen por lo tanto el mismo significado), se entiende cualquier método que lleva a la no expresión de la proteína nativa codificada por dicho gen de interés, por modificación del encadenamiento de los nucleótidos que constituyen dicho gen de tal manera que, a pesar de que su traducción sería efectiva, no llevaría a la expresión de la proteína nativa codificada por el gen de interés salvaje.

Preferentemente, se utiliza un método que conduce a una extinción total de la expresión del gen de interés. Esto se puede realizar mediante una delección total del gen de interés, por una delección parcial del gen de interés, por la inserción de uno o varios nucleótidos en dicho gen de interés, haciendo dicho método utilizado el gen de interés no funcional (gen de interés inactivado o invalidado), o por lo menos que codifica una proteína que no posee las propiedades de dicha proteína nativa.

Se obtiene así una cepa de levadura que no expresa el gen de interés, que se denominará a continuación en el presente texto "cepa defectiva en gen de interés".

Se puede también utilizar el método SEP (Maftahi *et al.*, Yeast, 12: 859-868, 1996) que se ha adaptado en *Y. lipolytica* para la disrupción sucesiva de los genes *POX* (Wang *et al.*, J. Bacteriol., 181: 5140-5148, 1999). Este método es más rápido, pero necesita siempre la utilización de un marcador que permita una contra-selección. Ventajosamente, se utilizará el método SEP/Cre desarrollado por Fickers *et al.* (J. Microbiol. Methods, 55/3: 727-737, 2003) y descrito en la solicitud internacional WO 2006/064131. Es un método rápido y que no necesita la utilización de un marcador que permita una contra-selección.

Este método consiste en:

- 5 1) seleccionar el gen de interés que se quiere eliminar,
- 2) construir un casete de disrupción por PCR ("Polymerase Chain Reaction") o por clonación,
- 10 3) introducir un marcador de selección que contenga a uno y otro lado unas secuencias de recombinación (ventajosamente unas secuencias *loxP* y/o *loxR* o derivadas) que permitan una recombinación entre sí para la eliminación del marcador (ventajosamente una secuencia de tipo *loxP* que permita la recombinación bajo la acción de la recombinasa Cre),
- 15 4) seleccionar las cepas con el gen de interés delecionado (transformación y selección de los transformantes) y verificar la deleción,
- 5) transformar con un vector que permita la expresión de la recombinasa (ventajosamente la recombinasa Cre que permite la recombinación de las secuencias *loxP/loxR* y la eliminación del marcador)
- 20 6) aislar un clon que presenta la deleción del gen de interés y que haya perdido el plásmido de expresión de la recombinasa.

El casete de inserción de la etapa 2 comprende un gen que codifica un marcador de selección (gen de selección), estando dicho gen preferentemente enmarcado por las regiones promotoras y terminadoras del gen de interés, con el fin de permitir la sustitución completa del gen de interés por recombinación homóloga. Según un modo particular de realización, el gen de selección está además enmarcado por una o varias secuencias de recombinación, permitiendo dichas secuencias de recombinación una recombinación entre sí, que lleva a la eliminación del gen que codifica el marcador de selección. Ventajosamente, la o las secuencias de recombinación son una o unas de las secuencias *loxP* o una o unas de las secuencias *loxR* o una o unas de las secuencias derivadas de estas secuencias de recombinación, habiendo dicha o dichas secuencias derivadas conservado la actividad de las secuencias de recombinación de origen. Preferentemente, en esta etapa, el gen que codifica el marcador de selección podrá estar enmarcado por unas secuencias de tipo *loxP* que, bajo la acción de la recombinasa Cre se recombinan entre sí dando lugar a un plásmido que comprende la secuencia del gen que codifica dicho marcador de selección.

35 La introducción del casete de invalidación en la etapa 3 en la cepa de levadura receptora se puede llevar a cabo mediante cualquier técnica conocida por el experto en la materia. Como se ha indicado anteriormente, se referirá para eso a G. Barth *et al.* (*Yarrowia lipolytica*. en: Nonconventional Yeasts in Biotechnology A Handbook (Wolf, K., Ed.), Vol. 1, 1996, p. 313-388. Springer-Verlag).

40 Los transformantes que expresan el marcador de selección se seleccionan en la etapa 4. La presencia del marcador puede ser verificada mediante cualquier método habitual conocido por el experto en la materia, como por ejemplo la PCR o la hibridación por transferencia Southern.

45 En la etapa 5, se introduce en un transformante seleccionado en la etapa anterior un plásmido que permite la expresión de una recombinasa. Preferentemente, el plásmido será portador del gen de la recombinasa Cre (Sauer, Mol. Cell. Biol., 7: 2087-2096, 1987) que permite la recombinación de las secuencias *loxP/loxR* y la eliminación del marcador. Esta técnica es utilizada habitualmente por el experto en la materia que busca escindir una secuencia integrada específica (Hoess y Abremski, J. Mol. Biol., 181: 351-362, 1984).

50 La etapa 6 es una etapa estándar de selección de un clon que ha escindido el gen de selección y que presenta, por lo tanto, un fenotipo de ausencia del marcador de selección.

55 Precisamente, el procedimiento de obtención de una cepa de levadura, particularmente de una cepa de levadura oleaginosa, más particularmente de una cepa *Y. lipolytica*, mutante, que no expresa un gen que controla la beta-oxidación, se caracteriza por que

- en una primera etapa, se construye un casete de invalidación que comprende las secuencias promotoras y terminadoras de dicho gen de levadura, particularmente de levadura oleaginosa, más particularmente de *Y. lipolytica*, que enmarca un gen que codifica un marcador de selección (gen de selección), estando dicho gen de selección enmarcado a su vez a uno y otro lado de su secuencia por una o unas secuencias de recombinación, permitiendo dichas secuencias de recombinación una recombinación entre sí que conduce a la eliminación de dicho gen que codifica el marcador de selección;
- en una segunda etapa, se introduce dicho casete de invalidación obtenido en 1, en una cepa de levadura, particularmente una cepa de levadura oleaginosa, más particularmente *Y. lipolytica*;

- en una tercera etapa, se selecciona, de entre las cepas de levaduras transformadas en la etapa 2, una cepa de levadura, particularmente una cepa de levadura oleaginosa, más particularmente una cepa de *Y. lipolytica*, defectiva para el gen de interés, cepa que ha introducido por doble recombinación (doble cross-over) el gen marcador en lugar de dicho gen de interés, conduciendo así a un gen inactivado;
- en una cuarta etapa, se verifica la invalidación de dicho gen en dicha cepa de levadura seleccionada en la etapa 3.

Según una variante, el procedimiento puede presentar además 2 etapas suplementarias, a saber:

- una quinta etapa durante la cual se transforma dicha cepa seleccionada en la etapa 4 con un vector que permite la expresión de una recombinasa con el fin de obtener la eliminación del gen que expresa el marcador de selección;
- una sexta etapa, durante la cual se aísla una cepa de levadura defectiva para el gen, y que no expresa ya el gen marcador.

El procedimiento de inactivación de un gen de la beta-oxidación puede después ser repetido con el fin de inactivar otro gen, si es necesario. El experto en la materia será capaz de inactivar tantos genes como sea necesario, por la simple repetición del procedimiento SEP de inactivación de gen. Dicha persona puede así construir las cepas de levadura mutantes descritas anteriormente, que comprenden varios genes inactivados.

Según la invención, se podrá utilizar ventajosamente una cepa de levadura que no realizará la beta-oxidación de los lípidos, por ejemplo una cepa que no expresará los genes responsables de la beta-oxidación de los lípidos como los genes *POX*, *MFE1* o *POT1*, ventajosamente una cepa que no exprese los genes *POX*, tiene no obstante los genes *POX2*, *POX3*, *POX4* y *POX5*, preferentemente los genes *POX1*, *POX2*, *POX3*, *POX4*, *POX5* y *POX6*, como por ejemplo las cepas descritas en la solicitud internacional WO 2006/064131 publicada el 22 de junio de 2006, preferentemente las cepas:

MTLY37 (Leu<sup>+</sup>, Ura<sup>+</sup>;  $\Delta$ *pox5*,  $\Delta$ *pox2*,  $\Delta$ *pox3*,  $\Delta$ *pox4::URA3*),  
 MTLY40 (Leu<sup>+</sup>, Ura<sup>-</sup>;  $\Delta$ *pox5-PT*,  $\Delta$ *pox2-PT*,  $\Delta$ *pox3-PT*,  $\Delta$ *pox4::ura3-41*),  
 MTLY64 (Leu<sup>-</sup>, Ura<sup>-</sup>; Hyg<sup>+</sup>;  $\Delta$ *pox5*,  $\Delta$ *pox2*,  $\Delta$ *pox3*,  $\Delta$ *pox4::ura3-41*, *leu2::Hyg*),  
 MTLY66 (Leu<sup>-</sup>, Ura<sup>-</sup>;  $\Delta$ *pex5*,  $\Delta$ *pox2*,  $\Delta$ *pex3*,  $\Delta$ *pox4::ura3-41*,  $\Delta$ *leu2*),  
 MTLY82 (Leu<sup>-</sup>, Ura<sup>-</sup>; Hyg<sup>+</sup>;  $\Delta$ *pox5*,  $\Delta$ *pox2*,  $\Delta$ *pox3*,  $\Delta$ *pox4::ura3-41*,  $\Delta$ *leu2*, *pox1::Hyg*),  
 MTLY86 (Leu<sup>-</sup>, Ura<sup>-</sup>;  $\Delta$ *pex5*,  $\Delta$ *pex2*,  $\Delta$ *pox3*,  $\Delta$ *pox4::ura3-41*,  $\Delta$ *leu2*,  $\Delta$ *pox1*),  
 MTLY92 (Leu<sup>-</sup>, Ura<sup>-</sup>; Hyg<sup>+</sup>;  $\Delta$ *pox5*,  $\Delta$ *pex2*,  $\Delta$ *pex3*,  $\Delta$ *pox4::ura3-41*,  $\Delta$ *leu2*,  $\Delta$ *pox1*, *pox6::Hyg*),  
 MTLY95a (Leu<sup>-</sup>, Ura<sup>-</sup>;  $\Delta$ *pex5*,  $\Delta$ *pox2*,  $\Delta$ *pex3*,  $\Delta$ *pox4::ura3-41*,  $\Delta$ *leu2*,  $\Delta$ *pox1*,  $\Delta$ *pox6*)

En otro aspecto del procedimiento, se podrá utilizar así una cepa de levadura tal como las descritas en la solicitud PCT WO 2010/004141, publicada el 14 de enero de 2010. Se podrán utilizar por ejemplo las cepas:

JMY1351 (Leu<sup>-</sup>, Ura<sup>+</sup>,  $\Delta$ *pox5*,  $\Delta$ *pox2*,  $\Delta$ *pox3*,  $\Delta$ *pox4::ura3-41*,  $\Delta$ *leu2*,  $\Delta$ *pox1*,  $\Delta$ *pox6*,  $\Delta$ *gut2*)  
 JMY1393 (Leu<sup>-</sup>, Ura<sup>+</sup>,  $\Delta$ *pox5*,  $\Delta$ *pox2*,  $\Delta$ *pox3*,  $\Delta$ *pox4::ura3-41*,  $\Delta$ *pox1*,  $\Delta$ *pox6*,  $\Delta$ *gut2*).

También en otro aspecto del procedimiento, se podrán utilizar las cepas descritas en las publicaciones Béopoulos *et al.* (Appl Environ Microbiol., 74(24): 7779-7789, 2008) y Wang *et al.* (J. Bacteriol., 181: 5140-5148, 1999).

En una segunda etapa del procedimiento, el gen *GPD1* está sobreexpresado en una de las cepas deficientes en la beta-oxidación obtenidas en la etapa anterior.

El gen *GPD1* codifica para la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa catalizando la reacción de síntesis de glicerol-3-fosfato a partir del DHAP. El gen *GPD1* puede ser sobreexpresado de todas las maneras conocidas por el experto en la materia.

Para ello, cada copia de la fase abierta de lectura *GPD1* se coloca bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas. Dichas secuencias reguladoras comprenden unas secuencias promotoras, colocadas aguas arriba (en 5') de la fase abierta de lectura de *GPD1*, y unas secuencias terminadoras, colocadas aguas abajo (en 3') de la fase abierta de lectura *GPD1*.

Preferentemente, las secuencias promotoras y terminadoras utilizadas pertenecen a genes diferentes con el fin de minimizar los riesgos de recombinación no deseados en el genoma de la cepa *Yarrowia*.

