

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 685 502**

51 Int. Cl.:

C12P 1/04 (2006.01)
C12P 7/08 (2006.01)
C12P 7/64 (2006.01)
C12R 1/465 (2006.01)
C12R 1/47 (2006.01)
C12R 1/485 (2006.01)
C12R 1/545 (2006.01)
C12R 1/55 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.05.2010 E 10163732 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.06.2018 EP 2390341**

54 Título: **Proceso y microorganismos para la producción de lípidos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.10.2018

73 Titular/es:
NESTE OYJ (100.0%)
Keilaranta 21
02150 Espoo, FI

72 Inventor/es:
HOLMBÄCK, MARIA;
LEHESTÖ, MIINA;
KOSKINEN, PERTTU y
SELIN, JOHAN-FREDRIK

74 Agente/Representante:
VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 685 502 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proceso y microorganismos para la producción de lípidos

- 5 La presente invención se refiere a un proceso para producir lípidos para biocombustible o aplicaciones de lubricante y cepas microbianas usables en el proceso.

Antecedentes de la invención

- 10 El uso de material biológico renovable para la producción de biocombustibles está motivado generalmente por disminuir los impactos del cambio climático, asegurando el suministro de combustibles, y por factores económicos. Sin embargo, el uso de cosechas comestibles para crear combustibles en lugar de refinarlas adicionalmente en alimento para aumentar la población humana tiene cada vez una vida éticamente más corta. Por lo tanto, las fuentes biológicas que no pueden usarse para alimentar a la gente o al ganado y que pueden fabricarse de forma ambientalmente amigable, son de interés creciente.

- 15 La BCC Research (<http://www.bccresearch.com/>) estima que el mercado global para los biocombustibles líquidos valió 30.300 millones de \$ en 2008. Esto debería aumentar a 42.800 millones de \$ en 2013, para una tasa de crecimiento anual de compuesto (CAGR) del 7,2 %. Otra perspectiva del mercado es el volumen. En 2008 la capacidad de producción de biocombustible a lo largo de los 21 países considerados en el informe del estudio de la Unión Europea fue un total de 10.900 millones de litros de biocombustible y 66.600 millones de litros de bioetanol. Sobre el 99 % de esta producción se considera el denominado biocombustible de primera generación, incluyendo bioetanol basado tanto en azúcar como en almidón y combustible basado en aceite de semillas y aceite de desecho. El biocombustible puede estar hecho de cosechas de aceite de semillas, de grasas animales o de grasas recicladas. Ya que se conoce que las algas y algunos microorganismos son capaces de producir y/o acumular lípidos, también se ha sugerido su uso como la fuente de aceite para biocombustible. Estos aceites basados en microorganismos se denominan a menudo aceites de células únicas. Campbell 2008 y Strobel et al., 2008 han descrito la optimización de las condiciones de cultivo de algas y hongos en diferentes tipos de biorreactores para maximizar los rendimientos de los lípidos y los ácidos grasos para el refinado de biocombustibles.

- 20 Una opción alternativa a la producción fotosintética de lípidos es utilizar organismos heterótrofos que producen lípidos a partir de moléculas orgánicas (tales como azúcares) sin necesidad de luz. El proceso de producción de aceite de célula única usando microorganismos heterótrofos comprende cultivar microorganismos en biorreactores aireados, permitiendo que las células acumulen lípidos, cosechando células ricas en lípidos y recuperando el aceite de las células (Ratledge et al., 2005, Meng et al., 2009).

- 25 Los aceites de célula única se han usado tradicionalmente como productos especiales, por ejemplo, en alimentos sanos, no como productos químicos básicos. En estas clases de procesos de producción de aceite de célula única los volúmenes de producto son relativamente pequeños y el producto es caro. Por lo tanto, la estructura de coste de estos procesos permite la utilización de materias primas de suministro y funciones unitarias caras. También se han descrito clases similares de procesos de producción para la producción de lípidos para la producción de biocombustible (Ratledge y Cohen 2008; Meng et al. 2009). Sin embargo, ya que el producto es un producto químico básico barato, los costes de proceso no deben estar en el nivel de los costes de proceso de productos especiales. Además, el rendimiento del lípido por microorganismos heterótrofos es normalmente muy bajo, menos del 20 % en peso del azúcar de suministro (Ratledge y Cohen 2008).

- 30 Se han sugerido materias primas menos caras para su uso en la producción de lípidos por microorganismos heterótrofos en algunas publicaciones de patente recientes. El documento WO 2009/034217 A1 ha descrito un método de fermentación para fabricar parafinas, ácidos grasos y alcoholes mediante materiales de desecho y microbios. El documento WP 2009/046375 A2 sugiere la conversión de polisacáridos derivados de biomasa en monosacáridos u oligosacáridos y convertirlos en biocombustibles usando microorganismos recombinantes que comprenden genes exógenos que permiten que el microorganismo crezca en el polisacárido como una única fuente de carbono. El documento US 2009/0064567 A1 desvela la producción de aceites biológicos por fermentación heterótrofa haciendo crecer microorganismos del reino *Stramenophila* usando materia prima que contiene celulosa como una fuente principal de carbono. El documento WO2009/011480 A1 desvela la producción de aceites biológicos a partir de material celulósico despolimerizado por microalgas y hongos. El documento US 2009/0148918 A1 desvela un método de fabricación de lípidos cultivando una microalga en glicerol como una fuente de carbono. Además el documento WO 2009/009391 A2 desvela la producción de ésteres grasos produciendo primero una composición de alcohol y proporcionándola a un hospedador de producción de éster graso.

- 35 Ya que la economía de la producción de aceites de células únicas para biocombustibles es de importancia clave, todavía son de interés creciente nuevos procesos baratos para la producción lipídica para biocombustibles.

Sumario de la invención

- 65 Un objetivo de la presente invención es proporcionar un proceso barato para producir lípidos para biocombustible o

para aplicaciones de lubricantes.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar nuevos microorganismos que puedan usarse en dicho proceso.

5 La invención descrita en el presente documento proporciona, en un aspecto, un proceso para producir lípidos para biocombustible o para lubricante. La invención se basa en el descubrimiento de que las bacterias *Streptomyces* son capaces de producir lípidos eficazmente en un medio que comprende desecho o desechos y/o residuo o residuos orgánicos.

10 El proceso comprende cultivar células bacterianas del género *Streptomyces* en un medio que comprende desecho o desechos o residuo o residuos orgánicos o mezclas de los mismos como fuente o fuentes de carbono y/o nutrientes. El proceso comprende la recuperación de lípidos de las células de las bacterias o del medio de cultivo y el uso de los lípidos o una fracción de los mismos como biocombustible y/o lubricante o como material de partida para la producción de biocombustible y/o lubricante.

15 En diversas realizaciones de la invención el medio de cultivo puede comprender desecho o desechos o residuo o residuos orgánicos de la industria, incluyendo agricultura, desechos municipales o residuos microbianos.

20 Adicionalmente, el medio de cultivo puede comprender fuente o fuentes de carbono adicionales, tales como glicerol o una fracción de la industria de azúcar o de almidón.

En una realización de la invención el proceso puede usar medio de cultivo no estéril.

25 En otra realización de la invención el proceso puede usar medio de cultivo pasteurizado.

En algunas realizaciones de la invención el medio de cultivo puede comprender inhibidores de la lipasa. Los inhibidores de la lipasa pueden usarse para retardar o impedir la hidrólisis de acilglicérols o la degradación de lípidos formados en el proceso.

30 En una realización de la invención el cultivo se lleva a cabo como una fermentación en lote.

En otra realización de la invención el cultivo se lleva a cabo como una fermentación semicontinua.

35 Como se desvela en el presente documento el proceso produce lípidos que comprenden principalmente TAG (triacilglicérols). Normalmente la cantidad de TAG en el medio de cultivo empleado es al menos 1 g/litro del medio.

40 Pueden usarse diversos *Streptomyces* en la invención. Pueden seleccionarse del grupo que comprende *Streptomyces roseosporus*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces albus*, *Streptomyces peucetius*, *Streptomyces aureofaciens*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces hygroscopicus*, *Streptomyces avermitilis* y *Streptomyces lydicus*.

45 Las cepas de *Streptomyces* pueden seleccionarse del grupo que comprende cepas de *Streptomyces roseosporus* GAL4111, *Streptomyces roseosporus* G011, *Streptomyces griseus* GAL1005, *Streptomyces albus* GAL1001, *Streptomyces peucetius* D2, GAL4082, *Streptomyces peucetius* P55 GAL4081, *Streptomyces aureofaciens* GAL1004, *Streptomyces lividans* GAL1002, *Streptomyces coelicolor* GAL1003, *Streptomyces hygroscopicus* GAL4051, *Streptomyces avermitilis* GAL1006 y *Streptomyces lydicus* GAL1007.

50 Son ventajosas en el proceso de la presente invención las especies o cepas de *Streptomyces* que no producen o solo muy pocas cantidades de metabolitos bioactivos.

55 En una realización específica de la invención las especies o cepas de *Streptomyces* pueden hacerse deficientes en la producción de metabolitos bioactivos. Los ejemplos de metabolitos bioactivos son por ejemplo agentes antibióticos, tales como antibióticos lipopeptídicos, por ejemplo daptomicina o agentes quimioterapéuticos, tales como daunomicina.

60 Las cepas que producen bajas cantidades de compuestos bioactivos o que se hacen deficientes en la producción de compuestos bioactivos son por ejemplo cepas seleccionadas del grupo que comprende *Streptomyces roseosporus* GAL4111, *Streptomyces roseosporus* G011, *Streptomyces griseus* GAL1005, *Streptomyces albus* GAL1001, *Streptomyces peucetius* P55 GAL4081 y *Streptomyces peucetius* D2 GAL4082.

En un aspecto la invención proporciona un cultivo de *Streptomyces*, que comprende

65 (a) una población de bacterias del género *Streptomyces*; y (b) un medio de cultivo que comprende desecho o desechos o residuo o residuos orgánicos o mezclas de los mismos como fuente o fuentes de carbono y/o nutrientes.

En otro aspecto de la invención, la presente invención proporciona nuevos hospedadores *Streptomyces* genéticamente modificados capaces de una producción eficaz de lípidos.

5 En una realización de la invención las células hospedadoras de *Streptomyces* pueden modificarse genéticamente para expresar al menos un gen de la ruta de biosíntesis de los lípidos. En particular, el gen puede ser un gen que codifica la diacilglicerol aciltransferasa (DGAT) y/o un gen que codifica la proteína vehículo 3-cetoacil-acil sintasa III (FabH).

10 En una realización de la invención las células hospedadoras de *Streptomyces* pueden modificarse genéticamente para expresar uno o más genes seleccionados del grupo que comprende

(a) *sco0958* (SEQ ID NO: 1) y/o *sco5888* (SEQ ID NO: 2);

15 (b) el homólogo más cercano de dichos genes en una especie de *Streptomyces*;

(c) una secuencia de nucleótidos que hibrida a al menos uno de dichos genes o dichos homólogos en condiciones de rigurosidad;

20 (d) una secuencia de nucleótidos que causa la misma o una función equivalente a la que tienen los productos génicos ID 101096381 o ID 101101330; y/o

(e) una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que muestra al menos un 60 % de identidad a SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.

25 En particular, las cepas genéticamente modificadas adecuadas son cepas seleccionadas del grupo que comprende G009, G010, G012, G013, G014, G015, G016, G017 y G019.

30 En una realización específica de la presente invención se proporcionan nuevas cepas de *Streptomyces* seleccionadas del grupo que comprende G009, G010, G013 y G017.

En un aspecto adicional la presente invención proporciona el uso de cualquiera de las células hospedadoras, los cultivos o las cepas de *Streptomyces* para producir lípidos y usar los lípidos como biocombustible o como un material de partida para la producción de biocombustible y/o lubricante.

35 Además, en un aspecto la invención proporciona productos obtenidos usando el proceso de acuerdo con esta divulgación.

40 Se obtienen ventajas considerables por los medios de la presente invención. Por medio del proceso y los microorganismos presentados en este punto, es posible producir eficazmente lípidos para biocombustible y/o lubricante, o como material de partida para la producción de biocombustible y/o lubricante. Las ventajas de la presente invención pueden resumirse como sigue:

45 En la presente invención se ha descubierto sorprendentemente que los estreptomicetos pueden producir altas cantidades de lípidos cuando se cultivan en un medio que comprende desecho o desechos y/o residuo o residuos orgánicos. El uso de desecho o desechos y/o residuo o residuos orgánicos como una fuente o fuentes de carbono y/o de nutrientes reduce los costes del medio de cultivo, en particular porque el desecho o desechos y/o residuo o residuos orgánicos son baratos y no necesitan o solo poco pretratamiento antes de su uso. Los componentes de los materiales de desecho o residuales no necesitan necesariamente separarse, hidrolizarse (despolimerizarse) y/o purificarse antes de que se añadan al medio de cultivo.

50 El rendimiento de los lípidos producidos por *Streptomyces* en el proceso puede aumentarse además usando inhibidores de lipasa en el medio de cultivo. Los inhibidores de lipasa son capaces de retardar o impedir la hidrólisis de acilgliceroles o la degradación de lípidos formados en el proceso.

55 El proceso como se describe en este punto produce lípidos que comprenden principalmente TAG (triacilgliceroles). Los compuestos preferidos adecuados para el procesamiento químico para la producción de biocombustible son los TAG.

60 La eficiencia de las especies o las cepas de *Streptomyces* para producir lípidos puede mejorarse además haciendo a las especies o cepas deficientes en la producción de metabolitos bioactivos, tales como agentes antibióticos. La cepa hospedadora modificada tiene más capacidad para producir lípidos, cuando no produce metabolitos bioactivos.

65 La eficiencia de la producción de lípidos puede aumentarse además produciendo nuevos hospedadores de *Streptomyces* genéticamente modificados que pueden modificarse genéticamente para expresar al menos un gen de la ruta de biosíntesis de lípidos.

En lo siguiente, la invención se examinará más estrechamente con la ayuda de una descripción detallada y con referencia a algunos ejemplos funcionales.

Breve descripción de los dibujos

- 5 La Figura 1 presenta el esquema de proceso.
- La Figura 2 representa el perfil de TLC (cromatografía en capa fina) de la cepa G009.
- 10 La Figura 3 muestra los cambios de PMV, masa celular y dispersión de lípidos en fracciones sólidas y líquidas en cultivos de 5 días de la cepa G009 en medio TSB líquido. El ciclo de crecimiento es de aproximadamente 36 horas después de lo que tiene lugar la lisis celular. La acumulación de TAG tiene lugar inmediatamente después de la fase de crecimiento rápido en 24 a 48 horas.
- 15 La Figura 4 presenta un ejemplo de la acumulación de TAG en diferentes medios por G009. Las muestras de izquierda a derecha son medio E05-14 después de 0, 2, 5 y 7 días, medio E05-15 después de cultivo de 0, 2, 5 y 7 días, patrones COD (octadecanato de colesterol), C (colesterol) y GTM (trimiristato de glicerilo), medio E05-16 después de 0, 2, 5 y 7 días, medio E05-17 después de cultivo de 0, 2, 5 y 7 días.
- 20 La Figura 5 presenta un ejemplo de la acumulación de TAG en diferentes medios por las cepas G017, G016, G013 y G011. Las muestras de izquierda a derecha son patrón GTM en concentraciones de 40, 20, 10 y 5 g/l, muestras de G017 después de 0, 1, 2 y 5 días de cultivo, muestras de G016 después de 2, 3 y 6 días de cultivo, muestras de G013 después de 1, 2, 5 y 6 días de cultivo, muestras de G011 después de 2, 3 y 6 días de cultivo.

25 Descripción detallada de la invención

“Biocombustible” se refiere a combustible sólido, líquido o gaseoso derivado principalmente de biomasa o biodesecho y es diferente de combustibles fósiles, que derivan de restos orgánicos de microorganismos, plantas y animales prehistóricos.

- 30 De acuerdo con la directiva de la UE 2003/30/EU “biodiesel” se refiere a un metil-éster producido a partir de aceite vegetal o aceite animal, de calidad diésel para su uso como biocombustible. Más ampliamente, biodiesel se refiere a ésteres de alquilo de cadena larga, tales como ésteres de metilo, etilo o propilo, a partir de aceite vegetal o aceite animal de calidad diésel. El biodiesel también puede producirse a partir de lípidos de microorganismos, por lo que los lípidos de microorganismos pueden originarse a partir de una bacteria, un hongo (una levadura o un moho), un alga u otro microorganismo.

- 40 “Diésel renovable” se refiere a un combustible que se produce por un tratamiento de hidrógeno de lípidos de un origen animal, vegetal o de microorganismo, o sus mezclas, por lo que un lípido de microorganismo puede originarse a partir de una bacteria, un hongo (una levadura o un moho), un alga u otro microorganismo. El diésel renovable puede producirse también a partir de ceras derivadas de biomasa por gasificación y síntesis de Fischer-Tropsch. Opcionalmente, además del tratamiento de hidrógeno, pueden realizarse isomerización u otras etapas de procesamiento. Los procesos de diésel renovable también pueden usarse para producir combustible a reacción y/o gasolina. La producción de diésel renovable se ha descrito en las solicitudes de patente EP 1396531, EP1398364, EP 1741767 y EP1741768.

El biodiesel o el diésel renovable pueden mezclarse con diésel basado en aceite mineral. Pueden añadirse aditivos adecuados, tales como conservantes y antioxidantes, al producto de combustible.

- 50 “Lubricante” se refiere a una sustancia, tal como grasa, lípido o aceite, que reduce la fricción cuando se aplica como recubrimiento para mover partes. Dos funciones principales distintas de un lubricante son la retirada de calor y disolver impurezas. Las aplicaciones de los lubricantes incluyen, pero no se limitan a usos en los motores de combustión interna como aceites de motor, aditivos en combustibles, en dispositivos dirigidos por aceite tales como bombas y equipo hidráulico o en diferentes tipos de aspectos. Normalmente los lubricantes contienen un 75-100 % de aceite base y el resto son aditivos. Los aditivos adecuados son por ejemplo detergentes, estabilizantes de almacenamiento, antioxidantes, inhibidores de corrosión, eliminadores de la turbidez, desemulsionantes, agentes antiespumantes, codisolventes y aditivos de la lubricidad (véase por ejemplo el documento US 7.691.792). El aceite base para el lubricante puede originarse a partir de aceite mineral, aceite vegetal, aceite animal o de una bacteria, un hongo (una levadura o un moho), un alga u otro microorganismo. El aceite base también puede originarse de ceras derivadas de biomasa por gasificación y síntesis de Fischer-Tropsch. El índice de viscosidad se usa para caracterizar el aceite base. SE prefiere normalmente un índice de viscosidad alto.

- 65 El término “lípido se refiere a una sustancia grasa, cuya molécula contiene generalmente, como una parte, una cadena de hidrocarburo alifático, que se disuelve en disolventes orgánicos no polares pero que es escasamente soluble en agua. Los lípidos son un grupo esencial de grandes moléculas en las células vivas. Los lípidos son, por ejemplo, grasas, aceites, ceras, ésteres de cera, esteroides, terpenoides, isoprenoides, carotenoides,

polihidroxicanoatos, ácidos nucleicos, ácidos grasos, alcoholes grasos, ésteres de ácido graso, fosfolípidos, glucolípidos, esfingolípidos y acilgliceroles.

5 El término "acilglicerol" se refiere a un éster de glicerol y ácidos grasos. Los acilgliceroles se dan de forma natural como grasas y aceites grasos. Los ejemplos de acilgliceroles incluyen triacilgliceroles (TAG, triglicéridos), diacilgliceroles (diglicéridos) y monoacilgliceroles (monoglicéridos).

10 La presente invención se refiere a métodos para la producción eficiente de lípidos por estreptomicetos usando medios de cultivo que comprenden desecho o desechos o residuo o residuos orgánicos o mezclas de los mismos como una fuente de carbono y/o nutriente. Además el medio de cultivo puede comprender otros componentes, tales como sales minerales usadas normalmente al cultivar dichos microorganismos. El cultivo se lleva a cabo en condiciones adecuadas para la producción de lípidos. El cultivo se lleva a cabo normalmente en un fermentador usando agitación y aireación.

15 En algunas realizaciones de la invención el desecho o desechos o residuo o residuos orgánicos pueden usarse como la única o principal fuente de carbono y/o de nutrientes, o en algunas realizaciones como (un) suplemento o suplementos. El desecho o residuo puede comprender uno o más desecho o desechos o residuo o residuos o mezclas de los mismos.

20 Si un desecho o residuo es la "fuente principal de carbono y/o nutrientes" en el medio, significa que basado en el peso, la cantidad de desecho es mayor en el medio que la cantidad de ingredientes puros (es decir, azúcar) en el medio.

25 Si una fracción de desecho o residuo se usa "como un suplemento" significa que en la base del peso, la cantidad de fracción de desecho o residuo es menor en el medio que la cantidad de ingredientes puros (es decir, azúcar) en el medio.

30 En la presente invención se ha descubierto sorprendentemente que las bacterias *Streptomyces* acumulan altas cantidades de lípidos y en particular de los triacilgliceroles (TAG) cuando se cultivan en materiales de desecho y/o residuos.

35 Las bacterias del género *Streptomyces* se conocen bien en la industria farmacéutica. Se sabe que los estreptomicetos producen pequeñas moléculas, enzimas útiles y diversos metabolitos distintos por metabolismo primario y secundario. Normalmente, los procesos de fermentación aerobia son adecuados para diversas especies de *Streptomyces* ya que se ha desarrollado la metodología en muchas circunstancias usando estas bacterias como organismos modelo. En los procesos de la técnica anterior los estreptomicetos se cultivan normalmente en medios complejos para potenciar la acumulación de metabolitos industrialmente útiles, tales como antibióticos. El coste de estos procesos de fermentación está fuertemente influenciado por los costes de material y de purificación. La esterilización necesaria para mantener la fermentación libre de contaminantes es extremadamente consumidora de energía y los costes de esterilización son altos. Además cuando se producen antibióticos a granel la energía necesaria para la esterilización del medio forma la mayor categoría de coste en el proceso, aunque se fabrican en tanques de fermentación grandes y sencillos.

45 En la presente invención se ha descubierto sorprendentemente que los estreptomicetos pueden producir altas cantidades de lípidos cuando se cultivan en materiales de desecho y residuales. Es remarcable que los componentes de los materiales de desecho o residuales no necesariamente necesitan separarse, hidrolizarse (despolimerizarse) y/o purificarse antes de que se añadan al medio de cultivo. Por lo tanto, en algunas realizaciones el material de desecho puede añadirse al medio de cultivo sin ninguna separación, hidrólisis (mecánica, química o enzimática) o purificación. Por ejemplo, los materiales lignocelulósicos pueden usarse en el cultivo y la producción de lípidos sin hidrólisis (despolimerización) de los polisacáridos. En otras realizaciones pueden añadirse en forma bruta, es decir, comprendiendo algo de purificación preliminar, pero no purificándose para separar componentes. Adicionalmente, el desecho o el residuo pueden añadirse como tales, o dependiendo de la estructura del material, pueden añadirse en forma molida o machacada al medio de cultivo. Los desechos y/o residuos pueden utilizarse también en forma parcial o completamente purificada, separada o hidrolizada (despolimerizada) para la producción de lípidos por *Streptomyces*.

60 En la presente divulgación "desecho orgánico o residuo" se refiere en particular al material de desecho, del que los componentes no están, o al menos no completamente, separados, hidrolizados (despolimerizados) y/o purificados. El uso de desechos o material residual sin separación, hidrolización (despolimerización) y/o purificación de los componentes hace a los procesos de la presente invención más rentables en comparación con el uso de ingredientes puros. Sin embargo, en algunas realizaciones de la invención pueden usarse ingredientes puros en medios de cultivo como fuentes de carbono además del material o materiales de desecho.

65 "Desecho o residuo orgánico no estéril o medio de cultivo que comprende desecho o residuo" se refiere en particular a material o medio de desecho o residual, que no está esterilizado. En algunas realizaciones, el material o medio de desecho puede pasteurizarse.

Por esterilización se entiende que el material o medio de desecho o residual que comprende el material de desecho o residual se trata con alta temperatura, normalmente a 121 °C durante al menos 20 minutos.

5 “Pasteurización” se refiere al calentamiento de un material o medio de desecho o residual que comprende material de desecho o residual a 60 °C - 75 °C durante 2 - 30 minutos. Como se describe en el presente documento incluso con alto contenido de fracciones de desecho o residuales hasta 200 g/l, no se detectaron células vivas o esporas en TSA (Agar de Soja Triptico). En los cultivos donde se usaron medios pasteurizados en vez de medios esterilizados, no se encontraron diferencias en el crecimiento de los estreptomicetos. El medio de cultivo puede comprender desecho o desechos o residuo o residuos orgánicos o su combinación con nutrientes puros.

10 En algunas realizaciones de la presente invención un medio de cultivo que contiene desecho o residuo orgánico puede usarse como tal, en algunas realizaciones sin esterilización por cualquier método, o sin pasteurización. Medio “no estéril” significa que el medio de cultivo con material de desecho o residual no se esteriliza por ningún método.

15 En la presente divulgación “desecho o residuo orgánico” e refiere en particular a desecho o residuo de la industria incluyendo agricultura, desechos municipales o residuos microbianos. Dicho desecho o residuo normalmente (i) no se usa como comida para personas o animales y (ii) se forma en grandes cantidades (normalmente en cientos o millones de toneladas al año globalmente). Un gran grupo de desechos orgánicos de la industria cumple estos criterios. “Desecho o residuo orgánico” se refiere a cualquier material o fracción de desecho o residual que es biológicamente degradable.

25 El desecho o residuo industrial puede comprender residuo de menudencias, residuo orgánico o residuo de la producción de comida o alimentación, por ejemplo de panadería, cervecería, por ejemplo, pasta, extracto de malta, matadero, por ejemplo residuo de menudencias, restos de carne o pescado, industria azucarera por ejemplo pulpa de remolacha azucarera, o materiales o residuos celulósicos o lignocelulósicos derivados de madera, o residuos agrícolas, tales como residuos de grano, por ejemplo, salvado, barcia, paja, tallos, bagazo de azúcar de caña u otras plantas tales como cultivos celulósicos, pasto varilla, hierba cinta, *Miscanthus*, fibra de sorgo, fibra de caña o residuos vegetales, tales como licor de maíz fermentado (CSL) o glicerol, por ejemplo, de la producción de biodiesel.

30 Los desechos municipales pueden comprender lodo municipal, papel de desecho, biodesechos de cocina institucional o de los hogares, desechos orgánicos del jardín o desechos orgánicos de la producción de comida.

35 Los desechos microbianos pueden comprender células microbianas o restos celulares (por ejemplo, lactobacilos, estreptomicetos) por ejemplo de procesos industriales basados en el uso de microorganismos, o restos de algas (por ejemplo, *Phaeodactylum*, *Chlorella*, *Dunaliella*, *Nannochloropsis*).

40 El desecho o desechos o residuo o residuos preferidos son desechos o residuos lignocelulósicos de la agricultura y desechos o residuos de los procesos de la industria de la pulpa y el papel incluyendo cultivos celulósicos (de energía).

El desecho o desechos o residuo o residuos preferidos son también biodesechos de cocina institucional o de la industria de comida o alimentación.

45 El desecho o desechos o residuo o residuos preferidos son también desechos o residuos microbianos, en particular desechos o residuos de algas o bacterianos. Los materiales de desecho o residuos orgánicos se refieren en particular a cualquier desecho o residuo orgánico, que *Streptomyces* puede usar para crecer y/o para la producción de lípidos.

50 En algunas realizaciones de la invención los desechos o residuos orgánicos pueden suplementarse con una fuente de carbono adicional, tales como glicerol, una fracción de la industria del azúcar o del almidón, jarabe o jarabes de azúcar o de almidón o azúcar o azúcares purificados o cualquier mezcla de los mismos. Más específicamente los desechos o residuos orgánicos pueden suplementarse con productos brutos de la industria del azúcar y del almidón, tales como jarabes de azúcar, jarabes de almidón, jarabes de glucosa (dextrosa) o melazas. Además, los desechos pueden suplementarse con azúcar o azúcares únicos o mezclas de C6 o C5 tales como glucosa, fructosa, manosa, xilosa o arabinosa, dímeros de azúcares tales como sacarosa o lactosa o polímeros de azúcar tales como celulosa, almidón o xilano, El uso de suplementos de la industria del azúcar o el almidón u otros azúcares purificados puede aumentar y acelerar el crecimiento de los estreptomicetos y/o la acumulación de lípidos.

60 El término desecho o residuo orgánico abarca también la frase “fracción de desecho o residual”. La frase “fracción de desecho o residual” se refiere, por ejemplo, al desecho producido como un producto secundario (rama) o un producto secundario (rama) de un proceso industrial que produce algún otro producto como el producto principal.

Dentro del alcance de la presente invención está el uso de desechos orgánicos o residuos solos o en cualquier combinación o mezcla.

65 En términos de acumulación de lípidos en los cultivos es ventajoso usar el desecho o el residuo al jarabe de almidón

o jarabe de azúcar en la relación de 10/1 a 1/2, preferentemente de 5/1 a 1/1. Por ejemplo, se encontró una buena acumulación de lípidos en cultivos que contenían 10-50 g/l de desecho con 10 g/l de jarabe de azúcar.

5 Adicionalmente, como se describe en el presente documento, es beneficioso para el crecimiento celular complementar el material de desecho o residual orgánico industrial con residuos microbianos, tales como restos celulares. Como se describe en el presente documento se encontró buen crecimiento por ejemplo en cultivos con restos celulares, en particular se usó de origen bacteriano o de algas junto con material de desecho orgánico, tal como CSL (Licor destilado de maíz) y/o con Farmamedia como medio de suplemento. Por ejemplo, pueden usarse en la invención los restos bacterianos de estreptomicetos o lactobacilos y/o restos de algas de *Phaeodactylum*, *Chlorella*, *Dunaliella* y
10 *Nannochloropsis*. Otro suplemento beneficioso para el crecimiento celular de acuerdo con la presente invención es la soja.

15 El almidón es ventajoso para la acumulación de lípidos. Sin embargo, económicamente es beneficioso, si se reemplaza el almidón por residuos agrícolas, tales como bagazo, salvado, barcia o paja. Las células o los residuos de algas o microbianos, tales como restos bacterianos o de algas, biodesechos, carne, CSL, OVR (suministro proteico de grano (cebada)), alimentación de visón y/o menudencias pueden reemplazar los ingredientes basados en proteínas normalmente útiles en la fermentación de estreptomicetos, tales como extracto de levaduras, Farmamedia y/o soja.

20 En el medio de cultivo pueden usarse desechos o residuos en una amplia escala. En algunas realizaciones la cantidad de desecho o residuo en el medio de cultivo puede variar de 1 g/l a 400 g/l, normalmente de 2 g/l hasta 200 g/l, en algunas realizaciones de 20 a 150 g/l, en algunas otras realizaciones de 50 a 100 g/l. Se ha descubierto que los estreptomicetos usan eficazmente fracciones de desecho para el crecimiento y se ha descubierto que la acumulación de lípidos es similar cuando se compara con cultivos con nutrientes puros.

25 Como se describe en el presente documento el crecimiento celular puede seguirse usando el volumen de micelios empaquetados (PMV), los cambios de masa celular, colocando en placa y por análisis de microscopio y visuales.

30 El crecimiento celular de alta densidad se obtiene con varias fracciones de desecho. En diversas realizaciones varía de 1 a 200 g/l, normalmente de 10 a 130 g/l como masa de células secas.

Los valores de PMV con varias fracciones de desecho varían del 1 % al 80 %, normalmente del 6 % al 40 % en las condiciones de cultivo convencionales (28 °C, 150 rpm).

35 Está claro, sin embargo, que pueden obtenerse densidades celulares incluso mayores ajustando las condiciones de fermentación en consecuencia. Por otro lado la masa celular no se correlaciona directamente con las cantidades de lípidos acumuladas.

40 Dentro del alcance de la presente invención también está el uso de material de desecho en combinación con ingredientes puros.

45 El desecho o desechos o residuo o residuos orgánicos hidrolizados o parcialmente hidrolizados (despolimerizados) son usables en la presente invención. Los desechos o residuos pueden hidrolizarse por hidrólisis (termo)mecánica, química o enzimática. Por ejemplo, el material de desecho o residual puede tratarse por enzimas adecuadas para digerir ingredientes brutos. Las enzimas adecuadas son por ejemplo celulasas, hemicelulasas, xilanasas y pectinasas. También pueden usarse en la invención estreptomicetos que posean tanto funciones de enzimas digestivas como que tengan la capacidad de acumular lípidos. De esta manera, no es necesario el procesamiento del desecho. Por ejemplo, las cepas adecuadas para este fin son aquellas que pertenecen a las especies *S. roseosporus* y *S. albus*.

50 Dentro del alcance de la presente invención están los cultivos en lote, semi-discontinuos y continuos.

55 En los cultivos con sustancias sólidas o semisólidas como materiales brutos (fuentes de carbono y/o nutrientes), la biomasa puede disminuir en los primeros días de cultivo debido a la utilización de materias primas por microorganismos que aumentan en los siguientes días.