Tales secuencias promotoras son bien conocidas por el experto en la materia y pueden corresponder en particular a promotores inducibles o constitutivos. A título de ejemplo de promotores que se pueden utilizar en el procedimiento según la invención, se puede citar en particular el promotor de un gen de *Y. lipolytica* que está fuertemente reprimido por la glucosa y que es inducible por los ácidos grasos o los triglicéridos tal como el promotor *POX2* del gen de la

5 acil CoA oxidasa 2 de *Yarrowia lipolytica* y el promotor del gen *LIP2* descrito en la solicitud PCT WO 01/83773. Se puede utilizar también el promotor del gen *FBA1* del gen de la fructosa-bisfosfato aldolasa (US 2005/0130280), el promotor del gen de la fosfoglicerato mutasa *GPM* (WO 2006/0019297), el promotor del gen *YAT1* del gen del transportador de amonio (US 2006/0094102 A1), el promotor del gen *GPAT* del gen de la glicerol-3-fosfato O-aciltransferasa (US 2006/0057690 A1), el promotor del gen *TEF* (Muller *et al.*, Yeast, 14: 1267-1283, 1998; US 2001/6265185), el promotor híbrido *hp4d* (WO 96/41889) o también los promotores híbridos *XPR2* descritos en Mazdak *et al.* (J Mol Microbiol Biotechnol., 2(2):207-16, 2000).

10 Tales secuencias terminadoras son también conocidas por el experto en la materia y se puede citar a título de ejemplo de secuencias terminadoras que se pueden utilizar en el procedimiento según la invención, la secuencia terminadora del gen *PGK1* y la secuencia terminadora del gen *LIP2* descritas en la solicitud PCT WO 01 /83773.

15 La sobreexpresión de *GPD1* se puede obtener sustituyendo las secuencias que controlan la expresión de *GPD1* por unas secuencias reguladoras que permiten una expresión más fuerte, tales como las descritas anteriormente. El experto en la materia puede así sustituir la copia del gen *GPD1* en el genoma, así como sus secuencias reguladoras propias, por transformación de la cepa mutante de levadura por un polinucleótido lineal que comprende la fase abierta de lectura de *GPD1* bajo el control de secuencias reguladoras, tales como se han descrito anteriormente. Ventajosamente, dicho polinucleótido está enmarcado por unas secuencias que son homólogas de secuencias situadas de cada lado del gen *GPD1* cromosómico. En la medida en la que este evento de recombinación es raro, se insertan unos marcadores de selección entre las secuencias que aseguran la recombinación con el fin de permitir, después de la transformación, aislar las células en las que se ha producido la integración del fragmento mediante la puesta en evidencia de los marcadores correspondientes.

20 Ventajosamente, la sobreexpresión de *GPD1* se obtiene por la introducción en la capa de levadura de la invención de copias supernumerarias del gen *GPD1* bajo el control de secuencias reguladoras tales como las descritas anteriormente. Dichas copias suplementarias de *GPD1* pueden ser transportadas por un vector episomal, es decir capaz de replicarse en la levadura.

25 Preferentemente, son transportadas por un vector integrativo, es decir que se integran en un sitio dado en el genoma de la levadura (Mazdak *et al.*, J Biotechnol., 109(1-2): 63-81, 2004). En este caso, el polinucleótido que comprende el gen *GPD1* bajo el control de las regiones reguladoras está integrado por integración determinada.

30 La integración determinada de un gen en el genoma de una levadura es una técnica de biología molecular utilizada frecuentemente. En esta técnica, se clona un fragmento de ADN en un vector integrativo, introducido en la célula a transformar, fragmento de ADN que se integra entonces por recombinación homóloga en una región determinada del genoma receptor (Orr-Weaver *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78: 6354-6358, 1981). Tales procedimientos de transformación son bien conocidos por el experto en la materia y se describen, en particular, en Ito *et al.* (J. Bacteriol., 153: 163-168, 1983) en Klebe *et al.* (Gene, 25: 333-341, 1983) y en Gysler *et al.* (Biotechn. Techn., 4: 285-290, 1990). En la medida en la que este evento de recombinación es raro, se insertan unos marcadores de selección entre las secuencias que aseguran la recombinación con el fin de permitir, después de la transformación, aislar las células en las que se ha producido la integración del fragmento mediante la puesta en evidencia de los marcadores correspondientes.

35 Pueden también ser transportadas por unos fragmentos de PCR cuyos extremos presentan la homología con un locus dado de la levadura, permitiendo así la integración de dichas copias en el genoma de la levadura por recombinación homóloga.

40 Cualquier método de transferencia conocida en la técnica anterior puede ser utilizado para introducir el casete de invalidación 1 en la cepa de levadura. Preferentemente, se podrá utilizar el método con acetato de litio y con polietilenglicol (Gaillardin *et al.*, Curr. Genet., 11: 369-375, 1987; Le Dall *et al.*, Curr Genet, 26(1): 38-44, 1994).

45 Es posible utilizar así cualquier método de selección conocido de la técnica anterior compatible con el gen (o los genes) marcadores utilizados, siendo cualquier cepa que expresa el gen marcador seleccionado potencialmente una cepa de levadura defectiva en gen *GUT2*, *URA3* o *LEU2*.

50 Los marcadores de selección que permiten la complementación de una auxotrofia, también comúnmente denominados marcadores de auxotrofia, son bien conocidos por el experto en la materia.

55 El marcador de selección *URA3* es bien conocido por el experto en la materia. Más específicamente, una cepa de *Y. lipolytica* cuyo gen *URA3* (dicha secuencia es también accesible por el número de acceso *YAL10E26719g* en la dirección «<http://cbi.labri.fr/Genolevures/index.php#>»), que codifica para la orotidina-5'-fosfato descarboxilasa, está inactivado (por ejemplo por delección), no será capaz de crecer en un medio no suplementado con uracilo. La integración del marcador de selección *URA3* en esta cepa de *Y. lipolytica* permitirá entonces restaurar el crecimiento de esta cepa en un medio desprovisto de uracilo.

60 El marcador de selección *LEU2* descrito en particular en la patente US n° 4.937.189 es también bien conocido por el

experto en la materia. Más específicamente, una cepa de *Y. lipolytica* cuyo gen *LEU2* (*YALI0E26719g*), que codifica la  $\beta$ -isopropilmalato deshidrogenasa, está inactivado (por ejemplo por delección), no será capaz de crecer en un medio no suplementado con leucina. Como anteriormente, la integración del marcador de selección *LEU2* en esta cepa de *Y. lipolytica* permitirá entonces restaurar el crecimiento de esta cepa en un medio no suplementado con leucina.

El marcador de selección *ADE2* es también bien conocido por el experto en la materia en el campo de la transformación de la levadura. Una cepa de *Yarrowia* cuyo gen *ADE2* (*YALI0B23188g*), que codifica para la fosforibosilaminoimidazol carboxilasa, está inactivado (por ejemplo por delección), no será capaz de crecer en un medio no suplementado con adenina. De nuevo, la integración del marcador de selección *ADE2* en esta cepa de *Y. lipolytica* permitirá entonces restaurar el crecimiento de esta cepa en un medio no suplementado con adenina.

Se describe también la utilización de una cepa de levadura mutante, particularmente de levadura oleaginoso, en particular de *Y. lipolytica*, para la síntesis de lípidos, particularmente unos ácidos grasos libres y unos triacilglicerol. En un aspecto más particularmente preferido, una cepa de levadura, más particularmente de levadura oleaginoso, en particular de *Y. lipolytica*, mutante, deficiente para la beta-oxidación y que sobreexpresa *GPD1*, tal como se ha descrito anteriormente, se utiliza para la síntesis de ácidos grasos libres y de triacilglicerol.

La presente invención tiene también por objeto un procedimiento de síntesis de lípido en el que:

- en una primera etapa, se cultiva una cepa de levadura según la invención en un medio apropiado, y
- en una segunda etapa, se recogen los lípidos producidos por el cultivo de la etapa 1.

Además de las disposiciones anteriores, la presente invención comprende también otras características y ventajas que se desprenderán de los ejemplos y de las figuras siguientes, y que deben ser consideradas como ilustrativas de la invención sin limitar su alcance.

#### Leyenda de las figuras

Figura 1. Esquema de las diferentes vías de síntesis de los ácidos grasos, almacenamiento y degradación de los lípidos neutros y su relación con los ciclos del glioxilato y del TCA.

Las flechas en línea discontinua indican unas reacciones enzimáticas hipotéticas. Las flechas con guion largo representan unas reacciones simplificadas. Las proteínas codificadas por los genes entre paréntesis se han mostrado como asociadas a los cuerpos lipídicos (LB) en *Y. lipolytica*. DAG, diacilglicerol; DHA, dihidroxiacetona; DHAP, dihidroxiacetona fosfato; FFA, free fatty acid; GAD3P, gliceraldehídos-3-fosfato; Gly-3P, glicerol-3-fosfato; LPA, ácido lisofosfatídico; MAG, monoacilglicerol, PA, ácido fosfatídico; PL, fosfolípido; SE, éster esterilico; TAG, triacilglicerol, TCA ciclo, ciclo ácido tricarbóxico.

Figura 2. Análisis de la expresión de los genes implicados en la homeostasis de los triacilglicerol en diferentes cepas de *Y. lipolytica*.

La expresión de los diferentes genes se ha medido por qRT-PCR utilizando unos cebadores específicos de cada uno de los genes y se ha relacionado con la cantidad de transcritos del gen *ACT1* que codifica para la actina (*YALI0D08272g*). Estos resultados corresponden a la media  $\pm$  desviación estándar que proviene de tres experimentos independientes.

Figura 3. Acumulación de los lípidos en unas cepas diferentes de *Y. lipolytica*

Las levaduras se cultivaron durante 24h en YNBD2 (A) o en YNBD0.5O3 (B). Las barras negras representan las cepas que sobreexpresan *GPD1*, las barras blancas representan las cepas parentales. La extracción de los ácidos grasos se ha reproducido a partir de tres muestras independientes.

Figura 4. Crecimiento de diferentes cepas en medio YNBD0.5O3.

El crecimiento de las cepas WT y mutantes listadas en la Tabla 1 se ha seguido en función del tiempo. Estos resultados corresponden a la media  $\pm$  desviación estándar que proviene de tres experimentos independientes.

Figura 5. Fenotipos de LB en diferentes cepas de *Y. lipolytica*.

Se muestran las morfologías de LB de las cepas WT,  $\Delta gut2$ ,  $\Delta pox1-6$ ,  $\Delta gut2\Delta pox1-6$ , WT *GPD1*<sup>+</sup>,  $\Delta gut2$  *GPD1*<sup>+</sup>,  $\Delta pox1-6$  *GPD1*<sup>+</sup> y  $\Delta gut2\Delta pox1-6$  *GPD1*<sup>+</sup>. Las imágenes en microscopía óptica se presentan en los paneles de la izquierda y las imágenes correspondientes de microscopía en fluorescencia se presentan en la derecha. La fluorescencia se ha obtenido después de la coloración con el colorante neutro verde LipidTox™. Las cepas se han cultivado durante 24h en un medio YNBD0.5O3.

Figura 6. Contenido en triacilgliceroles y en ácidos grasos libres como fracciones de los lípidos totales.

Este gráfico representa la acumulación total de lípidos después de 24h de crecimiento en medio YNBD0.5O3, como porcentaje de la masa seca de las células. Los lípidos se han fraccionado en triacilgliceroles y ácidos grasos libres por extracción en fase sólida y se ha efectuado la cuantificación por cromatografía en fase gaseosa. La extracción de los ácidos grasos se ha reproducido a partir de dos muestras independientes; se muestra un resultado representativo de los dos experimentos.

Figura 7. A. Secuencia del gen *GPD1*<sup>+</sup>; B Secuencia del polipéptido Gpd1.