60 En algunas realizaciones de la invención *Streptomyces* produce lípidos como se estima por la masa seca de extractos de cloroformo derivados de los cultivos al menos 0,1 g/litro, preferentemente al menos 0,5 g/litro, más preferentemente al menos 1 g/litro, aún más preferentemente al menos 5 g/litro del medio de cultivo gastado, en algunas realizaciones al menos 10 g/litro, normalmente 5 - 30 g/litro, en algunas otras realizaciones 10 a 25 g/litro hasta 150 g/litro estimados como masa seca de los extractos de cloroformo. Varía en algunas realizaciones en el intervalo de 1 - 200 g/litro, siendo normalmente 5-100 g/litro del medio de cultivo gastado.

65 En algunas realizaciones de la invención la concentración (título) de los TAG es generalmente al menos 0,1 g/l (0,1 kg/1000 litros), preferentemente al menos 0,5 g/l (0,5 kg/1000 litros), más preferentemente al menos 1 g/l (1 kg/1000 litros), aún más preferentemente al menos 5 g/l (5 kg/1000 litros) del medio de cultivo gastado. Habitualmente varía

de 0,5 a 150 kg/1000 litros, en algunas realizaciones 1 a 100 kg/1000 litros, en algunas realizaciones distintas 1 a 70 kg/1000 litros, normalmente siendo aproximadamente 5 - 50 kg/1000 litros, en algunas realizaciones 10 a 30 kg/1000 litros, en algunas realizaciones distintas 15 a 25 kg/1000 litros de medio de cultivo gastado.

5 La mejora de la producción de TAG por las cepas genéticamente modificadas es generalmente al menos el 10 %, normalmente al menos el 30 %, en algunas realizaciones al menos el 50 % e incluso el 100 - 300 % en comparación con las cepas parentales.

10 “Medio de cultivo gastado” se refiere a un medio usado en el cultivo de microorganismos y que comprende los productos acumulados por los microorganismos. El medio de cultivo gastado puede denominarse también caldo de cultivo.

Adicionalmente, en diversas realizaciones de la invención la cantidad de lípidos totales es al menos un 10 % por su peso de masa celular seca, normalmente es el 20 - 60 % en su peso de masa celular seca.

15 En diversas realizaciones de la invención la fracción lipídica producida por los estreptomicetos comprende principalmente TAG. Esto significa que al menos el 30 % en peso, en algunas realizaciones al menos el 50 % en peso, en algunas realizaciones distintas al menos el 60 % en peso, todavía en algunas realizaciones adicionales al menos el 70 % en peso, todavía en algunas realizaciones adicionales al menos el 80 % en peso o todavía en algunas realizaciones adicionales al menos el 90 % en peso de la fracción lipídica es TAG.

25 El perfil lipídico característico de una cepa no modificada (cepa parental) o genéticamente modificada cultivada en azúcar puro normalmente comprende de aproximadamente el 70 al 95 % en peso de TAG y aproximadamente el 5 al 30 % en peso de oligómeros, diacilgliceroles y monacilgliceroles y ácidos grasos libres. Los ácidos grasos de cepas de *Streptomyces* no modificadas o genéticamente modificadas comprenden normalmente ácidos grasos de cadena ramificada y recta. La fracción de ácidos grasos ramificados puede estar entre el 20 y el 80 % en peso y normalmente está entre el 40 y el 70 % en peso. El contenido de ácidos grasos metil-ramificados puede estar entre el 45 y el 50 %. La mayoría de los ácidos grasos determinados eran saturados.

30 Además, los lípidos de *Streptomyces* también contienen escualeno o derivados de escualeno normalmente del 2 al 5 % en peso, que pueden usarse como aceites de base o material de partida para aceites de base para aplicaciones de lubricantes.

35 Los perfiles lipídicos de los estreptomicetos se han informado en la bibliografía por Olukoshi y Packter (1994), por Packter y Olukoshi (1995).

La composición del perfil lipídico cambia más probablemente cuando *Streptomyces* se cultiva en un medio que comprende desecho o desechos o residuo o residuos en lugar de azúcar puro, porque la extracción de lípidos puede comprender lípidos del desecho (por ejemplo se extraen fosfolípidos de membrana).

40 “Lípidos” se refiere generalmente en este punto a los lípidos producidos por *Streptomyces* durante el cultivo y a los lípidos contenidos en los componentes del medio de cultivo, en particular el material de desecho o residual en el medio de cultivo. “Una fracción lipídica” se refiere a una fracción de los lípidos, tales como TAG o ácidos grasos ramificados o escualenos.

45 En algunas realizaciones de la invención, los restos celulares e incluso los residuos de algas dan cantidades remarcables de lípidos dominando los TAG. La fuente de nutrientes y/o de C preferida de las algas son *Chlorella* y *Dunaliella*, que dieron la cantidad más alta de TAG en el medio de cultivo gastado.

50 Como se describe en el presente documento, los cultivos en lote prolongados de las cepas de *Streptomyces* en fracciones de desecho (normalmente excediendo 7 días) y en medio basado en ingredientes puros (normalmente excediendo 5 días) resultan en la desaparición de los TAG y algunos otros lípidos, sugiriendo que los lípidos se degradan.

55 En algunas realizaciones de la invención pueden añadirse inhibidores de lipasa al medio de cultivo. Los inhibidores de lipasa adecuados son por ejemplo iones plata (Lee & Lee, 2006) o sustancias catiónicas (Cote y Sharech, 2008). Usando inhibidores de lipasa es posible inhibir la degradación de los lípidos y potenciar la acumulación de TAG. Incluso concentraciones pequeñas de inhibidores, por ejemplo AgNO₃ en concentración de 0,04 a 0,06 g/l, son útiles como se muestra en el Ejemplo 12.

60 En algunas realizaciones de la invención la inoculación del medio de cultivo se lleva a cabo por micelios o esporas de estreptomicetos. En realizaciones preferidas la inoculación se lleva a cabo usando esporas. La cantidad de esporas puede ser 10⁷ - 10⁹ esporas/un litro (por ejemplo 5 x 10¹² esporas/500 litros).

65 En algunas realizaciones de la invención el cultivo puede llevarse a cabo en 1 a 21 días, normalmente en 2 a 14 días, preferentemente en 2 a 6 días. En algunas realizaciones los inhibidores de lipasa pueden añadirse en el medio

(o después del inicio antes del final) del cultivo.

En diversas realizaciones de la invención la temperatura de cultivo es habitualmente de 20 a 36 °C, normalmente es 26-30 °C.

5 El cultivo de estreptomicetos para la producción de lípidos se lleva a cabo habitualmente en diversas realizaciones de la invención en un medio de cultivo líquido en un fermentador preferentemente en aireación y agitación adecuadas. La velocidad de mezclado varía normalmente de 0 a 800 rpm, siendo normalmente 150 - 600 rpm.

10 Ya que los desechos o residuos pueden contener lípidos es racional seguir el uso de los lípidos externos para determinar los lípidos formados por las cepas bacterianas. Como se describe en el presente documento la utilización de lípidos externos se siguió por los cambios en la masa sólida y los cambios en los perfiles lipídicos. Se mostró que la biomasa disminuyó hasta 36-48 horas desde el inicio del cultivo y empezó a aumentar después de eso. El tiempo del ciclo depende del grado de procesamiento del desecho en uso. Sin embargo, no se encontraron diferencias
15 remarcables después de cinco días de cultivo cuando se siguió el cultivo hasta 8 días. Los lípidos fueron detectables en el sobrenadante en la muestra 0 y aumentaron en una fracción sólida hasta 4-5 días. Después de eso los lípidos se redujeron en la fracción celular y una parte de los lípidos se encontró en el sobrenadante y probablemente una parte de los lípidos acumulados se usó para el metabolismo. La Figura 3 demuestra el seguimiento de PMV, la masa celular y los lípidos de las fracciones sólidas y líquidas en un cultivo de 8 días. Puede concluirse que los lípidos
20 detectados después de 3 días derivaron del metabolismo bacteriano.

Los rendimientos de los lípidos ($\frac{\text{g lípidos}}{\text{g glucosa}}$) determinados al azúcar suministrado variaron en el intervalo del 10-55 %. Los rendimientos se determinaron basándose en el azúcar puro suministrado y no considerando el azúcar incluido en los desechos y los residuos. El máximo teórico del rendimiento lipídico a partir de glucosa es el 33 %. Sin
25 embargo en la práctica el rendimiento lipídico máximo es el 20-22 % (Ratledge y Cohen 2008). De esta manera, los rendimientos lipídicos más altos del 22 % indican que se generaron (produjeron) lípidos a partir de los materiales de desecho y residuales.

Cepas de *Streptomyces*

30 Por bacterias *Streptomyces* se entiende en este punto cualquier especie o cepa que pertenezca al género *Streptomyces*.

Las especies preferidas en diversas realizaciones de la invención son especies seleccionadas del grupo que comprende *Streptomyces roseosporus*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces albus*, *Streptomyces peucetius*,
35 *Streptomyces aureofaciens*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces hygrosopicus*, *Streptomyces avermitilis* y *Streptomyces lydicus*. Las especies más preferidas son *Streptomyces roseosporus*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces albus*, *Streptomyces peucetius* y *Streptomyces aureofaciens*.

40 Más específicamente, la cepa de *Streptomyces* puede seleccionarse del grupo que comprende *Streptomyces roseosporus* GAL4111, *Streptomyces roseosporus* G011, *Streptomyces griseus* GAL1005, *Streptomyces albus* GAL1001, *Streptomyces peucetius* D2 GAL4082, *Streptomyces peucetius* P55 GAL4081, *Streptomyces aureofaciens* GAL1004, *Streptomyces lividans* GAL1002, *Streptomyces coelicolor* GAL1003, *Streptomyces hygrosopicus* GAL4051, *Streptomyces avermitilis* GAL1006 y *Streptomyces lydicus* GAL1007. Más preferentemente
45 la cepa se selecciona del grupo que comprende *Streptomyces roseosporus* GAL4111, *Streptomyces griseus* GAL1005, *Streptomyces albus* GAL1001, *Streptomyces peucetius* D2 GAL4082 y *Streptomyces aureofaciens* GAL1004.

Se sabe que diversas especies de estreptomicetos pueden acumular triacilgliceroles (TAG) en pequeñas cantidades:
50 *S. albus* (Álvarez y Steinbüchel, 2002); *S. lividans* (Packter ND Olukoshi, 1995, Álvarez y Steinbüchel, 2002); *S. coelicolor* (Arabolaza *et al.*, 2008, Álvarez y Steinbüchel, 2002); *S. hygrosopicus* (Gesheva *et al.*, 1997); *S. aureofaciens* (Běhal y Jílek, 1969); *S. griseus* (Suutari *et al.*, 1992, Álvarez y Steinbüchel, 2002); *S. avermitilis* (Kaddor *et al.*, 2009; Novák *et al.* 1992); y *S. lydicus* (Nagao *et al.*, 1991). La publicación por Wältermann *et al.* (2006) caracteriza productos génicos implicados en la biosíntesis de lípidos neutros en bacterias. Sin embargo, la
55 producción de lípidos adenso un proceso de fermentación típico de la técnica anterior es relativamente consumidor de energía y por lo tanto caro.

En esta divulgación las bacterias de *Streptomyces* se refieren en particular a cultivos puros de bacterias que pertenecen al género *Streptomyces*. En algunas realizaciones diferentes especies o cepas de *Streptomyces* en
60 combinación pueden cultivarse posteriormente o juntas. Adicionalmente, en la presente divulgación las bacterias de *Streptomyces* se refieren en particular a especies y cepas de *Streptomyces* capaces de producir lípidos de forma natural. En algunas realizaciones de la invención la capacidad de las especies o cepas de *Streptomyces* puede mejorarse introduciendo secuencias de ácidos nucleicos responsables de la producción de lípidos en cepas de *Streptomyces* y expresar estas secuencias de ácidos nucleicos bajo elementos reguladores, tales como un
65 promotor, reconocido por el hospedador *Streptomyces*.

También es posible mejorar las especies o cepas de *Streptomyces* usadas en la producción de lípidos haciendo a las cepas hospedadoras deficientes en la producción de productos bioactivos endógenos, tales como antibióticos lipopeptídicos. Esto puede llevarse a cabo por métodos de biología molecular bien conocidos en la técnica. Los métodos útiles son por ejemplo la delección del gen responsable de producir productos bioactivos o diversos métodos de mutagenización, tales como mutagénesis dirigida al sitio.

“Hacer a un gen deficiente” se refiere bien a una modificación genética del hospedador *Streptomyces* para eliminar o truncar un gen específico o bien una modificación genética del hospedador *Streptomyces* dando como resultado una expresión reducida del gen o actividad reducida del producto génico por cualquier método adecuado. Por “inactivación” se entiende una modificación genética (habitualmente delección) que resulta en la pérdida completa de actividad de un producto génico.

En el contexto del trabajo resultante en la presente invención, se estudiaron 11 cepas de *Streptomyces* para la acumulación de metabolitos incluyendo la fracción lipídica, los triacilglicéridos denominados TAG en el presente documento. Todas las cepas ensayadas acumularon cantidades detectables de TAG y sorprendentemente, cuatro fuera de las 11 cepas de *Streptomyces* ensayadas crecían muy rápido dando una masa celular en húmedo que excedía 200 g/l en dos a tres días (véase la Tabla 1). Estas cepas fueron *Streptomyces aureofaciens* GAL1004, *Streptomyces roseosporus* GAL4111 y el mutante derivado de ella, G011, *Streptomyces griseus* GAL1005 y *Streptomyces albus* GAL1001. Las cepas se cultivaron y analizaron además para la producción de TAG. Además, se verificó la capacidad de las cepas para retener su carácter no productor de metabolitos bioactivos durante el almacenamiento.

Como se describe en el presente documento se cultivaron 11 cepas de *Streptomyces* en condiciones típicas de cultivo para potenciar el crecimiento y también la acumulación de metabolitos secundarios. Los medios usados fueron TSB, 2*TY y E05. Las condiciones de cultivo en un agitador fueron, 28 °C, 30 °C y 34 °C con agitación de 150 y 300 rpm.

El contenido de los medios de cultivo fue:

TSB: 17 g/l de digestión pancreática de caseína, 3 g/l de digestión enzimática de alimento de soja, 2,5 g/l de dextrosa, 5 g/l de cloruro sódico, 2,5 g/l de fosfato dipotásico;
2*TY: 16 g/l de triptona peptona, 10 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de NaCl;
E05: 20 g/l de dextrosa, 20 g/l de almidón, 5 g/l de farmamedia, 2,5 g/l de extracto de levadura, 1 g/l de MgSO₄·7 H₂O, 1 g/l de KH₂PO₄, 3 g/l de CaCO₃, 3 g/l de NaCl.

La **Tabla 1** muestra características de las cepas y los resultados relevantes de los cultivos realizados en medio TSB. Los TAG se estimaron por TLC en placa en comparación con patrón.

Tabla 1.

Código de Galileo	Cepa	Características	Tiempo de crecimiento en días (a partir de la curva de crecimiento)	EI PMV más alto	Masa celular húmeda/seca g/l	TAG (g/l)
GAL1001	<i>S. albus</i>	Ciclo de crecimiento rápido y fácil de cultivar. No productor de metabolitos bioactivos.	2	10	275/42	0,15
GAL1002	<i>S. lividans</i>	Ciclo de crecimiento rápido.	3	8	102/13	0,1
GAL1003	<i>S. coelicolor</i>	Ciclo de crecimiento rápido. Cepa bien conocida.	2	10 3 días	127/14	0,1
GAL4051	<i>S. hygroscopicus</i>	Ciclo de crecimiento rápido.	2	10 3 días	125/13	0,1
GAL1004	<i>S. aureofaciens</i>	Ciclo de crecimiento rápido.	2	16 2 y 3 días	220/46	0,5
GAL1005	<i>S. griseus</i>	Ciclo de crecimiento rápido. Produce compuestos bioactivos de diferentes clases químicas. Cepa bien conocida.	2-3	12 3 días	206/47	0,5

GAL4111	<i>S. roseosporus</i>	Ciclo de crecimiento rápido y fácil de cultivar. Produce lipopéptido cíclico donde la síntesis peptídica podría inactivarse.	1	10	280/40	0,5
GAL1006	<i>S. avermitilis</i>	Ciclo de crecimiento rápido.	2-3	16	210/19	0,1
GAL1007	<i>S. lydicus</i>	Ciclo de crecimiento rápido.	2	10	12/15	0,1
GAL4081	<i>S. peucetius P55</i>	Inactivado en la producción de metabolitos secundarios (antracina)	5	6	114/8	0,1
GAL4082	<i>S. peucetius D2</i>	Inactivado en la producción de metabolitos secundarios (antracina)	2	10	140/18	0,5

Las cepas que son capaces de crecer bien determinado por la masa celular húmeda y/o el valor de PMV y de acumular niveles detectables de lípidos en un tiempo de cultivo corto, son cepas preferibles para el desarrollo adicional que concierne mejora de cepas para la acumulación de lípidos y para el desarrollo de condiciones de fermentación.

Cepas diseñadas por ingeniería genética para la producción potenciada de aceite

La construcción de hospedadores recombinantes (es decir OGM cepas manipuladas genéticamente) que producen lípidos eficientemente se ejemplificó en el presente documento introduciendo genes implicados en la biosíntesis de lípidos en algunos hospedadores de *Streptomyces* que tienen la capacidad de acumular eficazmente los lípidos de forma natural.

Tanto las cepas originales como los clones que llevan los genes implicados en la biosíntesis de lípidos se cultivaron en una gran diversidad de materiales de desecho y residuales incluyendo biodesechos. Inesperadamente, las cepas fueron capaces de crecer y producir fracción lipídica en fracciones de desecho o residuales e incluso sin fuentes de carbono adicionales.

Los cultivos revelaron un tiempo de ciclo de crecimiento rápido: la fase estacionaria se alcanzó en 24 horas o incluso antes con acumulación de lípidos continuada incluso hasta 6 días en lo sucesivo. La masa celular seca/húmeda en el cultivo no aumentó remarcablemente por los clones en comparación con la cepa parental. Sin embargo, se observó un aumento remarcable en la acumulación de lípidos, incluso hasta el 300 % de mejora en comparación con las cepas parentales, en particular en la fracción principal de TAG.

Como se describe en el presente documento los hospedadores estreptomicetos que muestran propiedades adecuadas para procesos de fermentación de bio-combustible industriales útiles pueden mejorarse además por cualquier método de mejora de cepas conocido, tales como selección natural, mutagenización aleatoria y por ingeniería genética.

Los genes adecuados para mejorar la acumulación de lípidos comprenden diversos genes que codifican enzimas implicadas en la biosíntesis de ácidos grasos. Los genes adecuados son en particular el gen que codifica la diacilglicerol aciltransferasa (DGAT) (EC 2.3.1.20) y el gen que codifica la proteína vehículo 3-cetoacil-acil sintasa III (FabH) (EC 2.3.1.41).

Un gen que codifica la función DGAT (EC 2.3.1.20) es, por ejemplo, *sco0958* (SEQ ID NO: 1) y un gen que codifica la proteína vehículo 3-cetoacil-acil sintasa III (FabH) (EC 2.3.1.41) es, por ejemplo, *sco5888* (SEQ ID NO: 2). El gen *sco0958* (ID101096381) cataliza la última etapa en la biosíntesis de TAG (Arabolaza *et al.*, 2008) y *sco5888* (ID101101330) (Li *et al.*, 2005) es responsable de la primera etapa de elongación en la biosíntesis de ácidos grasos. Los genes *sco5888* y *sco0958* se originan de *S. coelicolor*.

Dentro del alcance de la invención están también los homólogos más cercanos de dichos genes *sco0958* y *sco5888* en diversas especies de *Streptomyces*.

Dentro del alcance de protección están también las secuencias de nucleótido que hibridan con al menos uno de dichos genes o dichos homólogos en condiciones de rigurosidad.

Dentro del alcance de la invención están también las secuencias de nucleótido que provocan la misma o una función

equivalente a los productos génicos ID 101096381 o ID 101101330.

5 Dentro del alcance de la presente invención está también una secuencia de nucleótido que codifica una secuencia de aminoácidos que muestra al menos un 60 % de identidad, preferentemente al menos un 65 %, preferentemente al menos un 70 %, preferentemente al menos un 75 %, preferentemente al menos un 80 %, preferentemente al menos un 85 %, más preferentemente al menos un 90 %, aún más preferentemente al menos un 95 %, más preferentemente al menos un 98 % de identidad a las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.

10 Dentro del alcance de la presente invención están las secuencias de nucleótido que provocan la misma función que o función equivalente a dichos genes *sco0958* (ID 101096381) y *sco5888* (ID 101101330). Dichas secuencias de nucleótido pueden ser fragmentos o derivados de dichos genes, los homólogos más cercanos de dichos genes en otras especies de *Streptomyces* o secuencias de nucleótido que hibridan a al menos uno de dichos genes o dichos homólogos.

15 La hibridación se lleva a cabo preferentemente en condiciones de hibridación rigurosas. Las condiciones rigurosas pueden definirse como hibridación a 65 °C en una concentración baja de sal, citrato sódico 1,5 mM, pH 7,0 y NaCl 0,015, de acuerdo con el manual de Boehringer Mannheim, "DIG System User's Guide for Filter hybridization".

20 Es evidente que pequeñas variaciones en la secuencia de nucleótidos de un gen no cambian significativamente las propiedades catalíticas de la proteína codificada. Por ejemplo muchos cambios en la secuencia de nucleótidos no cambian la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada. También una secuencia de aminoácidos puede tener variaciones, que no cambian las propiedades funcionales de una proteína, en particular no evitan que una enzima lleve a cabo su función catalítica. Dichas variaciones en la secuencia de nucleótidos o las moléculas de ADN o en la secuencia de aminoácidos se conocen como "equivalentes funcionales" porque no cambian significativamente la función del gen para codificar una proteína con una función particular, por ejemplo, catalizando una reacción particular o, respectivamente, cambiando la función particular de la proteína. Dentro del alcance de la presente invención están los equivalentes funcionales, incluyendo fragmentos o derivados, o los homólogos más cercanos de la secuencia de nucleótido SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, o de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4, respectivamente.

30 Los *Streptomyces* capaces de producir enzimas implicadas en la biosíntesis lipídica pueden detectarse, la actividad en diversos sustratos puede determinarse y la enzima caracterizarse. Las secuencias de nucleótidos que codifican enzimas implicadas en la biosíntesis de lípidos en diversos organismos pueden aislarse y las secuencias de aminoácidos pueden compararse con las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4. Un experto en la materia también puede identificar una región conservada en la secuencia de nucleótidos o de aminoácidos y clonar un fragmento génico usando técnicas de PCR. Después de secuenciar el fragmento puede obtenerse el gen completo por ejemplo usando una biblioteca de ADNc en un vector. Puede identificarse una secuencia de nucleótidos que codifica la enzima también por hibridación de ácidos nucleicos.

40 Los métodos de biología molecular convencionales pueden usarse en la clonación de los genes, es decir, en el aislamiento y los tratamientos enzimáticos del ADN, en transformaciones en *E. coli*, el aislamiento de un fragmento que comprende el gen por amplificación en una reacción de PCR (Coen D M, 2001) y en las técnicas para el cambio de codones. Los métodos básicos usados se describen en los manuales de biología molecular convencionales, por ejemplo, Sambrook et al. (1989) y Sambrook y Russell (2001). La inserción de la secuencia de nucleótidos bajo un promotor fuerte en un vector de expresión, la transferencia del vector en células hospedadoras adecuadas y el cultivo de las células hospedadoras en condiciones que provocan la producción de dicha enzima. Los métodos para la producción de proteínas por tecnología recombinante en diferentes sistemas hospedadores se conocen bien en la técnica (Gellissen, 2005).

50 Modificar genéticamente un hospedador *Streptomyces* para expresar un gen endógeno o exógeno puede llevarse a cabo por ejemplo introduciendo en un hospedador *Streptomyces* un gen exógeno de otra especie de *Streptomyces* o una copia o copias adicionales de un gen endógeno. El gen puede expresarse bajo un promotor reconocido por el hospedador *Streptomyces*. En algunas realizaciones el gen puede expresarse bajo otro promotor dando como resultado una expresión aumentada del gen. Alternativamente el hospedador *Streptomyces* puede modificarse genéticamente de tal manera que bien el gen se exprese más abundantemente o bien que la actividad del producto génico se aumente.

La frase "gen endógeno" se refiere en este punto a un gen que es natural al hospedador *Streptomyces*.

60 La frase "gen exógeno" se refiere en este punto a un gen que no es natural al hospedador *Streptomyces*.

65 El "homólogo más cercano de un gen de *S. coelicolor*", en otras especies de *Streptomyces* se refiere en este punto a un gen con el porcentaje más alto de nucleótidos idénticos en alineación de secuencias del gen de *S. coelicolor* y los genes de las otras especies, o un gen cuyo producto proteico tiene el porcentaje más alto de aminoácidos idénticos al producto proteico codificado por el gen de *S. coelicolor*". Por "homólogo más cercano" se entiende en particular un gen o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos el 60 %, preferentemente al menos el 80 %, de identidad con el gen de *S. coelicolor*.

preferentemente al menos el 85 %, más preferentemente al menos el 90 %, todavía más preferentemente al menos el 95 %, más y más preferentemente al menos el 98 % de identidad de secuencia de nucleótidos o de aminoácidos en comparación con un gen específico de *S. coelicolor* (SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2) o un producto de dicho gen (SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4).

5 El término "identidad" se refiere a la identidad entre dos secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos, respectivamente comparadas entre sí desde el primer ácido nucleico hasta el último ácido nucleico o desde el primer aminoácido codificado por el gen correspondiente hasta el último aminoácido. La identidad de las secuencias de longitud completa pueden medirse usando el programa de alineación global Needleman-Wunsch en el paquete de programa EMBOSS (European Molecular Biology Open Software Suite; Rice et al., 2000). La versión del programa puede ser 2.9.0 y los parámetros: EMBL62, penalización por hueco 10,0, penalización de extensión 0,5.

10 "Modificación genética" de un hospedador *Streptomyces* significa en este punto cualquier método de modificación genética por el que un hospedador *Streptomyces* se modifica para expresar un gen endógeno o exógeno específico y/o para ser deficiente en un gen o genes específicos.

15 Los métodos de modificación genética para un hospedador *Streptomyces* están disponibles y son bien conocidos por un experto en la materia y se desvelan por ejemplo en Kieser et al., 2000.

20 Como se describe en el presente documento un método adecuado para introducir un gen en un hospedador *Streptomyces* es por ejemplo la transformación de protoplasto.

25 Los vectores para la introducción de las secuencias génicas, normalmente por ejemplo los fragmentos de PCR, en las cepas hospedadoras pueden seleccionarse entre cualquier vector que sea capaz de introducir el fragmento clonado en la cepa hospedadora. Los vectores de integración, el número medio de copias y los vectores de alto y bajo número de copias para introducir los fragmentos en hospedadores adecuados pueden usarse exitosamente.

30 Los vectores adecuados para transferir los fragmentos de ácidos nucleicos en hospedadores *Streptomyces* son por ejemplo pJJE486 (Ylihonko et al., 1996) y pHJL401 (Kieser et al., 2000).

Las cepas hospedadoras más preferidas son cepas de estreptomicetos mostradas en la Tabla 1, en particular las cepas GAL1001 y GAL4111 o cualquier cepa mutante derivada de dichas cepas.

35 Sin embargo, es ventajoso usar cepas mutantes incapaces de acumular compuestos bioactivos en el caldo de cultivo para la producción comercial de bio-combustibles. Para este fin las cepas más preferidas son GAL1001 y G011.

40 Como se describe en el presente documento *S. roseosporus* GAL4111 y un derivado del mismo deficiente en la producción de productos bioactivos endógenos, *S. roseosporus* G011 y GAL1001 se modificaron genéticamente usando genes implicados en la biosíntesis de lípidos.

45 Hay varios genes implicados en el metabolismo lipídico en bacterias. En la presente divulgación se ha demostrado que los genes *sco0958* y *sco5888* bien separadamente o en combinación aumentaron sorprendentemente las cantidades de TAG acumulados por los estreptomicetos. *sco0958* es responsable de la reacción terminal en la biosíntesis de triacilglicérido (TAG) siendo una esterificación de diacilglicerol (DAG) de una molécula de ácido graso (Arabolaza et al., 2003). *sco5888* es proteína vehículo 3-cetoacil acil que codifica la primera etapa de elongación de la biosíntesis de ácidos grasos (Li et al., 2005). Los genes pueden clonarse usando cualquier método de clonación adecuado. De acuerdo con una realización de la invención la clonación se lleva a cabo por PCR a partir del ADN cromosómico usando cebadores homólogos.

50 Los genes se introdujeron en dichas cepas por transformación de protoplasto. Las cepas que llevan estos genes separadamente o en combinación mostraron acumulación aumentada de TAG.

55 Las cepas OGM seleccionadas y designadas G009, G010, G013, G014, G015, G012, G016, G017 y G019 llevan un plásmido intacto que retiene las propiedades de cultivo y la acumulación de lípidos tras varios pasajes.

Las mejores cepas para la acumulación de fracciones lipídicas enriquecidas en TAG fueron los clones derivados de GAL1001, designados G009, G013 y G017.

60 Como se describe en el presente documento los vectores pJJE486 (Ylihonko et al., 1996) y pHJL401 (Kieser et al., 2000) se usaron para introducir los genes *sco0958* y *sco5888* en hospedadores *Streptomyces* GAL1001, GAL4111 y G011. En el Ejemplo 2 la Tabla 3 muestra los códigos usados para las cepas genéticamente modificadas. Todas las cepas produjeron más lípidos en comparación con las cepas parentales. Los cultivos se llevaron a cabo en temperaturas que varían de 20 a 36 °C, variando la agitación de 0 a 800 rpm y pH 5-8,5.

65 Las cepas OGM G009, G010, G013, G014, G015, G012, G016, G017 y G019 con sus cepas parentales, GAL1001,

GAL4111 y G011, como controles se cultivaron en una amplia diversidad de medios de cultivo. El rendimiento lipídico se estimó como $(\frac{g_{\text{lípidos}}}{g_{\text{glucosa}}}) * 100$. Las cepas parentales GAL1001 y G011 produjeron lípidos como se estima por la masa seca de extractos de cloroformo y por análisis de TLC refiriéndose a patrones que son 0,1 - 0,5 g/l del caldo de cultivo, respectivamente. Los extractos de cloroformo de fracciones celulares de los transformantes dieron una masa en el intervalo de 5,9 - 25,2 g/l mientras que el contenido de TAG se estimó como 3 a 23 g/l. La mejor mejora se obtuvo por G009. Sorprendentemente, la fracción lipídica en TLC fue muy similar en todos los transformantes y > 70 % de los lípidos detectables estaba en la fracción TAG.

En los cálculos anteriores el contenido de azúcar se calculó ser 10 g/l en los medios ensayados que contenían 20 g/l de licor destilado de maíz, 10 g/l de Nutrisoy y 10 g/l de jarabe de dextrosa. Los cultivos se llevaron a cabo en matraces durante 5 días a 28 °C, 150 rpm, los lípidos se extrajeron de las células y el sobrenadante separadamente con el mismo volumen de cloroformo-metanol (2:1) agitando durante 1 hora. Se aplicó una muestra de la fracción de cloroformo en la placa de TLC y se evaporó una fracción de cloroformo a sequedad para la determinación de la masa.

Para que la composición lipídica obtenida sea adecuada para el procesamiento adicional en la fabricación de biocombustible, la naturaleza química de estos compuestos es crítica. Aunque diferentes formas de grasas son adecuadas para el procesamiento químico para la producción de biocombustible los compuestos preferidos son los TAG. Hay varios métodos conocidos para caracterizar adicionalmente los metabolitos además de analíticas por TLC (cromatografía en capa fina), por ejemplo GC (cromatografía de gases). El análisis por GC puede llevarse a cabo por un procedimiento convencional (ISO15304). Puede usarse HPLC para determinar el perfil lipídico de glicéridos de las cepas. Por ejemplo, el perfil lipídico característico de una cepa parental (ejemplificado por GAL1001) y de una cepa genéticamente modificada (ejemplificada aquí por G009) se da en la Tabla 2.

Tabla 2. Perfil glicérido de los lípidos como valor en porcentaje derivado de GAL1001 y G009 como se analiza por HPLC.

La naturaleza de los lípidos	GAL1001	G009
TAG	95	88,6
Oligómeros	N.D.	5,2
Diacilgliceroles	N.D.	4,3
Monoacilgliceroles	N.D.	0,3
Ácidos grasos libres	5	1,7
*N.D. = no disponible		

La mayoría de los lípidos en los estreptomicetos consistía en triglicéridos.

Tabla 3. Ejemplos de la distribución de ácidos grasos (% de los ácidos grasos totales) de *S. roseosporus* GAL4111 y *S. albus* GAL1001 como se determina por GC-MS. Las dichas cepas se cultivaron durante 2 días en medio de desecho celular; 10 g/l de CSL y 50 g/l de desecho celular (restos celulares de estreptomicetos) sin suplementos adicionales a 28 °C, 150 rpm.