## Ejemplos

### Material y métodos

#### *Cepa de levadura, condiciones de crecimiento y de cultivo*

Las cepas de *Y. lipolytica* utilizadas en este estudio derivan de la cepa salvaje (wild-type; WT) de *Y. lipolytica* W29 (ATCC20460) (Tabla 3). La cepa auxotrófica Po1d (Leu<sup>-</sup> Ura<sup>-</sup>) se ha descrito por Barth y Gaillardin (1996. *Yarrowia lipolytica*, p. 313-388. En K. Wolf, K. D. Breunig, y G. Barth (ed.), *Nonconventional yeasts in biotechnology*, vol. 1. Springer-Verlag, Berlin, Alemania.). Se ha descrito anteriormente la cepa auxotrófica MTY94, en la que los seis genes *POX* que codifican las acil-CoA oxidasas (Aox) se han inactivado (Beopoulos *et al.*, *Appl Environ Microbiol.*, 74(24): 7779-7789, 2008). La cepa auxotrófica JMY1346, en la que el gen *GUT2*, que codifica la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, se ha inactivado, deriva de la cepa JMY1202 (WO 2010/004141; Beopoulos *et al.*, *Appl Environ Microbiol.*, 74(24): 7779-7789, 2008). La cepa auxotrófica JMY1367, en la que los seis genes *POX* que codifican acil-CoA oxidasas (Aox) y el gen *GUT2*, que codifica la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, se han inactivado, deriva de la cepa JMY1351 (Beopoulos *et al.*, *Appl Environ Microbiol.*, 74(24): 7779-7789, 2008). Para obtener JMY1346 y JMY1367, el marcador *URA3* se ha escindido de JMY1202 y de JMY1351, respectivamente, tal como se ha descrito anteriormente (Beopoulos *et al.*, *Appl Environ Microbiol.*, 74(24): 7779-7789, 2008). Las cepas utilizadas en este estudio se enumeran en la Tabla 3.

Los medios y las condiciones de cultivo para *Escherichia coli* se describen en Sambrook *et al.* (1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY), y los para *Y. lipolytica* se describen en Barth y Gaillardin (1996. *Yarrowia lipolytica*, p. 313-388. En K. Wolf, K. D. Breunig, y G. Barth (ed.), *Nonconventional yeasts in biotechnology*, vol. 1. Springer-Verlag, Berlin, Alemania). El medio rico (YPD) y el medio mínimo con glucosa (YNB) se han preparado como se ha descrito anteriormente (Mlickova' *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 3918-3924, 2004).

El medio mínimo YNB contiene un 0,17% de YNB<sub>w</sub> (medio YNB sin aminoácidos y sulfato de amonio; Difco, Paris, Francia), un 0,5% de NH<sub>4</sub>Cl, un 0,1% de extracto de levadura (Bacto-DB) y 50 mM de tampón fosfato a pH 6,8. Este medio puede ser suplementado con un 0,2% de casamino-ácidos (Difco, Paris, Francia) y/o 0,1 g/l de uracilo.

Los medios suplementados en fuente de carbono son:

- el medio YNBD (glucosa al 2%, Merck, Fontenay-sous-Bois Cedex, Francia);
- el medio YNBG (glicerol al 2%, Merck);
- el medio YNBDO (medio suplementado con el 3% en ácido oleico de Merck puro al 60%);
- el medio YNB<sub>Ou.p.</sub> (medio suplementado con el 3% en ácido oleico de Flucka puro al 98%);
- el medio YNBO (YNBD0.5O3) utilizado para seguir la acumulación óptima y la removilización de los ácidos grasos es un medio YNB suplementado con el 0,5% de glucosa y el 3% de ácido oleico;
- el medio YP<sub>2</sub>D<sub>4</sub>O<sub>3</sub> utilizado para optimizar la acumulación de lípidos contiene el extracto de levadura (1%), proteosa peptona (2%), glucosa (4%) y ácido oleico (3%). En caso de necesidad, se añaden uracilo (0,1 g/l) y leucina (0,2 g/l).

Para los medios sólidos, se ha añadido un 1,5% de agar.

El ácido oleico está emulsionado por sonicación, en presencia de un 0,02% de Tween 40 (Mlickova' *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 70: 3918-3924, 2004).

Por regla general, los cultivos se han realizado de la siguiente manera: a partir de una caja YPD, se inocula un

primer pre-cultivo en el medio YPD (15 ml en unos Erlenmeyers de 50 ml a 170 rpm, a 28°C durante 6h). Las células se utilizaron para inocular un pre-cultivo en medio YNBD (50 ml en un Erlenmeyer de 500 ml a 170 rpm, a 28°C, durante una noche).

- 5 Para el cultivo, se recogieron unas células en crecimiento exponencial por centrifugación al día siguiente del precultivo, se lavaron y resuspendieron en un medio YNB fresco a una densidad óptica a 600 nm de 0,5.

10 Para determinar el crecimiento de las células, los cultivos se centrifugaron a 3000 g durante 5 min, y el residuo de las células se lavó dos veces con unos volúmenes iguales de solución SB (9 g/L de NaCl - 0,5% BSA). La biomasa producida se determinó midiendo la densidad óptica a 600 nm y estimando el peso seco de las células después de la liofilización.

#### *Técnicas generales de genética*

- 15 Las técnicas generales de genética molecular se utilizaron como se describe en Sambrook *et al.* (1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Las enzimas de restricción utilizadas provienen de Eurogentec SA (Lieja, Bélgica).

20 La transformación de las células de levadura se ha realizado según el método con acetato de litio descrito en Le Dall *et al.* (Curr Genet, 26(1): 38-44, 1994). El ADN genómico de levadura (salvaje o transformada) se ha preparado tal como se describe por Querol *et al.* (Appl. Environ. Microbiol., 58(9): 2948-2953, 1992). Las amplificaciones por PCR se han realizado en un termociclador Eppendorf 2720, o bien con ADN polimerasa Taq (Promega, Madison, WI, USA), o bien con ADN polimerasa *Pfu* (Stratagene, La Jolla, California). El gen *GPD1* se ha amplificado con los cebadores descritos en la tabla 4. Los fragmentos de PCR se purificaron mediante el kit de purificación QIAGEN (Qiagen, Hilden, Alemania) y los fragmentos de ADN se recuperaron a partir de geles de agarosa utilizando un kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen, Hilden, Alemania). El conjunto de programas Staden (Dear. y Staden, Nucleic Acid Res., 19: 3907-3911, 1991) se utilizó para el análisis de las secuencias.

#### *Preparación de los ARN y cuantificación de los transcritos*

30 Las muestras biológicas se han congelado en nitrógeno líquido y conservado a -80°C. Los ARN se han extraído con el kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, Francia) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para los experimentos de Q-PCR, se ha tratado el ARN total de cada muestra con ADNasa I (Ambion). La ausencia de ADN genómico en las preparaciones de ARN se ha verificado por PCR utilizando los ARN totales tratados con ADNasa I como matriz y *Taq* (Promega, Madison, WI) como enzima. La calidad de los ARN totales se ha controlado con el Bioanalyzer Agilent 2100, los reactivos del kit Agilent RNA 6000 Nano y unos chips de ARN. Los ARN totales tratados con ADNasa I (1 µg) se han tratado con la transcriptasa inversa Thermoscript RT (Invitrogen, Carlsbad, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los experimentos de Q-PCR se han realizado con la ayuda del LightCycler 1.5 (Roche, Meylan, Francia) con el kit LightCycler Fast Start DNA Master Sybr Green (Roche, Meylan, Francia), siguiendo las instrucciones del fabricante. La expresión de cada gen se ha cuantificado con el método de 2ΔCT, calibrando con *ACT1* que codifica la actina. La reacción de amplificación era la siguiente: 95°C 8 min, 95°C 10 s, 60°C 6 s, y 72°C 10 s (45 ciclos), 95°C 15 s, 60°C 15 s, y 95°C 15 s, 40°C 5 min. La medición de la expresión de cada gen por Q-PCR se ha reproducido sobre tres muestras independientes. Los cebadores utilizados para la Q-PCR se indican en la Tabla 4.

#### *Microscopía por fluorescencia*

50 Para la visualización de los cuerpos lipídicos (LB), el fluorocromo LipidTOX™ Green (2,5 mg/ml en etanol; Invitrogen) se ha añadido a una suspensión de células ( $A_{600} = 5$ ) y se ha incubado durante 10 min a temperatura ambiente. La microscopía se ha realizado con un microscopio de fluorescencia, AXIO Imager M1 (Zeiss, Le Pecq, Francia) con un objetivo de inmersión 100X. El programa AxioVision Rel. 4.6 se ha utilizado para la adquisición de las imágenes.

#### *Determinación de los lípidos*

55 Los lípidos de una cantidad de células superior a 5 mg se han extraído o bien por el procedimiento de Folch *et al.* (J Biol Chem, 226(1): 497-509, 1957) para el análisis TLC, o directamente convertido en sus ésteres metílicos utilizando unas células liofilizadas según Browse *et al.*, (Anal Biochem, 152(1): 141-145, 1986) para el análisis por cromatografía en fase gaseosa. La transmetilación completa se ha verificado mediante un método con BF<sub>3</sub> en el metanol (Athenstaedt *et al.*, J Bacteriol, 181(20): 6441-6448, 1999) y sobre placas TLC.

60 El análisis por cromatografía en fase gaseosa de los ésteres metílicos de ácidos grasos se ha realizado con la ayuda de un Varian 3900 equipado de un detector de ionización de llama y una columna Varian FactorFour vf-23ms, (3 pA a 260°C [30 m, 0,25, 0,25 µm]).

65 Los ácidos grasos libres se han identificado por comparación con unos ésteres metílicos de ácidos grasos

estandarizados (Fatty Acid Methyl Ester, FAME, Cayman, Supelco, Sigma (France)) y cuantificados mediante el método del patrón interno añadiendo 50 µg de C17:0 commercial (Sigma).

*Análisis de los cuerpos lipídicos*

5 El análisis de los cuerpos lipídicos se ha realizado observando un cultivo celular en crecimiento con microscopio tal como se ha descrito anteriormente. Se han utilizado unos objetivos de contraste de fase diferencial (Nomarski) para obtener las imágenes transmitidas.

10 *Análisis de las clases de lípidos*

15 Los lípidos totales se han fraccionado en triacilgliceroles y ácidos grasos libres para la cuantificación de los lípidos utilizando una columna Isolute SPE Aminopropilo (IST, Francia, Paris, Francia) siguiendo la enseñanza de Laffargue *et al.* (Plant Physiol Biochem, 45(3-4): 250-257, 2007). El acondicionamiento de la columna se ha realizado 3 veces con 3 ml de hexano normal a caudal normal. Un ml del conjunto de los lípidos extraídos por el método de Folch *et al.* (J Biol Chem, 226(1): 497-509, 1957) en CHCl<sub>3</sub> se ha cargado en la columna y se ha recogido la fracción de los lípidos neutros.

20 La elución total de los lípidos neutros se ha realizado por lavado de la columna 3 veces con 3 ml de CHCl<sub>3</sub>/isopropanol (2/1). La fracción de los ácidos grasos libres se ha recogido lavando la columna 3 veces con 3 ml de ET<sub>2</sub>O/ácido acético al 2% a un caudal normal. El disolvente de las fracciones se ha evaporado bajo flujo de nitrógeno directo y se ha seguido la transmetilación para el análisis por cromatografía en fase gaseosa (Laffargue *et al.*, Plant Physiol Biochem, 45(3-4): 250-257, 2007).

25 Se han utilizado unas placas TLC para las extracciones de verificación. La eficacia del procedimiento se ha verificado también por comparación de los perfiles de cromatografía en fase gaseosa de las muestras fraccionadas o no.

*Separación de los lípidos por TLC*

30 Se han utilizado unas placas TLC (sílice G60, 20\*20 cm, grosor 0,25 mm) (Merck, Alemania). Se han separado las diferentes clases de lípidos utilizando un sistema de disolvente de doble cubierta: Sistema A (semi-placa de migración): éter de petróleo/éter etílico/ácido acético: 20/20/0,8 (v/v/v); Sistema B (toda la placa de migración): Éter de petróleo/Et<sub>2</sub>O 49/1 (v/v). Se ha pulverizado una solución al 5% de ácido fosfomolibdico sobre las placas y se han revelado las bandas de lípidos después de 10 minutos a 105°C.

*Espectroscopía por RMN*

40 Se han preparado unos extractos PCA (ácido perclórico) a partir de 1 g en peso seco de *Y. lipolytica* siguiendo el método descrito en Auber *et al.* (J. Cell Biol., 133: 1251-1263, 1996). Los valores son expresados en mg g<sup>-1</sup> de peso seco de levadura. Los espectros se han registrado en un espectrómetro Bruker RMN (AMX 400, wide bore; Bruker, Billerica, MA) equipado con una sonda multinuclear de 10 mm o de 25 mm ajustada a 161,9 o 100,6 MHz para los análisis de <sup>31</sup>P- y <sup>13</sup>C. La resonancia del deuterio <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O se ha utilizado como señal de referencia. Para las mediciones, se han realizado las adquisiciones de RMN<sup>13</sup>C y de RMN<sup>31</sup>P tal como se ha descrito anteriormente (Dulermo *et al.*, New Phytol, 183:1149-1162, 2009). Los disolventes utilizados para la RMN provienen de Sigma-Aldrich y de Lemman (Archamps, Francia).