	GAL4111	GAL1001
n-C10:0	0,02	0,03
n-C10:1	0,01	0,00
iso-C11:0	0,03	0,00
anteiso-C11:0	0,06	0,00
n-C11:0	0,05	0,07
iso-C12:0	0,23	0,28
anteiso-C12:0	0,09	0,09
n-C12:0	0,11	0,12
iso-C13:0	0,25	0,29
anteiso-C13:0	0,45	0,55
n-C13:0	0,15	0,10
n-C13:1	0,00	0,00
iso-C14:0	6,41	7,32
anteiso-C14:0	0,27	0,33

n-C14:0	1,25	1,03
n-C14:1	0,06	0,00
iso-C15:0	3,94	4,34
anteiso-C15:0	13,20	14,66
n-C15:0	N.D.	N.D.
n-C15:1	0,85	0,30
iso-C16:0	16,98	18,65
anteiso-C16:0	0,11	0,13
n-C16:0	14,78	14,30
n-C16:1	4,05	2,79
iso-C17:0	1,40	1,37
anteiso-C17:0	4,67	4,92
n-C17:0	0,61	0,58
n-C17:1	3,40	3,43
iso-C18:0	0,29	0,25
n-C18:0	1,78	1,54
n-C18:1	8,52	8,44
n-C18:2	13,06	11,43
n-C18:3	0,79	0,63
n-C19:1	0,47	0,46
n-C20:0	0,20	0,19
n-C22:0	0,71	0,99
n-C23:0	0,31	0,19
n-C24:0	0,14	0,12
Alcoholes grasos	0,12	0,09
Otros ácidos grasos	0,18	0,00
* N.D. = No disponible		

El aceite de los estreptomicetos estaba saturado y la mayoría de ácidos grasos determinados (~70 %) eran saturados. Además, el aceite de estreptomicetos contenía un contenido significativo de ácidos grasos metilramificados (45 al 50 % en este caso).

5

Tabla 4. Ejemplo de la composición lipídica de *S. roseosporus* GAL4111 y *S. albus* GAL1001 como se determina por GC-MS.

	GAL 4111	GAL1001
Ácidos grasos*	84,8	89,5
Alcoholes grasos	0,3	0,1
Escualenos	4,3	2,5
Otros lípidos	0,2	0,0
Lípidos sin identificar	10,3	7,9
*Los ácidos grasos incluyen los acilgliceroles y los ácidos grasos libres		

10 La mayoría de los lípidos consistía en ácidos grasos (incluido cualquier acilglicerol y ácidos grasos libres). Los lípidos también contenían escualenos (2,5 y 4,3 % de los lípidos totales). Los escualenos en GAL4111 y GAL1001 estaban compuestos por escualeno, tetrahydroescualeno, dihydroescualeno (componentes principales), hexahydroescualeno y octahydroescualeno.

15 De acuerdo con la presente invención, hay varias alternativas para cultivar cepas de *Streptomyces* adecuadas para la acumulación de lípidos. Se probaron diferentes condiciones incluyendo la diversidad de fuentes de carbono y/o de nutrientes y las condiciones de crecimiento.

Para tener un proceso industrialmente factible, las cepas que acumulan lípidos de forma natural, tales como G009, G013 y G017, deben ser adecuadas para la fermentación aeróbica y los procesos de fermentación deben ser rentables. Los costes de los procesos de fermentación se afectan gravemente por los componentes del medio, el consumo de energía, los costes de desecho y la mano de obra.

5 Aunque es posible usar el medio derivado de ingredientes puros y por ejemplo aquellos descritos en el presente documento, TSB, 2*TY y E05, es más rentable seleccionar cualquier fracción de desecho sin separación, hidrólisis y/o purificación de los componentes como materias primas. Los requisitos son que las bacterias en uso sean ricas en enzimas digestivas para facilitar el crecimiento por ingredientes brutos incluidos en los desechos. Por lo tanto, la presente invención contempla además el uso de la fracción de desecho industrial o una combinación de ingredientes puros con el desecho. Como se describe en el presente documento se realizó una serie de ensayos comprensivos con una amplia diversidad de desechos o residuos orgánicos de la industria incluyendo la agricultura, los desechos municipales y los residuos microbianos. Los métodos adecuados para su uso en la presente invención para generar azúcares libres y una fuente de nutriente a utilizarse para crecer a partir de fracciones de desecho son aquellos que se conocen generalmente tales como el uso de enzimas adecuadas para digerir ingredientes brutos. Sin embargo, es preferible el cultivo de bacterias que poseen estas funciones de enzimas digestivas teniendo capacidades para la acumulación de dichos lípidos. Las cepas adecuadas para este fin son en consecuencia las cepas *S. roseosporus* y *S. albus*. Las cepas preferidas son G009, G010, G013, G014, G015, G012, G016, G017 y G019 con sus cepas parentales, GAL1001, GAL4111 y G011.

20 Las cepas implicadas en esta divulgación y preferentemente las cepas G009, G010, G013 y G017 pueden cultivarse en el desecho o desechos o residuo o residuos orgánicos. Los usos de restos celulares derivados por ejemplo del lote anterior son fuentes de nutrientes muy adecuadas para producir lípidos de manera rentable. En estos cultivos los cambios en la masa celular se detectaron disminuir en los primeros dos a tres días aumentando 5-20 g/l en los siguientes tres a cuatro días. La masa seca de extractos de cloroformo derivada de estos cultivos estaba en el intervalo de 7-65 g/l reflejando la cantidad de TAG como 2-23 g/l como se analiza en TLC.

30 Incluso aunque todas estas funciones unitarias y materias primas descritas en las realizaciones de la presente invención, bien solas o en combinación, son efectivas en la producción de aceites para biocombustibles, el proceso preferido usa las cepas G009, G010, G013 o G017. La inoculación se lleva a cabo preferentemente usando esporas. La cantidad de esporas es de forma ventajosa aproximadamente 10^{10} esporas/litro a $5 \cdot 10^{12}$ esporas/500 litros. El cultivo se lleva a cabo preferentemente durante 2 a 6 días. La temperatura del cultivo es aproximadamente 28 °C. El cultivo se lleva a cabo como una fermentación en lote o semi-discontinua. Se usa agitación adecuada durante el cultivo. Adicionalmente se recomienda usar pasteurización del medio en lugar de esterilización para evitar alto consumo de energía. El proceso puede continuarse, por ejemplo, durante 6 días sin ningún suplemento o inhibidor de lipasa, tales como iones plata añadidos a baja concentración el 6^{to} día de cultivo. Al final del cultivo la masa celular se recolecta. Esta es de forma típica aproximadamente 65 kg/500 l de lote. Los lípidos se recuperan de la biomasa celular o del caldo de cultivo por un método adecuado. El rendimiento con extracto basado en disolvente o por dispersión física es normalmente al menos 5 kg de TAG por 1000 litros de medio de cultivo gastado, normalmente 10 a 70 kg de TAG por 1000 litros, de forma habitual aproximadamente 30 kg de TAG a partir de un lote de 1000 l.

Recuperación del aceite

45 En diversas realizaciones de la invención, el aceite, o los precursores para el aceite, pueden recuperarse de la biomasa celular o del caldo de cultivo usando cualquier método conocido en la técnica o desarrollado en el futuro. Por ejemplo, las bacterias pueden separarse del medio usando una filtración o técnicas de decantación. Alternativamente, la centrifugación con centrifugas comerciales a escala industrial de gran capacidad de volumen pueden usarse para separar los productos deseados.

50 En algunas realizaciones de la invención, las células bacterianas pueden romperse para facilitar la separación del aceite y otros componentes. Puede usarse cualquier método conocido para la ruptura celular, tales como someter a ultrasonidos, choque osmótico, fuerza de cizalla mecánica, presión fría, choque térmico, autólisis catalizada por enzimas o auto-dirigida. El aceite puede recuperarse de las células mediante extracción con disolventes orgánicos o por cualquier método conocido en la técnica o desarrollado en el futuro.

60 Las cepas, los métodos, las condiciones de cultivo, los ingredientes para la fermentación y el esquema de proceso desvelado y reivindicado en el presente documento se refieren a tecnología que soporta gran escala y el cultivo económico de bacterias *Streptomyces*. Esta tecnología es útil para soportar la fabricación industrial de los diversos productos relacionados. Esta tecnología puede ser de uso para soportar económicamente el cultivo masivo y la cosecha de los estreptomicetos.

Producción de biocombustible

65 Los lípidos producidos con el método descrito en el presente documento pueden usarse como materia prima de suministro para la producción de biodiesel, diésel renovable, combustible a reacción o gasolina. El biodiesel consiste

en metil ésteres de ácidos grasos y se produce normalmente por transesterificación. En la transesterificación, los acilgliceroles se convierten en alquil (metil, etil o propil) ésteres de ácido graso de cadena larga. El diésel renovable se refiere a combustible que se produce por tratamiento de hidrógeno (hidrogenación o hidroprocesamiento) de lípidos. En el tratamiento de hidrógeno, los acilgliceroles se convierten en alquenos (parafinas) correspondientes.

5 Los alcanos (parafinas) pueden modificarse además por isomerización o por otras alternativas de proceso. El proceso de diésel renovable puede usarse también para producir combustible a reacción y/o gasolina. Además, puede realizarse el craqueo de los lípidos para producir biocombustibles. Además, los lípidos pueden usarse como biocombustibles directamente en ciertas aplicaciones.

10 Los lípidos de *Streptomyces* son beneficiosos para la producción de biocombustible. Los ácidos grasos de *Streptomyces* contienen normalmente ácidos grasos de cadena metil-ramificada, que son beneficiosos para aplicaciones de biocombustible y lubricante. Los ácidos grasos ramificados tienen un intervalo de liquidez más amplio, haciéndolos de interés para aplicaciones a baja temperatura y su baja tensión superficial provoca buena extensibilidad (Gunstone et al. 2007). La ramificación de los ácidos grasos mejora las propiedades en frío de los biocombustibles, tales como el biodiesel o el diésel renovable. El aceite de *Streptomyces* tiene un grado de saturación relativamente alto (contiene altas cantidades de ácidos grasos saturados). Esta propiedad es una ventaja especial para los procesos de diésel renovable, ya que la saturación de los ácidos grasos disminuye la cantidad de hidrógeno necesaria en la hidrogenación. El alto grado de saturación de los lípidos puede mejorar también la estabilidad y la capacidad de almacenamiento del aceite y reducir la necesidad de antioxidantes en el almacenamiento del aceite. Además, las longitudes de la cadena grasa principal son principalmente de C14 (14 carbonos) a C18 (18 carbonos), que es ventajoso para la utilización en aplicaciones de diésel.

25 Los lípidos producidos con el método pueden usarse como aceites base para lubricantes (aceites de lubricación) o como material de partida para la producción de aceites base para lubricantes. El aceite de *Streptomyces* contiene escualeno o derivados del escualeno (Gräfe et al. 1985; Olukoshi y Packter 1994). Especialmente, el escualeno y los derivados del escualeno son adecuados para usos en aplicaciones de lubricante. Sin embargo, pueden usarse igualmente otros lípidos por *Streptomyces* para aplicaciones de lubricante.

30 El biocombustible que comprende la composición lipídica producida de acuerdo con la presente divulgación puede comprender propiedades ventajosas para el uso de biocombustible. Dichas propiedades incluyen por ejemplo ramificación de ácidos grasos que mejora las propiedades en frío. La saturación de los ácidos grasos es ventajosa especialmente para la producción de diésel renovable.

MICROORGANISMOS DEPOSITADOS

35 La cepa *Streptomyces* sp. G011 se depositó bajo el Tratado de Budapest el 15 de diciembre de 2009 en DSMZ-Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH y recibió el número de acceso DSM 23182. El material biológico depositado bajo el número de acceso DSM 23182 en DSMZ-Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH pos Galilaeus Oy de Kairiskulmantie 10, 20781 Kaarina, Finlandia. Galilaeus Oy autoriza que el solicitante se refiera al depósito biológico anteriormente dicho en la presente solicitud y las solicitudes/patentes reivindicando prioridad de esta solicitud y da su consentimiento sin reserva e irrevocable a que el material depositado se haga disponible al público de acuerdo con las leyes nacionales aplicables.

45 Las otras cepas presentadas en el presente documento muestran rasgos idénticos a las cepas disponibles en las colecciones de cultivo comerciales como se muestra en la Tabla 5. Las cepas como se listan en la Tabla 5 se identificaron en primer lugar de acuerdo con sus metabolitos secundarios cuando estaban disponibles, una secuencia parcial del ADNr 16S y por comparación de morfología de colonias. La identidad de secuencia de GAL1001, GAL1002, GAL1003, GAL4051, GAL1004, GAL1005, GAL4111, GAL1006, GAL1007, GAL4081, GAL4082 en el fragmento de ADN de aproximadamente 1,4 kb ha sido >98 % a las secuencias correspondientes de las cepas indicadas en la Tabla 5. Las secuencias usadas en comparación se encuentran en los Bancos Génicos.

La **Tabla 5** muestra la identificación de las cepas

Código Galileo	Cepa	Cepa correspondiente con número de colección	Código génico del ARN ribosómico 16S	Longitud génica del ARN ribosómico 16S
GAL1001	<i>S. albus</i>	DSM 40313	GI:219878476	1499 pb
GAL1002	<i>S. lividans</i>	NRRL B16148	GI:66379295	1449 pb
GAL1003	<i>S. coelicolor</i>	DSM 40233	GI:220961405	1396 pb
GAL4051	<i>S. hygroscopicus</i>	NRLL 5491	G 1:228480526	1385 pb
GAL1004	<i>S. aureofaciens</i>	DSM 40731	G 1:284022440	1402 pb
GAL1005	<i>S. griseus</i>	ATCC 13273	GI:196128028	1428 pb
GAL4111	<i>S. roseosporus</i>	NRRL 11379	GI:195979310	1431 pb

GAL1006	<i>S. avermitilis</i>	NRRL8165	GI:162960844	1529 pb
GAL1007	<i>S. lydicus</i>	ATCC 25470	GI:219846852	1481 pb
GAL4081	<i>S. peucetius P55</i>	Comparable con <i>S. peucetius</i> P55n.ºSnorO; DSM 19075	GI:219857135	1486 pb
GAL4082	<i>S. peucetius D2</i>	*	GI:219857135	1486 pb
* Estudios en una segunda y tercera ciclación de anillo en la biosíntesis de antraciclina. J. Antibiot (Tokio), Feb 2003; 56(2):143-53				

Las cepas se identificaron con secuencias de ADNr 16S obtenidas por PCR usando los cebadores homólogos:

5 UNIfor 5' GGTGGAGCATGTGGTTTA 3' (SEQ ID NO: 5)
 UNIrev 5' CCATTGTAGCACGTGTGT 3' (SEQ ID NO: 6)

Se describen a continuación diversas realizaciones de la invención con la ayuda de las siguientes cláusulas numeradas 1-36:

- 10 1. Un proceso para producir lípidos para biocombustible o lubricante, que comprende:
- cultivar células bacterianas del género *Streptomyces* en un medio que comprende desecho o desechos o residuo o residuos orgánicos o mezclas de los mismos como fuente o fuentes de carbono y/o de nutrientes;
- 15 - recuperar los lípidos de las células o del medio de cultivo,
- usar los lípidos recuperados o una fracción de los mismos como biocombustible o como un material de partida para la producción de biocombustible y/o
- 20 - usar los lípidos recuperados o una fracción de los mismos como lubricante o como un material de partida para la producción de lubricantes.
- 25 2. El proceso de acuerdo con la cláusula 1, en el que el desecho o desechos o residuo o residuos orgánicos comprende o comprenden desecho o desechos o residuo o residuos orgánicos industriales, desecho o desechos o residuo o residuos orgánicos agrícolas, desecho o desechos municipales o desecho o desechos o residuo o residuos microbianos, o cualquier mezcla de los mismos.
- 30 3. El proceso de acuerdo con la cláusula 1 o 2, en el que el medio de cultivo comprende un glicerol fuente de carbono adicional, una fracción de la industria del azúcar o del almidón, jarabe o jarabes de azúcar o almidón o azúcar o azúcares purificados o cualquier mezcla de los mismos.
- 35 4. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 3, en el que la cantidad de triacilgliceroles en el medio de cultivo gastado es al menos 1 g/litro, preferentemente 5 g/litro.
- 40 5. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 4, en el que los lípidos producidos comprenden principalmente triacilgliceroles.
6. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 4, en el que los lípidos producidos se transesterifican para producir biodiesel o se tratan con hidrógeno para producir diésel renovable.
- 45 6. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 5, en el que el medio de cultivo no es estéril.
7. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 6, en el que el medio de cultivo se pasteuriza.
- 50 8. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 7, en el que el medio de cultivo comprende inhibidores de la lipasa.
9. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 8, en el que el cultivo se lleva a cabo como una fermentación en lotes o una semi-discontinua.
10. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 9, en el que la especie de *Streptomyces* se selecciona del grupo de especies que comprenden *Streptomyces roseosporus*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces albus*, *Streptomyces peucetius*, *Streptomyces aureofaciens*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces hygroscopicus*, *Streptomyces avermitilis* y *Streptomyces lydicus*.