Resultados

50 *Construcción de cepas*

55 El gen *GPD1* de *Y. lipolytica* se ha sobreexpresado en unas cepas WT, *Δgut2*, *Δpox1-6* y *Δgut2Δpox1-6* de *Y. lipolytica*. Estas cepas se han transformado con un casete de expresión que contiene *GPD1* bajo el control del promotor constitutivo *TEF* (Muller *et al.*, Yeast, 14:1267-1283, 1998). Los transformantes que contienen el casete de expresión se han identificado por PCR (datos no mostrados). Se ha observado por RT-PCR cuantitativa que el gen *GPD1* estaba expresado en los mismos niveles en los diferentes transformantes (Fig. 2). En las cepas *GPD1<sup>+</sup>*, la expresión de *GPD1* aumenta en un factor de 5 a 6 con respecto al salvaje. Se han obtenido unos resultados idénticos analizando dos transformantes de cada cepa *GPD1<sup>+</sup>*.

60 *La sobreexpresión de GPD1 conlleva un aumento de la cantidad de lípidos celulares*

65 En primer lugar, se ha estudiado la capacidad de las diferentes cepas para sintetizar unos lípidos de nuevo después de 24h de cultivo en YNBD2: a 24 h, la sobreexpresión de *GPD1* no tiene ningún efecto en el salvaje y en *Δgut2*, mientras que la cantidad de lípidos celulares aumenta del 34% y del 25% en las cepas *Δpox1-6 GPD1<sup>+</sup>* y *Δgut2Δpox1-6 GPD<sup>+</sup>*, respectivamente, en comparación con las cepas parentales isogénicas (Fig. 3A).

En un segundo tiempo, se ha analizado la capacidad de acumulación de los lípidos de las diferentes cepas. Para ello, se han cultivado las cepas en YNBD0.5O3. Aunque todos los transformantes presentaban el mismo crecimiento que el salvaje en YNBD2 (datos no mostrados), éste no es el caso en YNBD0.5O3. En este medio particular, el crecimiento de  $\Delta gut2\Delta pox1-6 GPD1^+$ , y, en una menor medida, de  $\Delta pox1-6 GPD1^+$  se ve dramáticamente afectada entre 24 y 48h de cultivo, aunque éste no es el caso para las otras cepas. En particular, la absorción de estos dos cultivos cae bruscamente entre 24 y 48h, lo que indica una lisis celular (Fig. 4). La muerte de estas células se debe probablemente a una acumulación de lípidos demasiado elevada. Por esta razón, se ha analizado la acumulación de lípidos en los diferentes transformantes después de 24h de cultivo en YNBD0.5O3 (Fig. 3B). Al igual que para la síntesis de nuevo de lípidos en YNBD2, la acumulación de lípidos aumenta únicamente en las cepas  $\Delta pox1-6 GPD1^+$  y  $\Delta gut2\Delta pox1-6 GPD1^+$  del 70% y del 47% con respecto a sus cepas parentales isogénicas, respectivamente. La acumulación de los lípidos representa más del 65-75% del peso seco de estas cepas, es decir 5 veces la cantidad de lípidos en la cepa salvaje a 24h. La sobreexpresión de *GPD1* no tiene ningún efecto sobre el perfil en ácidos grasos de los transformantes (Tabla 5).

#### 15 *Análisis microscópico de cepas que sobreexpresan GPD1*

La sobreexpresión de *GPD1* conlleva un aumento del contenido lipídico en las cepas  $\Delta pox1-6$  y  $\Delta gut2\Delta pox1-6$ . En *S. cerevisiae*, la mayoría de los lípidos almacenados son unos lípidos neutros, es decir unos triacilgliceroles y unos ésteres de esteroides. En *Y. lipolytica*, los lípidos neutros se almacenan en un compartimento especializado, el cuerpo lipídico (LB) (Czabany *et al.*, Biochim. Biophys. Acta, 1771: 299-309, 2007). Con el fin de estimar el efecto de la sobreexpresión de *GPD1* sobre los cuerpos lipídicos de *Y. lipolytica*, las células de las diferentes cepas se analizaron en microscopio después de 24h de crecimiento sobre YNBD0.5O3. Las células  $\Delta gut2$ ,  $\Delta gut2 GPD1^+$ ,  $\Delta pox1-6$ ,  $\Delta pox1-6 GPD1^+$ ,  $\Delta gut2\Delta pox1-6$  y  $\Delta gut2\Delta pox1-6 GPD1^+$  mostraban unos cuerpos lipídicos muy importantes (Fig. 5). No se ha podido detectar ninguna diferencia entre WT y WT  $GPD1^+$ , así como entre  $\Delta gut2$  y  $\Delta gut2 GPD1^+$ . Por el contrario, las cepas  $\Delta pox1-6 GPD1^+$  y  $\Delta gut2\Delta pox1-6 GPD1^+$  presentaban los mayores cuerpos lipídicos y los más numerosos. La sobreexpresión de *GPD1* no solamente conlleva un aumento de la cantidad de lípidos celulares, sino que parece también afectar al número y al tamaño de los cuerpos lipídicos en *Y. lipolytica*.

#### 30 *La sobreexpresión de GPD1 conlleva un aumento de la fracción de los triacilgliceroles*

Con el fin de cuantificar la fracción de los triacilgliceroles en las cepas en  $GPD1^+$ , los lípidos neutros y los ácidos grasos libres se han fraccionado con una columna SPE Aminopropilo. Las fracciones de triacilgliceroles y de ácidos grasos libres se analizaron después por cromatografía en fase gaseosa.

35 La cantidad de triacilgliceroles se analizó en todas las cepas después de 24h de cultivo en YNBD0.5O3 (Fig. 6).

La delección de *GUT2* y/o la sobreexpresión de *GPD1* conducen a un aumento de la fracción de los triacilgliceroles. El nivel de triacilgliceroles incrementa en un factor 1,3, 2,4 y 3,2 en las cepas WT  $GPD1^+$ ,  $\Delta gut2$  y  $\Delta gut2 GPD1^+$ , con respecto a la cepa salvaje, respectivamente. La inactivación de los genes *POX1-6* tiene un pequeño efecto sobre el nivel de triacilgliceroles, con un aumento de un factor 1,7 en comparación con la cepa salvaje. Por el contrario, la asociación de las mutaciones *POX1-6* con la inactivación de *GUT2* y/o la sobreexpresión de *GPD1* tiene un efecto mayor en la cantidad de triacilgliceroles, con unos niveles de triacilgliceroles en las cepas  $\Delta gut2\Delta pox1-6$ ,  $\Delta pox1-6 GPD1^+$  y  $\Delta gut2\Delta pox1-6 GPD1^+$  que alcanzan 4, 6 y 10 veces respectivamente el nivel observado en la cepa salvaje. En la cepa  $\Delta gut2\Delta pox1-6 GPD1^+$  la fracción de los triacilgliceroles corresponde a más del 50% del peso seco.

#### 45 *Análisis metabólicos de las diferentes cepas por RMN*

Los resultados obtenidos muestran claramente que la sobreexpresión de *GPD1* afecta dramáticamente a la síntesis de los triacilgliceroles. Esto podría explicarse por un aumento de la concentración del G3P. Con el fin de verificar si la inactivación de *GUT2* o la sobreexpresión de *GPD1* afecta a la síntesis de G3P, las cepas parentales y  $GPD1^+$  se cultivaron sobre YNBD0.5O3, y los metabolitos se analizaron por RMN. Los análisis de los espectros de  $^{31}P$  indican que la concentración en G3P incrementa de 1,5 a 5,6 veces en las cepas en las que *GUT2* está inactivado o en las cepas que sobreexpresan *GPD1*, con respecto a la cepa salvaje (Tabla 6). Cuando *GUT2* es funcional, la sobreexpresión de *GPD1* tiene pocos efectos sobre el nivel de G3P. Por ejemplo, la concentración de G3P incrementa un 50% sólo en las cepas WT  $GPD1^+$  y  $\Delta pox1-6 GPD1^+$  en comparación con las cepas parentales. El nivel de G3P es ligeramente más elevado en la cepa  $\Delta pox1-6$  comparada con la cepa salvaje. La concentración de G3P incrementa en un factor tres en las cepas  $\Delta gut2$  y  $\Delta gut2\Delta pox1-6$  con respecto a la cepa salvaje. La concentración máxima de G3P se obtiene en las cepas  $\Delta gut2 GPD1^+$ . Además, la concentración G3P en la cepa  $\Delta pox1-6 GPD1^+$  y de manera sorprendente en la cepa  $\Delta gut2\Delta pox1-6 GPD1^+$  es solamente de dos veces la concentración de la salvaje. Parece por lo tanto que la delección de *GUT2* o la sobreexpresión de *GPD1* tienen unas consecuencias diferentes en la síntesis de G3P.

G3P es un metabolito intermedio de la síntesis del glicerol. Mientras que la concentración de G3P aumenta en las cepas  $\Delta gut2$  y  $GPD1^+$ , la concentración de glicerol disminuye en estas cepas y aún más dramáticamente en las cepas  $\Delta gut2 GPD1^+$ ,  $\Delta pox1-6 GPD1^+$ ,  $\Delta gut2\Delta pox1-6$  y  $\Delta gut2\Delta pox1-6 GPD1^+$ .

En  $\Delta gut2$   $GPD1^+$ , la cepa que acumula los niveles más altos de G3P, se ha observado una duplicación y una triplicación de las concentraciones respectivas de glicerol fosforilcolina (GPC) y de glicerol fosforiletanolamina (GPE). La RMN no es suficientemente sensible, por lo tanto no ha sido posible detectar más de tres intermedios de ciclos del glioxilato/TCA (malato, citrato y succinato); se ha observado una fuerte disminución para cada uno de estos tres compuestos en las cepas en las que los genes  $POX$  en los que el gen  $GUT2$  estaba inactivado. Además, la sobreexpresión de  $GPD1^+$  en estas cepas acentúa la desaparición de estos compuestos.

*Modificación de la expresión de los genes implicados en el metabolismo de los triacilglicéridos*

Se ha analizado por RT-PCR cuantitativa la expresión de  $GUT2$  y de los genes implicados en la síntesis de los triacilglicéridos, tales como  $SCT1$ ,  $DGA1$ ,  $LRO1$ ,  $ARE1$  y  $ARE2$ , que codifican unas aciltransferasas (Beopoulos *et al.*, Prog. Lipid Res, 48: 375-387, 2009; Fig. 1). La sobreexpresión de  $GPD1$  no tiene ningún efecto sobre la expresión de  $GUT2$ . Asimismo, la delección de  $GUT2$  no tiene ningún efecto sobre la expresión de  $GPD1$ . Por el contrario, un cambio en la expresión de los genes implicados en el metabolismo de G3P tiene un efecto marcado sobre  $DGA1$ . En las cepas  $\Delta pox1-6$   $GPD1^+$  y  $\Delta gut2\Delta pox1-6$   $GPD1^+$ , la expresión de  $DGA1$  aumenta de 15 y 10 veces, respectivamente, con respecto a las cepas parentales. De manera sorprendente, la delección de los genes  $POX$  conlleva un fuerte aumento de la expresión de  $SCT1$  mientras que la delección de  $GUT2$  tiene un efecto antagonista y la sobreexpresión de  $GPD1$  no tiene ningún efecto. La expresión de  $ARE1$  disminuye en todas las cepas mutantes, mientras que la expresión de  $ARE2$  disminuye en la cepa  $\Delta gut2$  sólo. La expresión de  $LRO1$ , que está débilmente expresada, no está modificada en las diferentes cepas.

La acumulación de los triacilglicéridos no depende sólo de las actividades de síntesis. De hecho, los procesos de degradación deben tener un papel importante en la homeostasia de los triacilglicéridos. La primera etapa del catabolismo de los triacilglicéridos está catalizada por unas lipasas de triacilglicéridos intracelulares (Czabany *et al.*, Biochim. Biophys. Acta, 1771: 299-309, 2007; Fig. 1). La levadura *Y. lipolytica* posee unas lipasas de triacilglicéridos intracelulares homólogas de las proteínas Tgl3 y Tgl4 de *S. cerevisiae*, pero ninguna homóloga de Tgl5 (Beopoulos *et al.*, Appl Environ Microbiol, 74: 7779-7789, 2008). La expresión de los genes  $TGL$  ( $TGL3$  y  $TGL4$ ) se ha analizado por RT-PCR cuantitativa. Estos dos genes tienen unos perfiles de expresión similares.  $TGL3$  y  $TGL4$  están fuertemente expresados en las cepas en las que los genes  $POX$  están inactivados. Sin embargo, la delección de  $GUT2$  o la sobreexpresión de  $GPD1$  tiene un efecto negativo sobre su expresión. Por ejemplo, la expresión de  $TGL3$  incrementa en 20 veces en la cepa  $\Delta pox1-6$  y sólo de 7 veces en la cepa  $\Delta pox1-6 \Delta gut2$  con respecto a la cepa salvaje. En su conjunto, estos resultados muestran claramente que la modificación del metabolismo del G3P o de los genes  $POX$  afectan a la expresión de los genes implicados en la homeostasia de los triacilglicéridos.

Tabla 1: Genes implicados en el metabolismo de los ácidos grasos en las levaduras, particularmente en *Y. lipolytica*. Las secuencias son accesibles por sus nombres o números de acceso en la dirección «<http://cbi.labri.fr/Genolevures/index.php#>»

Gen	Nombre	n° EC	Función
$GUT1$	YAL10F00484g	EC 2.7.1.30	Glicerol quinasa
$GPD1$	YAL10B02948g	EC 1.1.1.18	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (NAD(+))
$GUT2$	YAL10813970g	EC 1.1.99.5	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa
$SCT1$	YAL10C00209g	EC 2.3.1.15	Glicerol-3-fosfato aciltransferasa
$SLC1$	YAL10E18964g	EC 2.3.1.51	1-acil-sn-glicerol-3-fosfato aciltransferasa
$DGA1$	YAL10E32769g	EC 2.3.1.20	Diacilglicerol aciltransferasa
$LRO1$	YAL10E16797g	EC 2.3.1.158	Fosfolípido:diacilglicerol aciltransferasa
$TGL3$	YAL10D17534g	EC 3.1.1.3	Triacilglicerol lipasa
$TGL4$	YAL10F10010g	EC 3.1.1.3	Triacilglicerol lipasa
$ARE1$	YAL10F06578g	EC 2.3.1.26	Acil-CoA:esterol aciltransferasa
$ARE2$	YAL10D07986g	EC 2.3.1.20	Diacilglicerol aciltransferasa
$TGL1$	YAL10E32035g	EC 3.1.1.13	Colesterol esterasa
$POX1$	YAL10E32835g	EC 6.2.1.3	Acil-coenzima A oxidasa
$POX2$	YAL10F10857g	EC 6.2.1.3	Acil-coenzima A oxidasa
$POX3$	YAL10D24750g	EC 6.2.1.3	Acil-coenzima A oxidasa
$POX4$	YAL10E27654g	EC 6.2.1.3	Acil-coenzima A oxidasa
$POX5$	YAL10C23859g	EC 6.2.1.3	Acil-coenzima A oxidasa
$POX6$	YAL10E06567g	EC 6.2.1.3	Acil-coenzima A oxidasa
$MFE1$	YAL10E15378g	EC 4.2.1.74	Proteína beta-oxidación multi-funcional
$POT1$	YAL1018568g	EC 2.3.1.16	Peroxisomal Oxoacil Tiolasa

Tabla 2: Genes implicados en el metabolismo de los peroxisomas en las levaduras, particularmente en *Y. lipolytica*. Las secuencias son accesibles por sus nombres o número de acceso en la dirección «<http://cbi.labri.fr/Genolevures/index.php#>»

Gen	nº de acceso <i>S. cerevisiae</i>	nº de acceso <i>Y. lipolytica</i>	Función (o fuente para 3 genes)
PEX1	YKL197c	YAL10C15356g	AAA-peroxina
PEX2	YJL210W	YAL10F01012g	Peroxina de dedo RING que actúa en el transporte de proteína a la matriz peroxisómica
PEX3	YDR329c	YAL10F22539g	Proteína de membrana peroxisómica (PMP)
PEX4	YGR133w	YAL10E04620g	Enzima de conjugación de ubiquitina peroxisómica
PEX5	YDR244w	YAL10F28457g	Receptor de señal de membrana peroxisómica
PEX6	YNL329c	YAL10C18689g	AAA-peroxina
PEX7	YDR142c	YAL10F18480g	Receptor de señal peroxisómica
PEX8	YGR077c	/	Organizador intraperoxisómico de la maquinaria de transporte peroxisómico
PEX9	/	YAL10E14729g	Proteína de membrana peroxisómica integral
PEX10	YDR265w	YAL10C01023g	Ubiquitina ligasa E3 de membrana peroxisómica
PEX11	YOL147c	YAL10C04092g	Proteína de membrana peroxisómica
PEX12	YMR026c	YAL10D26642g	peroxina de membrana peroxisómica de dedo RING de tipo C3HC4
PEX13	YLR191w	YAL10C05775g	Membrana peroxisómica integral
PEX14	YGL153w	YAL10E9405g	Peroxina de membrana peroxisómica
PEX15	YOL044w	/	Proteína de membrana peroxisómica integral de tipo II fijada a cola fosforilada
PEX16	/	YAL10E16599g	Peroxina de membrana periférica intraperoxisómica
PEX17	YNL214w	/	Peroxina de membrana peroxisómica
PEX18	YHR160c	/	Peroxina
PEX19	YDL065c	YAL10822660g	Receptor de transporte y chaperona
PEX20	/	YAL10E06831g	Peroxina
PEX21	YGR239c	/	Peroxina
PEX22	YAL055w	/	Proteína de membrana peroxisómica putativa
PEX23	PEX30 (YLR324w) PEX31 (YGR004w) PEX32 (YBR168w)	YAL10D27302g	Peroxina de membrana peroxisómica integral
PEX25	YPL112c	YAL10D05005g	Peroxina de membrana peroxisómica periférica
PEX27	YOR193w	/	Proteína de membrana peroxisómica periférica
PEX28	YHR150w	YAL10D11858g YAL10F19580g	Peroxina de membrana integral peroxisómica
PEX29	YDR479c	YAL10F19580g	Peroxina de membrana integral peroxisómica
PEX30	YLR324W	YAL10D27302g	Proteína de membrana integral peroxisómica
PEX31	YGR004W	YAL10D27302g	Proteína de membrana integral peroxisómica
PEX32	YBR168w	YAL10D27302g	Proteína de membrana integral peroxisómica

Tabla 3: Cepas de *E. coli* y de *Y. lipolytica* utilizadas.

Cepas (cepa hospedante)	Genotipo o plásmido	Fuente o referencia
<b>Cepas de <i>E. coli</i></b>		
Mach1T1	$\Delta recA1398 endA1 tonA \Phi 80\Delta lacM15 \Delta lacX74 hsdR(r_K^- m_K^+)$	Invitrogen
JME1128	JMP 62 URA3 Ex-pTEF-GPD1	El presente documento
<b>Cepas de <i>Y. lipolytica</i></b>		
W29	MATa WT	Aggelis y Sourdis, 1997
PO1d	MATa <i>ura3-302 leu2-270 xpr2-322</i>	Barth y Gaillardin, 1996
JMY1202	MATa <i>ura3-302 leu2-270 xpr2-322 <math>\Delta gut2::URA3</math></i>	Beopoulos <i>et al.</i> ,
JMY1233	MATa <i>ura3-302 xpr2-322 <math>\Delta leu2 \Delta pox1-6</math></i>	Beopoulos <i>et al.</i> ,
JMY1346	MATa <i>ura3-302 leu2-270 xpr2-322 <math>\Delta gut2</math></i>	Beopoulos <i>et al.</i> ,
JMY1351	MATa <i>ura3-302 xpr2-322 <math>\Delta leu2 \Delta pox1-6 \Delta gut2::URA3</math></i>	Beopoulos <i>et al.</i> ,
JMY1367	MATa <i>ura3-302 xpr2-322 <math>\Delta leu2 \Delta pox1-6 \Delta gut2</math></i>	Beopoulos <i>et al.</i> ,
JMY1748	MATa <i>ura3-302 leu2-270 xpr2-322 + pTEF-GPD1-URA3</i>	El presente documento
JMY1789	MATa <i>ura3-302 xpr2-322 <math>\Delta leu2 \Delta pox1-6 \Delta gut2 + pTEF-GPD1-URA3</math></i>	El presente documento
JMY1796	MATa <i>ura3-302 leu2-270 xpr2-322 <math>\Delta gut2 + pTEF-GPD1-URA3</math></i>	El presente documento
JMY1972	MATa <i>ura3-302 xpr2-322 <math>\Delta leu2 \Delta pox1-6 + pTEF-GPD1-URA3</math></i>	El presente documento

ES 2 617 337 T3

Tabla 4: Cebadores utilizados para la construcción de los vectores y la Q-PCR. Para cada par de cebador, el primero es el cebador sentido («forward»), el segundo el cebador antisentido («reverse»).

Vector	Gen	Cebadores para la construcción de vector
JME1128	<i>GPD1</i>	SEC ID N° 3 GCGGATCCCACAATGAGCGCTCTACTTCGATCGTCCC SEC ID N° 4 GCGCCTAGGCTAGTTGGCGTGGTAAAGAATCTCGGG
Genes	N° de acceso	Cebadores para análisis de Q-PCR
		SEC ID N° 5 TCCAGGCCGTCCTCTCCC
<i>ACT</i>		SEC ID N° 6 GGCCAGCCATATCGAGTCGCA
<i>ARE1</i>	YALIOF06578g	SEC ID N° 7 TCCTCAAGCGACAGTCTA SEC ID N° 8 CAGCAACAGCAGGTATCC
<i>ARE2</i>	YALIOD07986g	SEC ID N° 9 TTCTCATCTTCCAGTACGCCTA SEC ID N° 10 GGCAATAAGATTGAGACCGTT
<i>DGA1</i>	YALIOE32769g	SEC ID N° 11 TGTACCGATTCCAGCAGT SEC ID N° 12 GGTGTGGGAGATAAGGCAA
<i>GPD1</i>	YALIOB02948g	SEC ID N° 13 CGAGACTACCGTTGCTTAC SEC ID N° 14 CAACAACGTTCTTAAGGGC
<i>GUT2</i>	YALIOF00484g	SEC ID N° 15 TGTGTGGAACCTCGACTACAA SEC ID N° 16 CATCCAGAAGTAGGGAAGC
<i>LRO1</i>	YALIOE16797g	SEC ID N° 17 CTCCGCCGACTTCTTTATG SEC ID N° 18 GAAGTATCCGTCTCGGTG
<i>SCT1</i>	YALIOC00209g	SEC ID N° 19 GAGATTGTGTCCGACACT SEC ID N° 20 TTTGTCGAATACGGATCGGT
<i>TGL3</i>	YALIOD17534g	SEC ID N° 21 CAAGATTGTCTCTCCCTACG SEC ID N° 22 GTACTIONCGGATCAGGTTCCAC
<i>TGL4</i>	YALIOF10010g	SEC ID N° 23 GTTTCGACAAGGAGCCTATT SEC ID N° 24 GGTCAGATGCGGATGATAAAG

Tabla 5: Perfiles de los ácidos grasos de las cepas salvajes y mutantes. Las cepas se han cultivado en YNB con un 0,5% de glucosa y un 3% de ácido oleico (70% puro). Los valores indicados corresponden a la media de tres experimentos diferentes después de 24h de cultivo. La desviación estándar era < 10% de los valores indicados.

	PO1d	PO1d <i>GPD1+</i>	$\Delta gut2$	$\Delta gut2$ <i>GPD1+</i>	$\Delta pox1-6$	$\Delta pox1-6$ <i>GPD1+</i>	$\Delta gut2$ $\Delta pox1-6$	$\Delta gut2$ $\Delta pox1-6$ <i>GPD1+</i>
C16:0	6,0	5,1	5,0	4,9	4,0	4,1	2,6	5,3
C16:1(n-9)	1,1	0,9	13,7	14,4	0,3	0,4	0,2	0,4
C16:1 (n-7)	4,3	6,0	6,5	6,5	3,8	5,6	3,2	8,1
C18:0	0,6	0,5	0,3	0,5	0,7	0,6	0,7	0,8
C18:1(n-9)	57,5	56,9	48,1	46,1	68,1	62,8	60,1	59,7
C18:2(n-6)	24,8	21,4	22,0	22,2	14,1	18,3	16,2	15,8
Total	94,3	90,9	95,6	94,6	91,0	91,8	83,0	90,1

Tabla 6: Perfil de los metabolitos por análisis por RMN. Los metabolitos se han identificado y cuantificado en una serie de experimentos, utilizando el maleato y el metil-fosfonato como estándar interno. Se han realizado dos experimentos independientes a partir de dos cultivos y éstos han dado unos resultados similares. Se representa un resultado representativo. G3P, glicerol-3-fosfato, GPC, glicerol fosforilcolina, GPE, glicerol fosforiletanolamina.