- 5 11. El proceso de acuerdo con la cláusula 10, en el que la cepa de *Streptomyces* se selecciona del grupo que comprende cepas de *Streptomyces roseosporus* GAL4111, *Streptomyces roseosporus* G011, *Streptomyces griseus* GAL1005, *Streptomyces albus* GAL1001, *Streptomyces peucetius* D2, GAL4082, *Streptomyces peucetius* P55 GAL4081, *Streptomyces aureofaciens* GAL1004, *Streptomyces lividans* GAL1002, *Streptomyces coelicolor* GAL1003, *Streptomyces hygrosopicus* GAL4051, *Streptomyces avermitilis* GAL1006 y *Streptomyces lydicus* GAL1007.
- 10 12. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 11, en el que el hospedador *Streptomyces* está genéticamente modificado para expresar un gen endógeno o exógeno que codifica DGAT (EC 2.3.1.20) y/o proteína vehículo 3-cetoacil-acil sintasa III (EC: 2.3.1.41).
- 15 13. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 12, en el que el hospedador *Streptomyces* está genéticamente modificado para expresar uno o más genes seleccionados del grupo que comprende
- (a) *sco0958* (SEQ ID NO: 1) y/o *sco5888* (SEQ ID NO: 2);
- (b) el homólogo más cercano de dichos genes en una especie de *Streptomyces*;
- 20 (c) una secuencia de nucleótidos que hibrida a al menos uno de dichos genes o dichos homólogos a 65 °C en citrato sódico 1,5 mM, pH 7,0 y NaCl 0,015;
- (d) una secuencia de nucleótidos que provoca la misma o una función equivalente que la que tienen los productos génicos ID 101096381 o ID 101101330;
- 25 (e) una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que muestra al menos un 60 % de identidad a SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.
- 30 14. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 13, en el que el hospedador *Streptomyces* se ha hecho deficiente en la producción de metabolitos bioactivos, tales como agentes antibióticos.
15. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 14, en el que la cepa de *Streptomyces* se selecciona del grupo que comprende G009, G010, G013, G014, G015, G012, G016, G017 y G019.
- 35 16. Un cultivo de *Streptomyces* para la producción de lípidos, que comprende
- (a) una población de bacterias del género *Streptomyces*; y
- (b) un medio de cultivo que comprende desecho o desechos o residuo o residuos orgánicos o mezclas de los mismos como fuente o fuentes de carbono y/o nutrientes.
- 40 17. El cultivo de acuerdo con la cláusula 16, en el que la cantidad de triacilglicerol en el medio de cultivo gastado es al menos 1 g/litro, preferentemente 5 g/litro.
- 45 18. El proceso de acuerdo con la cláusula 16 o 17, en el que la fracción lipídica producida comprende principalmente triacilglicerol.
19. El cultivo de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 16 a 18, en el que el medio de cultivo comprende inhibidores de la lipasa.
- 50 20. El cultivo de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 16 a 19, en el que el medio de cultivo no es estéril o está pasteurizado.
- 55 21. El cultivo de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 16 a 20, en el que la especie de *Streptomyces* se selecciona del grupo de especies que comprenden *Streptomyces roseosporus*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces albus*, *Streptomyces peucetius*, *Streptomyces aureofaciens*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces hygrosopicus*, *Streptomyces avermitilis* y *Streptomyces lydicus*.
- 60 22. El cultivo de acuerdo con la cláusula 21, en el que la cepa de *Streptomyces* se selecciona del grupo que comprende cepas de *Streptomyces roseosporus* GAL4111, *Streptomyces roseosporus* G011, *Streptomyces griseus* GAL1005, *Streptomyces albus* GAL1001, *Streptomyces peucetius* D2, GAL4082, *Streptomyces peucetius* P55 GAL4081, *Streptomyces aureofaciens* GAL1004, *Streptomyces lividans* GAL1002, *Streptomyces coelicolor* GAL1003, *Streptomyces hygrosopicus* GAL4051, *Streptomyces avermitilis* GAL1006 y *Streptomyces lydicus* GAL1007.
- 65 23. El cultivo de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 16 a 22, en el que el hospedador *Streptomyces*

ES 2 685 502 T3

está genéticamente modificado para expresar al menos un gen de la ruta de síntesis lipídica.

24. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 16 a 23, en el que el hospedador *Streptomyces* está genéticamente modificado para expresar un gen endógeno o exógeno que codifica DGAT (EC 2.3.1.20) y/o proteína vehículo 3-cetoacil-acil sintasa III (EC: 2.3.1.41).

25. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 16 a 24, en el que el hospedador *Streptomyces* está genéticamente modificado para expresar uno o más genes seleccionados del grupo que comprende

(a) sco0958 (SEQ ID NO: 1) y/o sco5888 (SEQ ID NO: 2);

(b) el homólogo más cercano de dichos genes en una especie de *Streptomyces*;

(c) una secuencia de nucleótidos que hibrida a al menos uno de dichos genes o dichos homólogos a 65 °C en citrato sódico 1,5 mM, pH 7,0 y NaCl 0,015;

(d) una secuencia de nucleótidos que provoca la misma o una función equivalente que la que tienen los productos génicos ID 101096381 o ID 101101330;

(e) una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que muestra al menos un 60 % de identidad a SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.

26. El cultivo de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 16 a 25, en el que el hospedador *Streptomyces* se ha hecho deficiente en la producción de metabolitos bioactivos, tales como agentes antibióticos.

27. El cultivo de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 16 a 26, en el que la cepa de *Streptomyces* se selecciona del grupo que comprende G009, G010, G013, G014, G015, G012, G016, G017 y G019.

28. Un hospedador *Streptomyces* genéticamente modificado para expresar un gen endógeno o exógeno que codifica actividad DGAT (EC 2.3.1.20) y/o proteína vehículo 3-cetoacil-acil sintasa III (EC: 2.3.1.41), o una secuencia de nucleótidos que provoca la misma o una función equivalente que la que tienen los productos génicos ID 101096381 o ID 101101330.

29. El hospedador de acuerdo con la cláusula 28, en el que la célula hospedadora se selecciona del grupo de especies que comprende *Streptomyces roseosporus*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces albus*, *Streptomyces peucetius*, *Streptomyces aureofaciens*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces hygroscopicus*, *Streptomyces avermitilis* y *Streptomyces lydicus*, preferentemente seleccionada del grupo de especies que comprenden *Streptomyces roseosporus* y *Streptomyces albus*.

30. El hospedador de acuerdo con la cláusula 28 o 29, en el que el hospedador está genéticamente modificado para expresar uno o más genes seleccionados del grupo que comprende

(a) sco0958 (SEQ ID NO: 1) y/o sco5888 (SEQ ID NO: 2);

(b) el homólogo más cercano de dichos genes en una especie de *Streptomyces*;

(c) una secuencia de nucleótidos que hibrida a al menos uno de dichos genes o dichos homólogos a 65 °C en citrato sódico 1,5 mM, pH 7,0 y NaCl 0,015;

(d) una secuencia de nucleótidos que provoca la misma o una función equivalente que la que tienen los productos génicos ID 101096381 o ID 101101330;

(e) una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que muestra al menos un 60 % de identidad a SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.

31. El hospedador de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 28 a 30, en el que la cepa se selecciona del grupo que comprende las cepas G009, G010, G013, G014, G015, G012, G016, G017 y G019.

32. Una composición lipídica producida de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 15.

33. Uso de los lípidos o la composición lipídica producida por células bacterianas del género *Streptomyces*, o una fracción de los lípidos o la composición lipídica como biocombustible y/o lubricante, o como material de partida para la producción de biocombustible y/o lubricante.

34. Uso de los lípidos o la composición lipídica producida por células bacterianas del género *Streptomyces* para la producción de biodiesel o diésel renovable.

35. Biocombustible que comprende los lípidos o la composición lipídica producida de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 15, o una fracción de los lípidos o la composición lipídica, y opcionalmente aditivos adecuados para el uso de biocombustible.

5 36. Biocombustible que comprende los lípidos o la composición lipídica producida de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 15, o una fracción de los lípidos o la composición lipídica, y opcionalmente aditivos adecuados para el uso de lubricante.

10 Ejemplos

Los siguientes métodos para el análisis se usaron en los experimentos implicados en los Ejemplos si no se indica de otra manera en el texto.

15 Métodos:

Detección de la masa celular húmeda: La masa celular húmeda se midió tomando 10 ml de muestra de caldo de cultivo a un tubo Falcon tarado y se centrifugó durante 10 minutos a 4000 rpm. Después de la centrifugación el sobrenadante se descartó y se pesó el tubo Falcon para obtener la masa de la fracción celular. La masa celular se dio como gramos por 1 litro del caldo de cultivo.

20 **Detección de la masa celular seca:** La masa celular húmeda se secó a 70 °C durante dos días después de los que se determinó la masa pesando. La masa celular se dio como gramos por 1 litro del caldo de cultivo.

25 **Detección del PMV:** El volumen de los micelios empaquetados se midió tomando 10 ml del caldo de cultivo y se centrifugó durante 10 minutos a 4000 rpm después de lo que se midió el volumen de la fase celular como cifra en %.

Análisis visual del cultivo: Los cultivos bacterianos se analizaron visualmente por colonias separadas en placa de agar, estudiando cultivos líquidos y por análisis microscópico.

30 **Análisis por TLC:** 5 µl de extracto de cloroformo concentrado diez veces se pipeteó en una placa de TLC (gel de sílice 60 F254 Merck 1,05729) y se ejecutó en hexano:éter dietílico:ácido acético (80:20:2). Los lípidos se colorearon con yodo después de la ejecución o se quemaron a carbón. La quema de lípidos se realizó sumergiendo la placa en H₂SO₄ al 50 % y calentando la placa 1 hora a 180 °C. Se usaron colesterol (C), octadecanato de colesterol (COD), ácido decanoico, trimiristato de glicerilo (GTM) y L-α-fosfatidiletanolamina como patrones en la TLC. Los lípidos se detectaron visualmente en placas de TLC como manchas amarillas (yodo) o negras (carbón).

35 **Análisis de las manchas de TLC:** Los lípidos se detectaron visualmente en placas de TLC como manchas amarillas (yodo) o negras (carbón). Más claramente las manchas coloreadas de yodo se vieron en la luz UV. Las manchas de muestra se compararon con los patrones para estimar las cantidades en g/l. Los valores (-, +/-, +, ++, +++ o 0-3) se dieron basándose en la intensidad de las manchas si se realizó comparación entre las muestras en el mismo ensayo de ejecución.

40 Además los valores en g/l de los TAG se estimaron por análisis de imágenes usando el programa Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>). La curva patrón se preparó usando la escala de concentración de 1 g/l hasta 40 g/l y el título de los lípidos en el caldo de cultivo se midió contra la curva patrón.

45 **Extracción de muestras:** El caldo de cultivo entero (cultivos de fase sólida) o los micelios separados se extrajeron con un volumen igual de cloroformo-metanol (Clf-MeOH; 2:1). Los tubos se incubaron en un agitador a TA durante 1 hora. Después de la centrifugación la muestra se tomó del extracto y se analizó por TLC y/o por GC.

50 **Detección del peso de extracción seco:** El peso de extracto seco se determinó secando 1-5 ml de extracto a TA durante un día en aire soplado después de lo que se determinó la masa pesando. La masa se dio como gramos por 1 litro del caldo de cultivo.

55 Ejemplo 1. Detección de estreptomicetos para la acumulación de lípidos

Las especies de *Streptomyces* de la colección de cultivo local (Tabla 1) se ensayaron para el crecimiento en condiciones de cultivo convencionales para elucidar el tiempo de ciclo, la masa celular y la acumulación de lípidos. Las cepas se cultivaron en caldo típico en caldo de triptófano soja TSB (Difco) durante dos a tres días en un agitador (100-300 rpm, 26-34 °C). Las siguientes cepas se encontraron dar una alta masa celular y acumulación de lípidos en cantidades remarcables en las condiciones de cultivo convencionales: GAL4111 (*Streptomyces roseosporus*), GAL1005 (*Streptomyces griseus*), GAL1001 (*Streptomyces albus*) y GAL4082 (*Streptomyces peucetius* D2).

65 Se usó una alícuota de la suspensión de esporas en un bucle de micelios de cada cepa para inocular 50 ml de medio TSB en un matraz Erlenmeyer de 250 ml. La incubación con agitación se dejó continuar durante tres días y se

tomó una muestra de 10 ml en cada día de cultivo, por ejemplo, en intervalos de 24 horas. Se analizaron las siguientes características: determinación de la masa celular húmeda y seca, PMV, seguimiento de pH y análisis visual por muestreo para definir el ciclo celular, extracción de la fracción de lípidos en cloroformo y análisis por TLC de los extractos de cloroformo.

5

Condiciones de cultivo típicas:

Temperatura: 22-36 °C

pH: 5,0-8,5

10

agitación: 100-300 rpm (tanda de 1,905-2,54 cm)

forma de inóculo: micelios vegetativos, micelios del sustrato, esporas

tasa de transferencia: 0,5 – 50 %

medio convencional en uso: TSB, 2*YT, E05

15

TSB es Caldo de triptona soja de Difco que contiene 17 g/l de digestión pancreática de caseína, 3 g/l de digestión enzimática de alimento de soja, 2,5 g/l de dextrosa, 5 g/l de cloruro sódico, 2,5 g/l de fosfato dipotásico; 2*TY contiene 16 g/l de triptona peptona, 10 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de NaCl y E05 contiene los siguientes ingredientes: 20 g/l de dextrosa, 20 g/l de almidón, 5 g/l de farmamedia, 2,5 g/l de extracto de levadura, 1 g/l de MgSO₄·7 H₂O, 1 g/l de KH₂PO₄, 3 g/l de CaCO₃, 3 g/l de NaCl.

20

Características del cultivo de *Streptomyces*:

Tiempo para el crecimiento exponencial: 12-64 h

Tiempo para acumular lípidos: 24-64 h

La fracción principal de lípidos: TAG

25

El contenido de TAG en la fracción de metabolitos como se estima por TLC: 20-80 %

El contenido de aceite en el extracto como se mide por GC es el 25-80 %, el contenido de TAG es el 50-95 % en la fracción oleaginoso

La masa del extracto de cloroformo: > 10 g/l del caldo de cultivo

La fracción de TAG del extracto de cloroformo: 10-80 %

30

Masa celular húmeda: > 100 g/l

Masa celular seca: > 8 g/l

El intervalo del PMV: 6-16 %

Aumento de TAG (cantidad más alta – muestra cero) por Image J: 3 g/l (tiempo para el valor más alto 3 días)

35

Ejemplo 2. Construcción de cepas genéticamente modificadas

Se usaron dos cepas, GAL4111 y GAL1001, como los hospedadores de la ingeniería genética aunque los mismos métodos son útiles para GAL1005 y GAL4082 y para varios estreptomicetos distintos. Además, se generó un mutante GAL4111 bloqueado en la producción de daptomicina para evitar la producción de antibióticos en los cultivos y se designó G011. De forma interesante, todas las demás propiedades de cultivo de G011 fueron las mismas encontradas en GAL4111 excepto la carencia de acumulación de antibióticos de lipopéptido en cantidades detectables en G011. G011 acumula TAG y los otros lípidos en cantidades similares en las mismas condiciones de cultivo que GAL4111.

40

45

Si se hace referencia a los métodos convencionales en la construcción de cepas genéticamente modificadas, éstos se encuentran en *Streptomyces manual* por Kieser *et al.*, 2000 para estreptomicetos y en Sambrook y Russell, 2001 para *E. coli*.

Construcciones de plásmidos:

50

Los genes que están implicados en la biosíntesis de ácidos grasos denominados *sco0958* y *sco5888* se clonaron a partir del ADN genómico de *S. coelicolor* en el vector pJJE486 para dar pJJE_{sco0958} y pJJE_{sco5888}, respectivamente. Usando los mismos sitios de restricción los genes se clonaron en un vector de bajo número de copias pHJL401 para dar pHJL_{sco0958} y pHJL_{sco5888}, respectivamente. Los genes se combinaron también en la misma construcción para dar pJJE_{sco5888+0958} y pHJL_{sco0958+5888}, respectivamente. Los genes *sco5888* y *sco0958* se obtuvieron por PCR usando los cebadores homólogos:

55

Sco5888for 5' ATT TCTAGA AAA CCG TCC ATC ACG CGA G 3' (SEQ ID NO:7)

Xba1

Sco5888rev 5' ATT AAGCTT ACTAGT ATG GTC GTC CTT GGT
TCA TC 3'

HindIII Spel

(SEQ ID NO:8)

y

Sco0958for 5' ATT TCTAGA ACTAGT GAT CGT ACT TGA CCG
TAA TC 3'

Xba1 Spel

(SEQ ID NO:9)

Sco0958rev 5' ATT AAGCTT GCTAGC CGA ACA GCG GAT TTT
ATT CAG 3'

HindIII NheI

(SEQ ID NO:10)

5 Los fragmentos obtenidos por PCR se clonaron en el vector pJJE486 usando los sitios de restricción correspondientes. Para la introducción de ADN en las cepas GAL4111 y GAL1001, se usó la transformación de protoplasto. Se usó un método de transformación convencional asistido por PEG. Las mezclas de transformación se colocaron en laca en placas R2YE y se incubaron a 30 °C. Después de la incubación durante toda la noche se extendieron 20 µg/ml de tioestreptona en agua para la selección de cepas que contienen el plásmido. La incubación se continuó durante 3-5 días después de lo que los transformantes se recogieron de las placas.