Metabolitos <sup>a</sup>								
	PO1d	PO1d GPD1 <sup>+</sup>	$\Delta gut2$	$\Delta gut2$ GPD1 <sup>+</sup>	$\Delta pox1-$ 6	$\Delta pox1-$ 6 GPD1 <sup>+</sup>	$\Delta gut2$ $\Delta pox1-$ 6	$\Delta gut2$ $\Delta pox1-$ 6 GPD1 <sup>+</sup>
<sup>13</sup> C metabolitos (mmoles/g de masa seca)								
Glicerol	8,5	4,2	5,2	2	4,4	3	0,8	1,5
Malato	17,6	26,1	16,8	8	7,1	2,5	4	2,2
Citrato	2	1,2	1,3	0,8	0,7	0,5	0,5	0,7
Succinato	15,2	17,6	9,6	7,8	7,4	4,1	3,2	2,7
<sup>31</sup> P metabolitos (µmoles/g de masa seca)								
G3P	5	7,7	14,4	28,5	7	10,3	14,6	11,7
GPC	67	50	80	112	69	66	75	52
GPE	10	7	11,1	37,4	7,7	6,4	10,8	7,8

5

**Listado de secuencias**

<110> INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE DULERMO, THIERRY NICAUD, JEAN MARC

10 <120> OPTIMIZACIÓN DE LA SÍNTESIS Y DE LA ACUMULACIÓN DE LÍPIDOS

<130> 358602D28616

<150> FR 1055331

15 <151> 2010-07-01

<160> 24

<170> PatentIn versión 3.5

20

<210> 1

<211> 1197

<212> ADN

<213> *Yarrowia lipolytica*

25

<400> 1

ES 2 617 337 T3

atgagcgcctc tacttcgatc gtccctgcgt tttaaacaca tgtccgccgt caaccgtctc 60  
acacaacagc ttcgactgct gaccgcctcc gcgcctctca gcgcagccaa caccgccggc 120  
aaggctcctt tcaaggctgc cgttggttgg tctggttaact ggggaaccac cgtcgccaag 180  
attgtcgccg agaactgcac tgctcaccct gagctctttg agcccgaggc tcgagtctgg 240  
gttcgagaag agaagggtcaa cggcaagaac ctgaccgaca ttttcaacgc tgagcacgag 300  
aacgtgcgat acctccctaa aatcaaactt cctcacaacc tgatcgccga gccggatctg 360  
ctcaaggccg tcgaggggtgc caacatcatc gtcttcaacc tgcccatca gttcctggct 420  
gggtgtctgca agcagctcaa gggccacgtc aaccccaagg ctagagccat ctcctgcctc 480  
aagggtctag atgtcaccct ccagggtgtt tacctgctct ccgacgttat cgagaacgag 540  
accggtctcc actgcgggtg tctgtccggg gctaacctcg ccaccgagat cgctctggag 600  
aagtactccg agactaccgt tgcttacaac cgacccaagg acttctttgg cgagggtgat 660  
gtgaccaacg atgtgctcaa ggctctgttc caccgacct acttccatgt gcgatgcggt 720  
caggacgtcg ccggtgtctc catcgagggt gcccttaaga acgttggtgc cctttgcgcc 780  
ggtttcgtcg agggcaagaa ctggggagac aacgccaagg ccgcaattat gcgacgagge 840  
atgcttgaga tgatcaactt ctccaagcga ttcttccccg aaactgatat taactctt 900  
acagtcgagt ctgccggtgt ggccgatctc atcacctcgt gcgctggagg ccgaaacttc 960  
aaggtcggcc gagcattcgg aaaggagagc ggctccggca agaccatcca ggacgtggag 1020  
aaggagcttc tcaacggcca gtccgcccag ggcgtcatca catgcaacga ggtccacgag 1080  
ctgctcaaga acaagaacat gcagaaggac ttcctctgt tcgagtccac ctggggcatt 1140  
atccacggtg agctcaagat tgatgatctc cccgagattc tttaccacgc caactag 1197

<210> 2

<211> 398

5 <212> PRT

<213> *Yarrowia lipolytica*

<400> 2

ES 2 617 337 T3

Met Ser Ala Leu Leu Arg Ser Ser Leu Arg Phe Lys His Met Ser Ala  
 1 5 10 15

Val Asn Arg Leu Thr Gln Gln Leu Arg Leu Leu Thr Ala Ser Ala Pro  
 20 25 30

Leu Ser Ala Ala Asn Thr Ala Gly Lys Ala Pro Phe Lys Val Ala Val  
 35 40 45

Val Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Thr Val Ala Lys Ile Val Ala Glu  
 50 55 60

Asn Cys Thr Ala His Pro Glu Leu Phe Glu Pro Glu Val Arg Val Trp  
 65 70 75 80

Val Arg Glu Glu Lys Val Asn Gly Lys Asn Leu Thr Asp Ile Phe Asn  
 85 90 95

Ala Glu His Glu Asn Val Arg Tyr Leu Pro Lys Ile Lys Leu Pro His  
 100 105 110

Asn Leu Ile Ala Glu Pro Asp Leu Leu Lys Ala Val Glu Gly Ala Asn  
 115 120 125

Ile Ile Val Phe Asn Leu Pro His Gln Phe Leu Ala Gly Val Cys Lys  
 130 135 140

Gln Leu Lys Gly His Val Asn Pro Lys Ala Arg Ala Ile Ser Cys Leu  
 145 150 155 160

Lys Gly Leu Asp Val Thr Pro Gln Gly Val Tyr Leu Leu Ser Asp Val  
 165 170 175

Ile Glu Asn Glu Thr Gly Leu His Cys Gly Val Leu Ser Gly Ala Asn  
 180 185 190

Leu Ala Thr Glu Ile Ala Leu Glu Lys Tyr Ser Glu Thr Thr Val Ala  
 195 200 205

Tyr Asn Arg Pro Lys Asp Phe Phe Gly Glu Gly Asp Val Thr Asn Asp  
 210 215 220

Val Leu Lys Ala Leu Phe His Arg Pro Tyr Phe His Val Arg Cys Val  
 225 230 235 240

ES 2 617 337 T3

Gln Asp Val Ala Gly Val Ser Ile Gly Gly Ala Leu Lys Asn Val Val  
 245 250 255

Ala Leu Cys Ala Gly Phe Val Glu Gly Lys Asn Trp Gly Asp Asn Ala  
 260 265 270

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

Lys Arg Phe Phe Pro Glu Thr Asp Ile Asn Thr Leu Thr Val Glu Ser  
 290 295 300

Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr Ser Cys Ala Gly Gly Arg Asn Phe  
 305 310 315 320

Lys Val Gly Arg Ala Phe Gly Lys Glu Ser Gly Ser Gly Lys Thr Ile  
 325 330 335

Gln Asp Val Glu Lys Glu Leu Leu Asn Gly Gln Ser Ala Gln Gly Val  
 340 345 350

Ile Thr Cys Asn Glu Val His Glu Leu Leu Lys Asn Lys Asn Met Gln  
 355 360 365

Lys Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ser Thr Trp Gly Ile Ile His Gly Glu  
 370 375 380

Leu Lys Ile Asp Asp Leu Pro Glu Ile Leu Tyr His Ala Asn  
 385 390 395

<210> 3  
 <211> 37  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido  
 10 <400> 3

gcggatccca caatgagcgc tctactcga tcgtccc 37

15 <210> 4  
 <211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Oligonucleótido  
 <400> 4

25 gcgcctaggc tagtggcgt ggtaaagaat ctcggg 36

<210> 5  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia artificial

<220>

	<223> Oligonucleótido	
	<400> 5	
5	tccaggccgt cctctccc	18
	<210> 6	
	<211> 21	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
15	<400> 6	
	ggccagccat atcgagtcgc a	21
	<210> 7	
20	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Oligonucleótido	
	<400> 7	
	tcctcaagcg acacgtcta	19
30	<210> 8	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
	<400> 8	
40	cagcaacagc aggtatcc	18
	<210> 9	
	<211> 22	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
50	<400> 9	
	ttctcatctt ccagtagcc ta	22
55	<210> 10	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
60	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
	<400> 10	
65	ggcaataaga ttgagaccgt t	21

# ES 2 617 337 T3

	<210> 11	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
	<400> 11	
10	tgtaccgatt ccagcagt	18
	<210> 12	
	<211> 19	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
20	<400> 12	
	ggtgtgggag ataaggcaa	19
25	<210> 13	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
	<400> 13	
35	cgagactacc gttgcttac	19
	<210> 14	
	<211> 19	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
45	<400> 14	
	caacaacggt ctaagggc	19
50	<210> 15	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> Oligonucleótido	
	<400> 15	
60	tgtgtggaac ctcgactaca a	21
	<210> 16	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	

<223> Oligonucleótido  
 <400> 16  
 5 catccagaag tagggaagc 19  
 <210> 17  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 10 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido  
 15 <400> 17  
 ctccgccgac ttcttatg 19  
 <210> 18  
 20 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 25 <223> Oligonucleótido  
 <400> 18  
 gaagtatccg tctcggtg 18  
 30 <210> 19  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 35 <220>  
 <223> Oligonucleótido  
 <400> 19  
 40 gagattgtgt cgcacact 18  
 <210> 20  
 <211> 20  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Oligonucleótido  
 50 <400> 20  
 tttgtcgaat acggatcggc 20  
 55 <210> 21  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 60 <220>  
 <223> Oligonucleótido  
 <400> 21  
 65 caagattgtc tctccctacg 20

# ES 2 617 337 T3

5	<210> 22 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido	
10	<400> 22 gtactcggat caggtcac	19
15	<210> 23 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 23 gttcgacaag gagcctatt	19
25	<210> 24 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 24	
35	ggtcagatgc ggatgataaa g	21

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Cepa de levadura oleaginosa mutante que sobreexpresa el gen *GPD1* con respecto a la cepa salvaje y que comprende por lo menos una mutación de pérdida de función en por lo menos un gen seleccionado de entre los genes *PEX*, los genes *POX*, el gen *MFE1* y el gen *POT1*, siendo dicha cepa mutante capaz de acumular unos lípidos.
2. Cepa de levadura oleaginosa según la reivindicación 1, caracterizada por que la levadura es *Yarrowia lipolytica*.
- 10 3. Cepa de levadura oleaginosa según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, caracterizada por que comprende por lo menos una mutación de pérdida de función en por lo menos uno de los genes *POX1*, *POX2*, *POX3*, *POX4*, *POX5* y *POX6*.
- 15 4. Cepa de levadura oleaginosa según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que comprende una mutación de pérdida de función en cada uno de los genes *POX1*, *POX2*, *POX3*, *POX4*, *POX5* y *POX6*.
- 20 5. Cepa de levadura oleaginosa según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que es además deficiente en cada uno de los productos de los genes *TGL3* y *TGL4*.
6. Cepa de levadura oleaginosa según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que comprende además un gen *GUT2* inactivado.
- 25 7. Cepa de levadura oleaginosa según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que comprende un gen *YAL10B10153g* inactivado.
8. Cepa de levadura oleaginosa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizada por que expresa un gen que codifica para una enzima seleccionada de entre una  $\Delta 8$  desaturasa, una  $\Delta 12$  desaturasa y una  $\Delta 15$  desaturasa.
- 30 9. Cepa de levadura oleaginosa según la reivindicación 8, caracterizada por que dicho gen codifica para una  $\Delta 12$  desaturasa.
- 35 10. Cepa de levadura oleaginosa según la reivindicación 9, caracterizada por que dicho gen es el gen *YAL10B10153g* de *Yarrowia lipolytica*.
- 40 11. Procedimiento de obtención de una cepa de levadura oleaginosa según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende las etapas que consisten en:
  - (a) inactivar por lo menos un gen seleccionado de entre los genes *PEX*, los genes *POX*, el gen *MFE1* y el gen *POT1*, y
  - (b) transformar en la cepa de levadura oleaginosa un polinucleótido que permite la expresión del gen *GPD1*.
- 45 12. Procedimiento según la reivindicación 11, caracterizado por que la cepa de levadura oleaginosa es una cepa de *Yarrowia lipolytica*.
- 50 13. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11 y 12, caracterizado por que la etapa (a) comprende las etapas de:
  - 1) seleccionar el gen de interés que se desea inactivar de entre los genes *PEX*, los genes *POX*, el gen *MFE1* y el gen *POT1*,
  - 2) construir un casete de disrupción,
  - 55 3) introducir un marcador de selección que contiene a uno y otro lado unas secuencias de recombinación que permiten una recombinación entre ellas para la eliminación del marcador,
  - 4) seleccionar las cepas con el gen de interés suprimido y verificar la delección,
  - 60 5) transformar con un vector que permite la expresión de la recombinasa, y
  - 6) aislar un clon que presenta la delección del gen de interés y que ha perdido el plásmido de expresión de la recombinasa.
  - 65
14. Procedimiento según la reivindicación 13, caracterizado por que las secuencias de recombinación son

secuencias *loxP* y/o *loxR*, y por que la recombinasa es la recombinasa Cre.

- 5 15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, caracterizado por que la etapa (a) se repite de manera que se inactive otro gen.
16. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, caracterizado por que el gen *GPD1* de la etapa (b) está bajo el control de secuencias promotoras y de secuencias terminadoras.
- 10 17. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 16, caracterizado por que la secuencia promotora se selecciona de entre el promotor *POX2*, el promotor *LIP2*, el promotor *FBA*, el promotor *GPM*, el promotor *YAT1*, el promotor *GPAT*, el promotor *TEF*, el promotor híbrido *hp4d* y unos promotores híbridos *XPR2*.
- 15 18. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 17, caracterizado por que la secuencia promotora es el promotor *TEF1*.
19. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 18, caracterizado por que la secuencia terminadora se selecciona de entre la secuencia terminadora del gen *PGK1* y la secuencia terminadora del gen *LIP2*.
- 20 20. Utilización de una cepa de levadura oleaginosa mutante según una de las reivindicaciones 1 a 10 para la síntesis de lípidos, particularmente de los ácidos grasos libres y de los triacilglicerolos.
21. Procedimiento de síntesis de lípido que comprende las etapas:
- 25 (1) de cultivar una cepa de levadura oleaginosa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en un medio apropiado, y
- (2) de recoger los lípidos producidos por el cultivo de la etapa 1.