10 Los fragmentos descritos anteriormente se ligaron y se clonaron en *E. coli* por un procedimiento convencional para transferirlos a las especies de *Streptomyces*.

15 Los productos de PCR se verificaron por secuenciación. Los plásmidos de los transformantes se aislaron y se digirieron para verificar el plásmido transformado.

Las siguientes cepas genéticamente modificadas se crearon y se ensayaron para la acumulación aumentada de lípidos como se muestra en la Tabla 6.

20

Tabla 6. La designación de los clones usados en la presente invención.

Código	Plásmido	Cepa hospedadora
G009	pJEsco0958	GAL1001
G010	pJEsco0958	GAL4111
G013	pJEsco5888	GAL1001
G014	pJEsco5888	GAL4111
G015	pJEsco5888+0958	GAL4111
G012	pJEsco0958	G011
G016	pHJLsco5888	GAL1001
G017	pHJLsco0958+5888	GAL1001
G019	pHJLsco5888	G011

pJE486 es un plásmido de alto número de copias que se replica en estreptomicetos (Ylihonko *et al.*, 1996)
 pHJL401 es un plásmido de bajo número de copias que se replica en estreptomicetos (Kieser *et al.*, 1996)

Ejemplo 3. Cultivo a pequeña escala de estreptomicetos OGM para la acumulación de lípidos

5 Las cepas G009, G010, G012, G013, G013, G014, G015, G016, G017 y G019 se cultivaron en las condiciones como se describe anteriormente. Las cepas hospedadoras, G011, GAL4111 y GAL1001 se usaron como controles en los cultivos.

Condiciones de cultivo típicas:

- 10 Temperatura: 22-36 °C
- pH: 5,0-8,5
- agitación: 0-330 rpm
- forma de inóculo: micelios vegetativos, micelios del sustrato, esporas
- tasa de transferencia: 0,5 – 50 %
- 15 medio en uso: TSB, E05 como se da en el Ejemplo 1 y diferentes clases de medios de desecho o residuales como se describe en el ejemplo 4.

20 La acumulación de TAG se comparó con aquella del tipo silvestre, GAL1001 y GAL4111 por análisis de TLC. La Figura 5 demuestra un ejemplo de la acumulación de TAG en diferentes medios por las cepas G017, G016, G013 y G011. Hubo un aumento claro en la acumulación de lípidos y especialmente TAG en las cepas OGM que llevan el gen sco0958 y un aumento en aquellos clones (cepas) que llevan sco5888 en diferentes vectores plasmídicos. Los resultados se dan aquí:

Tabla 7. La designación de las cepas OGM usadas.

Código	Aumento o disminución del % de masa celular (peso húmedo)	Fracción de TAG por TLC (g/l)	Mejora -% de TAG en comparación con el parental.
G009	-1 %	29	300
G010	-25 %	18	50
G013	-77 %	11	300
G014	+14%	20	11
G015	+12 %	25	100
G011	+16 %	1	0
G012	-26 %	12	30
G016	-45 %	24	230
G017	+13 %	20	300
G019	+ 121 %	17	40

25

Ejemplo 4. Contenido del caldo de cultivo: uso del desecho para el crecimiento

30 Para potenciar el crecimiento máximo y la acumulación de TAG en condiciones de cultivo económicas, de bajo coste, se usaron varios desechos y/o fracciones como fuentes de carbono y/o de nutrientes en los cultivos. Sorprendentemente, todos los estreptomicetos ensayados de acuerdo con el Ejemplo 1 y el Ejemplo 2 fueron capaces de crecer y acumular lípidos en un gran espectro de desechos. Las fracciones de desechos se ensayaron solas y con azúcar y en combinación con otros nutrientes. Las siguientes fracciones de desecho en la Tabla 8 se usaron exitosamente como se indicará por el crecimiento celular y la acumulación de TAG. Los siguientes datos derivaron de cultivos de G009 en cada desecho no hidrolizado (despolimerizado) (50 g/l) + jarabe de dextrosa (DX75) (10 g/l).

35

Tabla 8. La designación de los materiales principalmente desechos o residuos usados en la presente invención como fuentes de carbono y/o de nutrientes y su influencia en el crecimiento y acumulación de TAG.

Material	Crecimiento en UFC (UFC/ml)	Acumulación de lípidos (aumento en %) en comparación con el cultivo en TSB
Salvado y barcia	10 ⁴	+140
Soja	10 ⁷	+100
Licor destilado de maíz (CSL)	10 ⁶	+150

Jarabe de dextrosa	10 ⁶	ND
Jarabe de almidón	ND	ND
Desecho celular bacteriano (lípidos extraídos)	10 ⁷	+94
Melazas	10 ³	+120
Pasta	10 ⁴	+115
Lodo	10 ³	+20
Suministro OVR	< 10	ND
Farmamedia	10 ⁴	+120
Bagazo	10 ²	ND
Paja	ND	+50
Alimentación de visón	ND	+10
Menudencias	10 ³	+10
Huesos	10 ⁵	+20
Desechos orgánicos (bio desechos) vegetales	10 ⁷	+150
Desechos orgánicos de jardín	10 ⁴	+146
Desechos orgánicos de panadería	10 ⁷	+139
Biomasa de algas	10 ⁷	+203
* Estimado a partir de muestra de 5 días – muestra de 2 días		

Ejemplo 5. Fermentaciones de las cepas seleccionadas en las condiciones controladas

5 Las cepas GAL1001, GAL4111, G009 y G010 se cultivaron en las condiciones de fermentación controlada en el siguiente intervalo:

- 10 Temperatura: 22-36 °C
- pH: 5,0-8,5
- agitación: velocidad de la punta de 0 – 4 m/s
- 10 aireación: 0-2 vvm
- forma de inóculo: micelios vegetativos, micelios del sustrato, esporas
- pasajes: 0-2 siembras
- tasa de transferencia: 0,5 – 50 %
- 15 volumen: 1,5 l de volumen de trabajo
- Medio básico: TSB, 2*YT, E05 (el contenido de estos medios se da en el Ejemplo 1 y varios medios de desecho como se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Medios de desecho o residuales usados en la fermentación.

CSL, 30 g/l; Jarabe de dextrosa 10 g/l
CSL, 5-20 g/l; Carne 15-20 g/l
CSL, 5-20 g/l; salvado de avena 15-20 g/l
CSL, 15 g/l; jarabe de dextrosa 10 g/l
CSL 30 g/l y menudencias (clase 2) 30 g/l
CSL, 10 g/l; desecho celular 50 g/l
CSL, 10 g/l; jarabe de dextrosa 10 g/l; Desecho celular 50 g/l
Jarabe de dextrosa 10 g/l; desecho celular 50 g/l
CSL 20 g/l, Soja 20 g/l, jarabe de dextrosa 10 g/l
Jarabe de glucosa 20 g/l, almidón o paja o bagazo 20 g/l, bio desecho 2,5-50 g/l, algas 50 g/l, MgSO ₄ ·7 H ₂ O 1 g/l, KH ₂ PO ₄ 1 g/l, CaCO ₃ 3 g/l.

20 Características del cultivo de *Streptomyces*:

- Tiempo para el crecimiento exponencial: 12-64 h
- Tiempo para acumular lípidos: 24-64 h
- La fracción principal de lípidos basada en TLC: TAG
- 25 El contenido de TAG en la fracción de metabolitos como se estima por TLC: >8 g/l
- La masa del extracto de cloroformo: > 15 g/l del caldo de cultivo
- La fracción de TAG del extracto de cloroformo: 10-80 %
- Masa celular húmeda: > 200 g/l
- Masa celular seca: > 20 g/l

El intervalo del % de PMV: 10-40

Aumento de TAG (cantidad más alta – muestra cero) por Image J: 4 g/l (tiempo para el valor más alto 6 días)

Ejemplo 6a. Fermentación en lotes de la cepa G009

5 La dicha cepa se cultivó a los volúmenes de fermentación de 1,5, 20 y en 500 litros. El siguiente procedimiento da información detallada del proceso de fermentación fácilmente repetible.

Inoculación: esporas o un tapón de cultivo en placa de agar

10 Tasa de transferencia: 4 %

Etapas de siembra: 2

Temperatura: 28 °C

Aireación: 0,5 vvm

15 Agitación: 100-280 rpm

Presión de vuelta: 50 kPa (0,5 bar)

pH antes de la esterilización: 7

Tiempo de ciclo: 96 horas

Estado estacionario alcanzado: 24 horas (la DO es 0 después de 24 horas de cultivo)

20 Medio de cultivo: varios medios de desecho y/o residuales como se da en el Ejemplo 5, E05, los ingredientes del medio E05 básico se dan aquí y los materiales que pueden usarse para reemplazarlos (Tabla 10).

Tabla 10. Los ingredientes que se usan para reemplazar materiales del medio E05 básico

Ingrediente	Reemplazable	g/l
Dextrosa	Jarabe (5-20 g/l)	20,00
Almidón	Bagazo o paja	20,00
Farmamedia	Bio desecho* (2,5-50 g/l), restos de algas** (2,5-100 g/l), restos de células bacterianas*** (50-200 g/l)	5,00
Extracto de levadura		2,50
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	Esencial	1,00
KH ₂ PO ₄	No esencial	1,00
CaCO ₃	No esencial	3,00
NaCl	No esencial	3,00
* = desecho compostable como doméstico, de panadería, de jardín, vegetales, cervecería (por ejemplo, masa), menudencias o mezclas de éstos; composiciones varias ** = <i>Phaeodactylum</i> , <i>Chlorella</i> y <i>Dunaliella</i> *** = cualquier masa celular, por ejemplo lactobacilos y estreptomicetos		

25 Masa celular (húmeda): 348 g/l

PMV: 30 %

Extracto de cloroformo seco: 28 g/l

TAG obtenidos basándose en TLC: 23 g/l

TAG en extracto de cloroformo: 82 %

30 Relación de azúcar suministrado convertido en TAG: de 40 g/l a 23 g/l = 57,5 % (azúcar adicional del desecho) (el rendimiento se calculó basándose en azúcar puro (dextrosa y almidón) añadido solamente). El máximo teórico es el 33 %. El rendimiento más alto que el máximo teórico significa que los lípidos se producen a partir de azúcares incluidos en los materiales de desecho.

Aumento de TAG (cantidad más alta – muestra cero) por Image J: 10,2 g/l (tiempo para el valor más alto 6 días)

35 **Ejemplo 6b. Fermentación en lotes de la cepa GAL1001**

La dicha cepa se cultivó a los volúmenes de fermentación de 1,5, 20 l y en 500 l. El procedimiento explicado dado en el ejemplo 6a da información detallada del proceso de fermentación fácilmente repetible.

40 Las cifras indicativas de cultivos:

Masa celular (húmeda): 267 g/l

PMV: 25 %

45 Extracto de cloroformo seco: 10 g/l

TAG obtenidos: 5 g/l

Relación de azúcar suministrado convertido en TAG: de 40 g/l a 5 g/l = 12,5 %

Aumento de TAG (cantidad más alta – muestra cero) por Image J: 2,1 g/l (tiempo para el valor más alto 3 días)

Ejemplo 7. Fermentación semi-discontinua de la cepa G009

La dicha cepa se cultivó a los volúmenes de fermentación de 1,5, 20 y en 500 litros. Los parámetros son como se describe en el Ejemplo 6a. El suministro de dextrosa empezó después de 1-2 días de cultivo, cuando se consumió principalmente la glucosa primaria y se continuó hasta el final del cultivo. La cantidad de azúcar suministrado es 40 g/l como un total de manera que la cantidad total de azúcar añadido al caldo de cultivo fue 60 g/l.

Los resultados por un litro del caldo de cultivo obtenido en fermentaciones de 4 días:

- Masa celular (húmeda): 356 g/l
- PMV: 36 %
- Extracto de cloroformo seco: 14 g/l
- TAG obtenidos: 6 g/l

Relación de azúcar suministrado convertido en TAG: de 60 g/l a 6 g/l = 10 % Aumento de TAG (cantidad más alta – muestra cero) por Image J: 3,6 g/l (tiempo para el valor más alto 3 días)

Los ejemplos indican que el cultivo semi-discontinuo puede usarse en la producción de lípidos por *Streptomyces*.

Ejemplo 8. Combinación de diferentes desechos en el caldo; algas y biodesechos

La cepa G009 se cultivó en las condiciones controladas en un caldo hecho combinando diferentes tipos de desechos y en los siguientes parámetros:

- Temperatura: 28 °C
- pH: 7 al inicio del cultivo
- agitación: 300 rpm
- aireación: 0,5 vvm
- forma de inóculo: micelios vegetativos, micelios del sustrato, esporas
- pasajes: 2
- tasa de transferencia: 2 %
- volumen: 1,5 l de volumen de trabajo

Tabla 11. Desechos y/o residuos usados en la fermentación.

Biodesecho (panadería y vegetales (50:50)), contenido no definido; 10 g/l
Algas (<i>Dunaliella</i>) 50 g/l
Fuente de azúcar principal: bagazo
Azúcar (total) 40 g/l (jarabe de glucosa y almidón/bagazo/paja)

Características del cultivo de G009:

- Tiempo para el crecimiento exponencial: 97 h
- Tiempo para acumular lípidos: 144 h
- La fracción principal de lípidos: TAG
- El contenido de TAG en la fracción de metabolitos como se estima por TLC: > 70 % La Figura 4 demuestra la acumulación de TAG en diferentes medios por G009.
- La masa del extracto de cloroformo: > 22 g/l del caldo de cultivo
- La fracción de TAG del extracto de cloroformo: 68,9 %
- TAG como se determina por Image J: 15,3 g/l
- PMV: 39 %
- Rendimiento lipídico (azúcar puro suministrado total sin desechos): 55 %
- Masa celular seca: > 20 g/l
- Aumento de TAG (cantidad más alta – muestra cero) por Image J: 4,6 g/l (tiempo para el valor más alto 3 días)

El ejemplo indica que pueden proporcionarse diversos desechos y residuos como mezclas en la producción de lípidos por *Streptomyces*. El rendimiento lipídico excedió el valor teórico del 33 % indicando que los azúcares se usan a partir de los desechos.

Ejemplo 9. Reúso de cultivos bacterianos de los que se han extraído los lípidos como fuente de nutrientes en la fermentación

Las cepas G016, G013 y G009 se cultivaron en las condiciones controladas en una fermentación en lotes de 1,5 litros. Las células se cosecharon por filtración y se extrajeron por el volumen igual de cloroformo (1:1). Después de

eso los restos celulares que quedan se secaron adicionalmente para retirar los residuos de cloroformo a 60 °C durante 10 min para suministrarse al medio de fermentación con o sin fuentes de azúcar adicionales, tales como 10 g/l de jarabe de dextrosa.

- 5 Temperatura: 22-36 °C
 pH: 5,0-8,5
 agitación: velocidad de la punta de 0 – 4 m/s
 aireación: 0-2 vvm
 forma de inóculo: micelios vegetativos, micelios del sustrato, esporas
 10 pasajes: 0-2 siembras
 tasa de transferencia: 0,5 – 50 %
 volumen: 0,05-1,5 l de volumen de trabajo

Características del cultivo G016:

- 15 Tiempo para el crecimiento exponencial: 20-144 h
 PMV: 33 %
 Tiempo para acumular lípidos: hasta 72 h
 La fracción principal de lípidos: TAG
 20 El contenido de TAG en la fracción de metabolitos como se estima por TLC: > 80 %
 La masa del extracto de cloroformo: > 27,4 g/l
 TAG calculados a partir de la cantidad de cloroformo en el extracto: 14 g/l
 Rendimiento lipídico (a partir del azúcar puro suministrado total sin desechos): 51 %
 Aumento de TAG (cantidad más alta – muestra cero) por Image J: 1,6 g/l (tiempo para el valor más alto 3 días)

25 Características del cultivo G013:

- Tiempo para el crecimiento exponencial: 20-144 h
 PMV: 33 %
 30 Tiempo para acumular lípidos: hasta 144 h
 La fracción principal de lípidos: TAG
 El contenido de TAG en la fracción de metabolitos como se estima por TLC: > 80 %
 La masa del extracto de cloroformo: > 20,5 g/l
 TAG calculados a partir de la cantidad de cloroformo en el extracto: 10 g/l
 35 Rendimiento lipídico (a partir del azúcar puro suministrado total sin desechos): 49 %
 Aumento de TAG (cantidad más alta – muestra cero) por Image J: 2,6 g/l (tiempo para el valor más alto 3 días)

Características del cultivo G009:

- 40 Tiempo para el crecimiento exponencial: 6-50 h
 PMV: 20 %
 Tiempo para acumular lípidos: hasta 48 h
 La fracción principal de lípidos: TAG
 El contenido de TAG en la fracción de metabolitos como se estima por TLC: > 90 %
 45 La masa del extracto de cloroformo: > 14 g/l
 TAG calculados a partir de la cantidad de cloroformo en el extracto: 7,0 g/l
 Rendimiento lipídico (a partir del azúcar puro suministrado total sin desechos): 50 %
 Aumento de TAG (cantidad más alta – muestra cero) por Image J: 3 g/l (tiempo para el valor más alto 3 días)

- 50 El ejemplo indica que las células de *Streptomyces* a las que se les ha extraído los lípidos pueden re-usarse como una fuente de nutrientes en la producción de lípidos por *Streptomyces*.