Figura 1

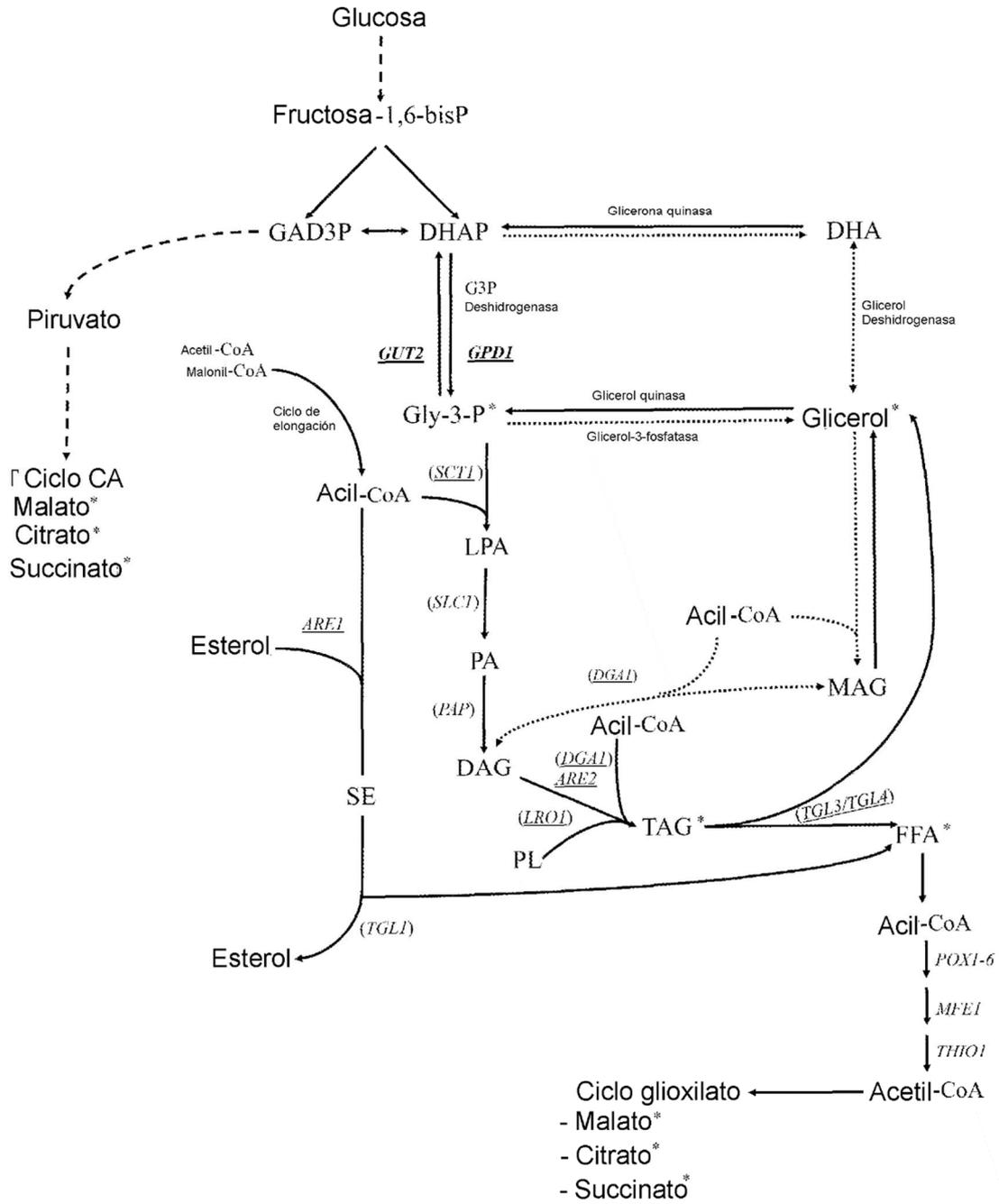


Figura 2

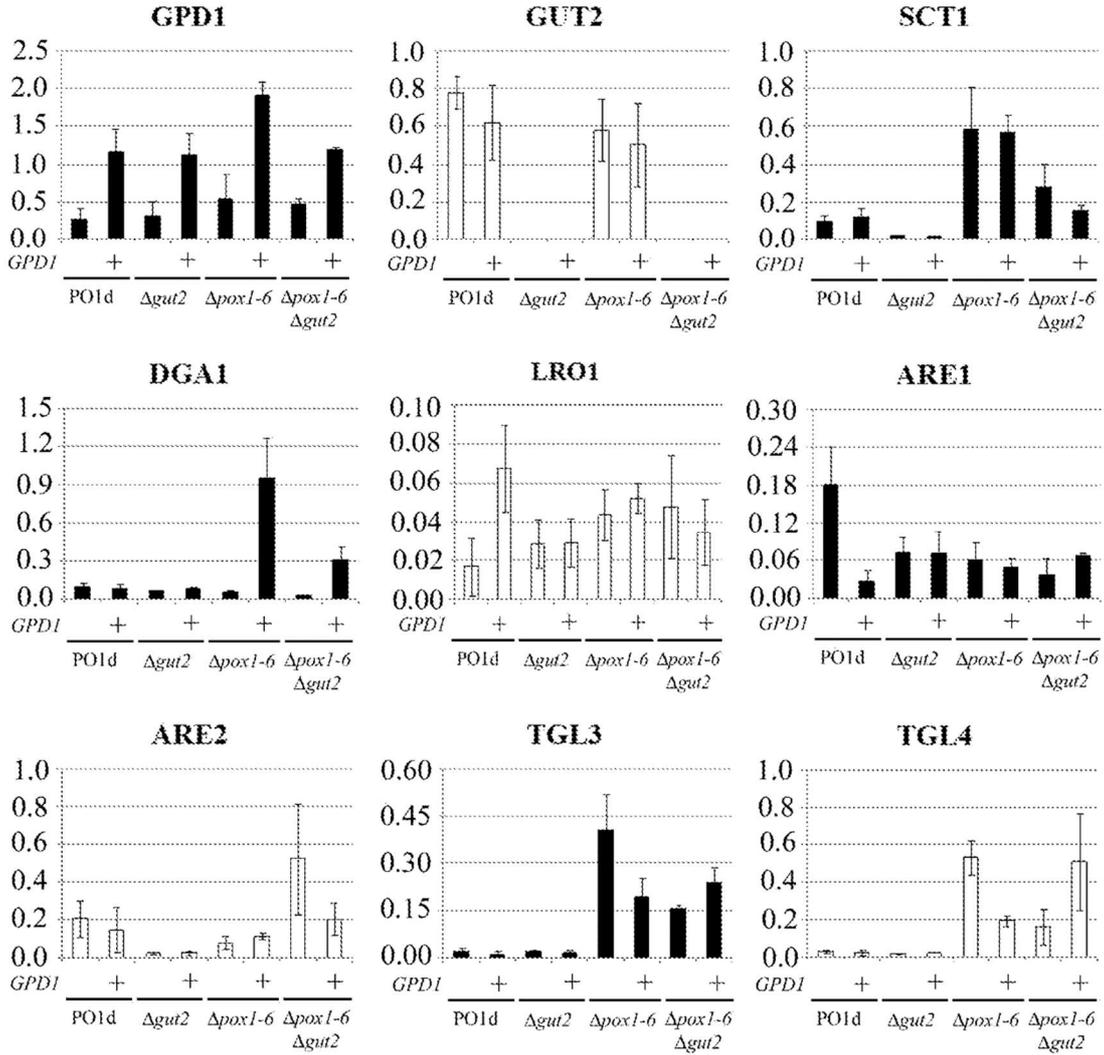


Figura 3

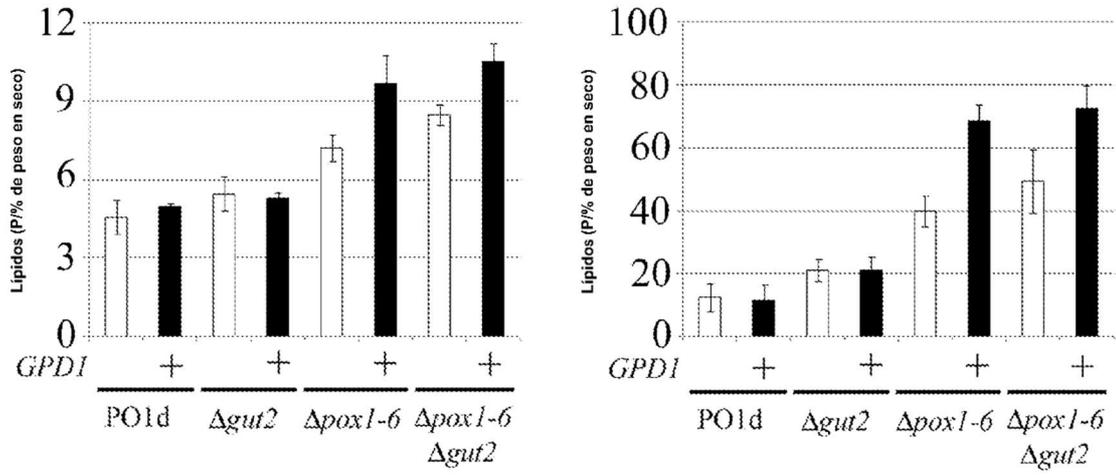


Figura 4

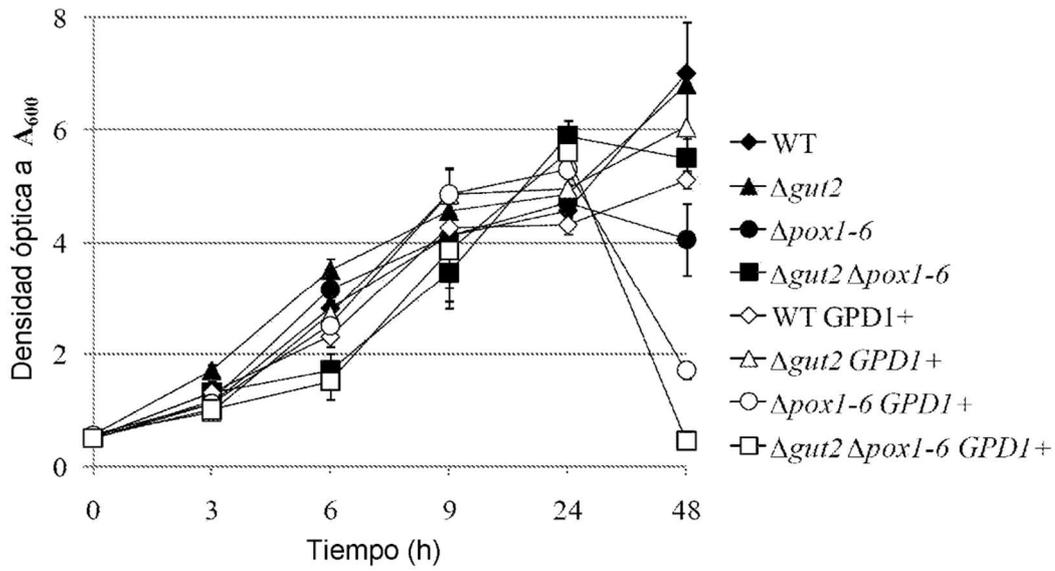


Figura 5

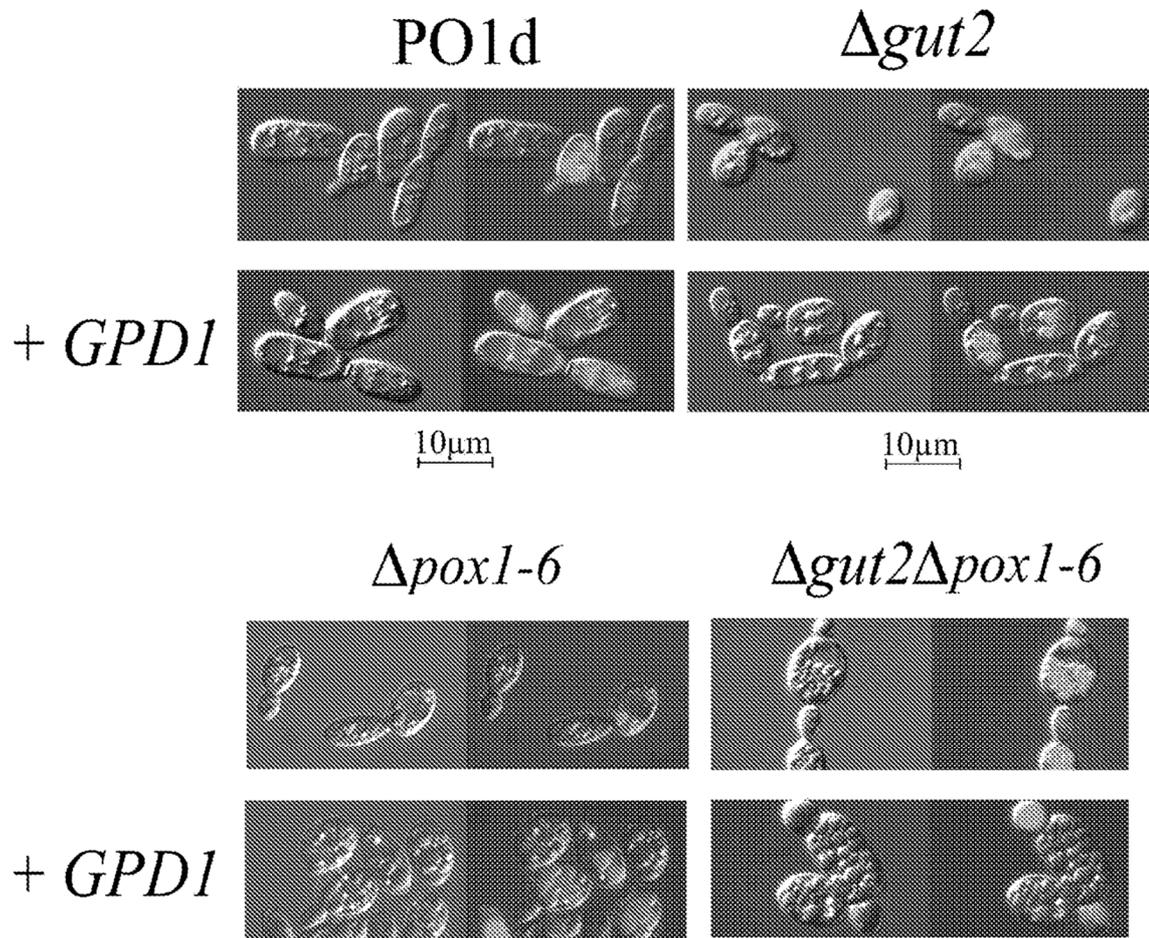


Figura 6

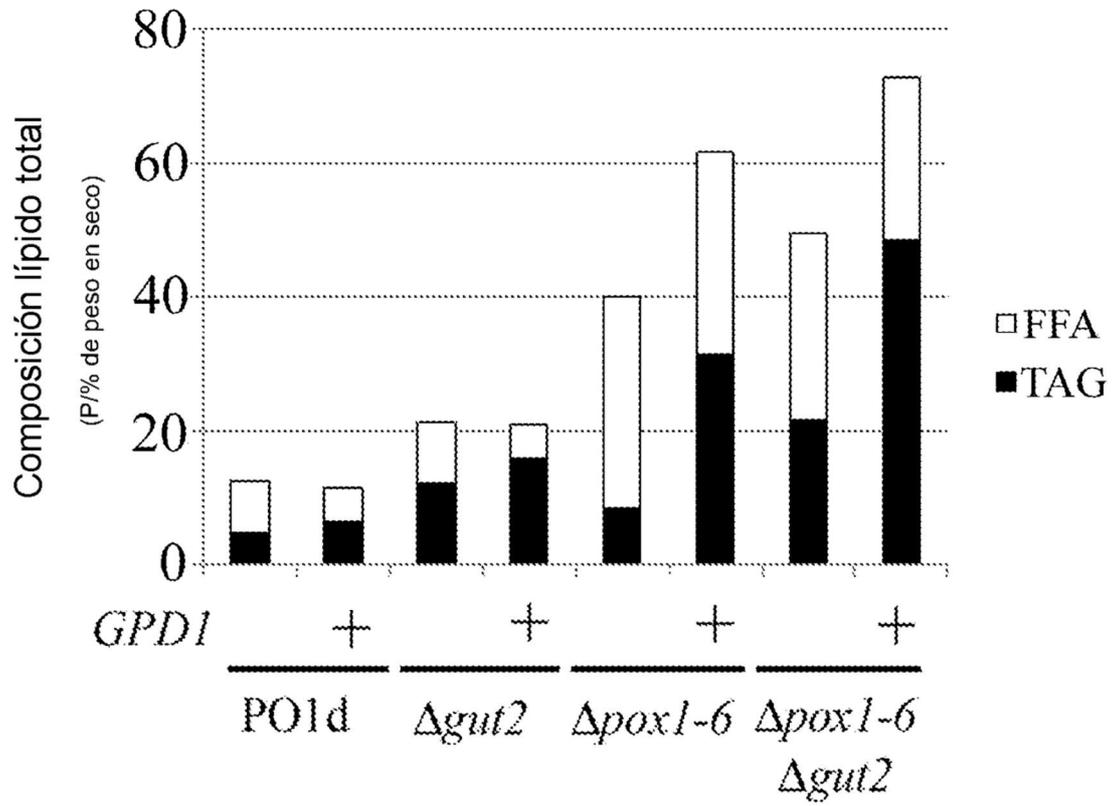


Figura 7A

atgagcgcctc	tacttcgatac	gtccctgcgt	tttaaacaca	tgtccgccgt	caaccgtctc	60
acacaacagc	ttcgactgct	gaccgcctcc	gcgcctctca	gcgcagccaa	caccgccggc	120
aaggctcctt	tcaaggtcgc	cgttgttgg	tctggtaact	ggggaaccac	cgtcgccaa	180
attgtcgcgg	agaactgcac	tgtccacccc	gagctctttg	agcccgaggt	tcgagtctgg	240
gttcgagaag	agaaggtcaa	cggcaagaac	ctgaccgaca	ttttcaacgc	tgagcacgag	300
aacgtgcgat	acctccctaa	aatcaaactt	cctcacaacc	tgatcgccga	gccggatctg	360
ctcaaggccg	tcgaggggtg	caacatcatc	gtcttcaacc	tgccccatca	gttcctggct	420
ggtgtctgca	agcagctcaa	gggccacgtc	aaccccaagg	ctagagccat	ctcctgcctc	480
aagggtctag	atgtcacccc	ccaggggtgt	tacctgctct	ccgacgttat	cgagaacgag	540
accggctctcc	actgcggtgt	tctgtccggg	gctaacctcg	ccaccgagat	cgctctggag	600
aagtactccg	agactaccgt	tgcttacaac	cgacccaagg	acttctttgg	cgaggggtgat	660
gtgaccaacg	atgtgctcaa	ggctctgttc	caccgacctt	acttccatgt	gcgatcggtt	720
caggacgtcg	ccgggtgtctc	catcggaggt	gcccttaaga	acgttgttgc	cctttgcgcc	780
ggtttcgtcg	agggcaagaa	ctggggagac	aacgccaagg	ccgcaattat	gcgacgaggc	840
atgcttgaga	tgatcaactt	ctccaagcga	ttcttccccg	aaactgatat	taacactctt	900
acagtcgagt	ctgccggtgt	ggccgatctc	atcacctcgt	gcgctggagg	ccgaaacttc	960
aagtcggcc	gagcattcgg	aaaggagagc	ggctccggca	agaccatcca	ggacgtggag	1020
aaggagcttc	tcaacggcca	gtccgccccag	ggcgtcatca	catgcaacga	ggtccacgag	1080
ctgctcaaga	acaagaacat	gcagaaggac	ttccctctgt	tcgagtccac	ctggggcatt	1140
atccacggtg	agctcaagat	tgatgatctc	cccagatctc	tttaccacgc	caactag	1197

Figura 7B

Met Ser Ala Leu Leu Arg Ser Ser Leu Arg Phe Lys His Met Ser Ala Val Asn Arg Leu Thr Gln Gln Leu  
 Arg Leu Leu Thr Ala Ser Ala Pro Leu Ser Ala Ala Asn Thr Ala Gly Lys Ala Pro Phe Lys Val Ala Val Val  
 Gly Ser Gly Asn Trp Gly Thr Thr Val Ala Lys Ile Val Ala Glu Asn Cys Thr Ala His Pro Glu Leu Phe Glu  
 Pro Glu Val Arg Val Trp Val Arg Glu Glu Lys Val Asn Gly Lys Asn Leu Thr Asp Ile Phe Asn Ala Glu  
 His Glu Asn Val Arg Tyr Leu Pro Lys Ile Lys Leu Pro His Asn Leu Ile Ala Glu Pro Asp Leu Leu Lys Ala  
 Val Glu Gly Ala Asn Ile Ile Val Phe Asn Leu Pro His Gln Phe Leu Ala Gly Val Cys Lys Gln Leu Lys Gly  
 His Val Asn Pro Lys Ala Arg Ala Ile Ser Cys Leu Lys Gly Leu Asp Val Thr Pro Gln Gly Val Tyr Leu Leu  
 Ser Asp Val Ile Glu Asn Glu Thr Gly Leu His Cys Gly Val Leu Ser Gly Ala Asn Leu Ala Thr Glu Ile Ala  
 Leu Glu Lys Tyr Ser Glu Thr Thr Val Ala Tyr Asn Arg Pro Lys Asp Phe Phe Gly Glu Gly Asp Val Thr  
 Asn Asp Val Leu Lys Ala Leu Phe His Arg Pro Tyr Phe His Val Arg Cys Val Gln Asp Val Ala Gly Val  
 Ser Ile Gly Gly Ala Leu Lys Asn Val Val Ala Leu Cys Ala Gly Phe Val Glu Gly Lys Asn Trp Gly Asp  
 Asn Ala Lys Ala Ala Ile Met Arg Arg Gly Met Leu Glu Met Ile Asn Phe Ser Lys Arg Phe Phe Pro Glu  
 Thr Asp Ile Asn Thr Leu Thr Val Glu Ser Ala Gly Val Ala Asp Leu Ile Thr Ser Cys Ala Gly Gly Arg Asn  
 Phe Lys Val Gly Arg Ala Phe Gly Lys Glu Ser Gly Ser Gly Lys Thr Ile Gln Asp Val Glu Lys Glu Leu  
 Leu Asn Gly Gln Ser Ala Gln Gly Val Ile Thr Cys Asn Glu Val His Glu Leu Leu Lys Asn Lys Asn Met  
 Gln Lys Asp Phe Pro Leu Phe Glu Ser Thr Trp Gly Ile Ile His Gly Glu Leu Lys Ile Asp Asp Leu Pro Glu  
 Ile Leu Tyr His Ala Asn