Ejemplo 10. Pasteurización de los medios

- 55 En paralelo al esquema de fermentación típico, se llevó a cabo el cultivo sin esterilización de los caldos usados. La esterilización a 121 °C durante 20 minutos se reemplazó calentando hasta 60 °C 10-30 min y 75 °C durante 2-10 minutos tanto de los caldos de siembra como de producción. Los cultivos se estudiaron diariamente por microscopio y colocando en placa una muestra de 100 µl en placas de TSA (agar de triptona soja) permitiendo el crecimiento de un gran espectro de microbios. Normalmente no se encontraron contaminaciones en los cultivos incluso con el tiempo de calentamiento más corto y los cultivos fueron similares a los cultivos paralelos en medios estériles.

- 65 Inoculación: esporas o un tapón de cultivo en placa de agar
 Tasa de transferencia: 4 %
 Etapas de siembra: 2
 Temperatura: 28 °C
 Aireación: 1 vvm

Agitación: velocidad de la punta 1,3 m/s
 Presión de vuelta: 50 kPa (0,5 bar)
 pH antes de la esterilización: 7
 Tiempo de ciclo: 96 horas

5 Estado estacionario alcanzado: 24 horas
 Medio de cultivo: varios medios de desecho como se da en el Ejemplo 5, E05, 20 g/l de menudencias + 20 g/l de jarabe de dextrosa.

Resultados:

10 Masa celular (húmeda): 178 g/l
 PMV: 16 %
 Tiempo para acumular lípidos: hasta 72 h
 La masa del extracto de cloroformo: 9 g/l
 15 TAG obtenidos (estimados por TLC): 5 g/l
 Tiempo para acumular lípidos: hasta 96 horas
 La fracción principal de lípidos: TAG
 El contenido de TAG en la fracción de metabolitos como se estima por TLC: > 90 %
 20 Aumento de TAG (cantidad más alta – muestra cero) por Image J: 1,8 g/l (tiempo para el valor más alto 6 días)

Los resultados indican que la esterilización del medio puede reemplazarse por la pasteurización del medio para la producción de lípidos por *Streptomyces*.

Ejemplo 11. Determinación del crecimiento celular para la lisis

25 En las condiciones de cultivo descritas en los Ejemplos 1-7 anteriores, el estado estacionario se alcanzó normalmente en 10-48 horas de incubación. La fase estacionaria continúa durante aproximadamente 48-72 horas después de las que tuvo lugar la lisis celular. Los TAG desaparecen en el cultivo prolongado. Solamente fueron detectables cantidades minoritarias de TAG - si había - en TLC en las muestras derivadas de caldos de cultivo de 7
 30 días. Los lípidos y especialmente los TAG disminuyeron gradualmente alrededor del 4º día de cultivo como se detectó por TLC. La lisis celular puede haber liberado la acción de las lipasas dando como resultado la hidrólisis de TAG como se vio en los experimentos de cultivo. Por lo tanto, la fermentación se detuvo antes de la autólisis o se añadió un inhibidor de las lipasas al caldo de cultivo.

Ejemplo 12. Prevención de la degradación de TAG

35 Las esporas de la cepa G009 se cultivaron en el medio que contenía las siguientes materias primas en 1 l de agua del grifo, pH 7: Dextrosa 75 20 g, Bagazo 20 g, Biodesechos de panadería y jardín (1:1) 5 o 10 g, Algas 25 a 50 g, MgSO₄·7 H₂O 1 g, KH₂PO₄ 1 g y CaCO₃ 3 g. Las condiciones de cultivo fueron 28 °C, 300 rpm durante 11 días.
 40 Después de 6 días de cultivos, 0,05 g/l de AgNO₃ o 0,4 % de solución de TritonX100 que contiene 0,05 g/l de CaCO₃. Los matraces sin los dichos suplementos se consideraron controles para el estudio de tratamiento de inhibición de la lipasa. El cultivo se continuó en las mismas condiciones durante 5 días más.

45 Las muestras se tomaron después de 7, 8 y 11 días de cultivos de acuerdo con los protocolos de muestreo generales usados en la presente invención y los resultados del muestreo se muestran en este punto. Los cultivos paralelos se realizaron con dos concentraciones tanto de desechos de algas como de biodesechos y la fila superior de cada condición de ensayo dio un resultado con concentración más alta de ambas fracciones de desecho.

Tabla 10. Los resultados del ensayo de inhibición de lipasa

Los suplementos	Peso del extracto de cloroformo (g/l)			Cantidad de TAG g/l por Image J		
	7 días	11 días		7 días	8 días	11 días
No; control	7,6	6,1		5	4,9	0,5
AgNO ₃	7,7	8,5		4,8	4,8	4,8
TritonX100 + CaCO ₃	10,3	10,1		5	5	4,9

50 El efecto de los inhibidores de lipasa se vio bien en la masa de los lípidos (extracto de cloroformo) que fue ligeramente en aumento o estable. Se observó la diferencia remarcable en los cambios de la cantidad de TAG en comparación con el control.

Ejemplo 13. Caracterizaciones de las cepas OGM

La caracterización de las cepas se llevó a cabo por los estudios en la morfología de las colonias, el tiempo de ciclo y la producción de metabolitos.

Los productos de PCR usados para construir cepas OGM se verificaron por secuenciación. Los plásmidos de las cepas se aislaron y digirieron para verificar los plásmidos transformados.

5 Las características de las cepas en placas de agar ISP4 e ISP2 en cultivos sumergidos en TSB y en E05 con variantes de desecho se dan aquí.

10 **G009** es la cepa *Streptomyces albus* GAL1001 que lleva pJEsco0958 y designada clon 2. No produce cantidades detectables de metabolitos bioactivos y como GAL1001 se sugiere que está bloqueada en la biosíntesis de metabolitos secundarios debido a una mutación aleatoria. Morfología de colonias: En agar ISP4 G009 forma esporas con pigmento blanco mientras que en el lado inverso de la placa de agar, las colonias son marrones rodeadas por una fina zona clara. En un agar rico, ISP2, las colonias G009 forman micelios de sustrato amarillos e hifas aéreas amarillentas. Las esporas de pigmento blanco son ligeramente visibles. La morfología típica en cultivo sumergido es gránulos o micelios dispersados. La cepa forma esporas también en cultivos sumergidos por ejemplo en TSB y en E05. Las características relevantes de acuerdo con la presente divulgación son masa celular aumentada en comparación con la cepa parental y la acumulación de TAG en diversas condiciones de cultivo hasta 30 g/l. Las características de la cepa son estables en pasajes hasta 20 veces probadas hasta el momento.

20 **G013** es una cepa *Streptomyces albus* GAL1001 que lleva pJEsco5888. No produce cantidades detectables de metabolitos bioactivos y como GAL1001 se sugiere que está bloqueada en la biosíntesis de metabolitos secundarios debido a una mutación aleatoria. La morfología de las colonias en cultivos sólidos y sumergidos es muy similar a aquella descrita para G009 aunque el crecimiento no es tan bueno como el encontrado para G009. El tamaño de colonias es de alguna manera más pequeño que el encontrado en los cultivos de G009 en agar sólido. La característica relevante de acuerdo con la presente divulgación es la acumulación de TAG en diversas condiciones de cultivo hasta 11 g/l.

25 **G016** es una cepa *Streptomyces albus* GAL1001 que lleva pHJLsco5888. No produce cantidades detectables de metabolitos bioactivos y como GAL1001 se sugiere que está bloqueada en la biosíntesis de metabolitos secundarios debido a una mutación aleatoria. La morfología de las colonias en cultivos sólidos y sumergidos es muy similar a aquella descrita para G009 aunque el crecimiento no es tan bueno como el encontrado para G009 pero ligeramente mejor que el encontrado para G013. La característica relevante de acuerdo con la presente divulgación es la acumulación de TAG en diversas condiciones de cultivo hasta 24 g/l.

30 **G011** es un mutante de GAL4111 y no produce cantidades detectables de metabolitos bioactivos característico a su cepa parental. GAL4111 se ha identificado ser *Streptomyces roseosporus* basándose en los patrones idénticos de la secuencia de ADN, las características de las colonias y la capacidad de producir pequeñas cantidades, algunos miligramos por litro de análogos de Daptomicina. Morfología de colonias: en agar ISP4 G011 forma esporas con pigmento blanco/rojo mientras que en el lado inverso de la placa de agar, los micelios de sustratos son de rojizos a marrones y es visible una fina zona transparente alrededor de estas colonias rojas/marrones indicando una actividad amilasa. En un agar rico, ISP2, las colonias de G011 son marrones, se ve esporulación ligera con pigmento blanco/rojo. Los micelios de sustrato en ISP2 son ligeramente rojos con hifas aéreas marrónáceas. En cultivos sumergidos proporciona gránulos rojizos o micelios dispersados. La cepa forma esporas también en cultivos sumergidos por ejemplo en TSB y en E05. Las características relevantes de acuerdo con esta divulgación son masa celular aumentada en comparación con la cepa parental y la acumulación de TAG 1 g/l.

40 **G012** es una cepa de *Streptomyces roseosporus* G011 que lleva pJEsco0958 y no produce cantidades detectables de metabolitos bioactivos como su cepa parental G011. La morfología de las colonias es idéntica a aquella descrita para G011. El crecimiento no es, sin embargo, tan bueno como se encuentra para G011. El tamaño de colonias es de alguna manera más pequeño que el encontrado en cultivos de G011 en agar sólido mientras que las colonias no podrían distinguirse basándose en eso. La característica relevante de acuerdo con la presente divulgación es la acumulación de TAG 12 g/l.

45 **G017** es una cepa de *Streptomyces roseosporus* G011 que lleva pHJLsco0958+5888 y no produce cantidades detectables de metabolitos bioactivos como su cepa parental G011. La morfología de las colonias es idéntica a aquella descrita para G011. El crecimiento es muy similar al que se encuentra para G011. Las características relevantes de acuerdo con la presente divulgación son la masa celular aumentada en comparación con la cepa parental y la acumulación de TAG 20 g/l.

50 **G019** es una cepa de *Streptomyces roseosporus* G011 que lleva pHJLsco5888 y no produce cantidades detectables de metabolitos bioactivos similar a su cepa parental G011. La morfología de las colonias es idéntica a aquella descrita para G011. El crecimiento es muy similar al que se encuentra para G011. Las características relevantes de acuerdo con la presente divulgación son la masa celular aumentada en comparación con la cepa control GAL4111 y la acumulación de TAG 17 g/l.

60 **G010** es una cepa de *Streptomyces roseosporus* GAL4111 que lleva pJEsco0958 y no produce cantidades detectables de metabolitos bioactivos a diferencia de su cepa parental GAL4111. La morfología de las colonias es idéntica a aquella descrita para G011. El crecimiento no es, sin embargo, tan bueno como se encuentra para G011.

65

La característica relevante de acuerdo con la presente divulgación es la acumulación de TAG 18 g/l.

G014 es una cepa de *Streptomyces roseosporus* GAL4111 que lleva pJEsco5888 y no produce cantidades detectables de metabolitos bioactivos a diferencia de su cepa parental GAL4111. La morfología de las colonias es idéntica a aquella descrita para G011. El crecimiento es muy similar a aquel encontrado para G011. Las características relevantes de acuerdo con la presente divulgación son masa celular aumentada en comparación con la cepa parental GAL4111 y la acumulación de TAG 20 g/l como G017.

G015 es una cepa de *Streptomyces roseosporus* GAL4111 que lleva pJEsco5888+0958 y no produce cantidades detectables de metabolitos bioactivos a diferencia de su cepa parental GAL4111. La morfología de las colonias es idéntica a aquella descrita para G011. La tasa de crecimiento es muy similar a aquella encontrada para G011. Las características relevantes de acuerdo con la presente divulgación son masa celular aumentada en comparación con la cepa parental GAL4111 y la acumulación de TAG 25 g/l.

LISTADO DE REFERENCIAS

Álvarez, H.M., Steinbüchel A. (2002) Triacylglycerols in Prokaryotic microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 60: 367-376.

Arabolaza, A, Rodríguez, E, Altabe, S, Álvarez, H y Gramajo, H (2008) Multiple pathways for triacylglycerol biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*. *Appl Env Microb* 79: 2573-2582.

Běhal, V, Jílek, M. (1969) Regulation of biosynthesis of secondary metabolites. VII. Dynamics of fatty acid content during fermentation in *Streptomyces aureofaciens*. *Folia Microbiol (Praha)* 14:211-4.

Campbell, M. N. (2008) Algae as a Renewable Source for Liquid Fuel; Biodiesel: Algae as a Renewable Source for Liquid Fuel. *Guelph Engineering Journal*, (1), 2 - 7. 1916-1107.

Coen, D.M. 2001 The polymerase Chain reaction, published in Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, More D, Seidman J G, Smith K. y Struhl K (eds.) *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons. Inc., Hoboken, USA.)

Cole, A, Shareck, F. (2008), Cloning, purification and characterization of two lipases from *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Enzyme and microbial technology* 42: 381 - 388.

Gellissen, G., (ed). (2005). *Production of recombinant proteins. Novel microbial and eukaryotic expression systems*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. Weinheim, Alemania.

Gesheva, V., Rachev, R., Bojkova, S. (1997) Fatty acid composition of *Streptomyces hygroscopicus* strains producing antibiotics *Lett Appl Microbiol* 24: 109-112.

Gráfe, U., Reinhardt, G., Hänel, F., Schade, W., Gumpert, J. (1985). Occurrence of squalene and dehydrosqualene in streptomycetes. *J. Basic Microbiol.* 25(8):503-507

Gunstone, F.D., Harwood, J.L., Dijkstra, A.J. (eds) (2007) *The lipid handbook*, 3rd edn. CRC Press, Boca Ratón.

Kaddor, C., Biermann, K., Kalscheuer, R., Steinbüchel, Al. (2009) Analysis of neutral lipid biosynthesis in *Streptomyces avermitilis* MA-4680 and characterization of an acyltransferase involved herein. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Volumen 84, Número 1, Agosto 2009, pp. 143-155.

Kieser, T., Bibb, M.J., Buttner, M.J., Chater, K.F., Hopwood, D. A. (2000) *Growth and preservation of Streptomyces*. In *Practical Streptomyces genetics*, The John Innes Foundation.

Le, S.Y., Lee, B.H. (2006). Esterolytic and Lipolytic Activities of *Lactobacillus Casei-subsp-Casei* LLG. *Journal of Food Science* 55: 119 - 122.

Li, Y., Florova, G., Reynolds, A. (2005). Alteration of the fatty acid profile of *Streptomyces coelicolor* by replacement of the initiation enzyme 3-ketoacyl acyl carrier protein synthase III (FabH). *J Bacteriology* 187: 3795-3799.

Meng, X., Yang, J., Xu, X., Zhang, L., Nie, Q., Xian, M. (2009). Biodiesel production from oleaginous microorganisms, *Renew. Energ.* 34:1-5.

Nagao, A, Ishida, N. y Terao, J. (1991) Synthesis of 6-phosphatidyl-L-ascorbic acid by phospholipase D. *Lipids* 26: 390-394.

- Novák, J., Hájek, P., Rezanka, T., and Vanék, Z. (1992) Nitrogen regulation of fatty acids and avermectins biosynthesis in *Streptomyces avermitilis*. *FEMS Microbiol Lett.*72(1):57-61.
- 5 Olukoshi, E.R., Packter, N.M. (1994). Importance of stored triacylglycerols in *Streptomyces*: possible carbon source for antibiotics. *Microbiology* 140:931-943
- Packter, N. M. y Olukoshi, E. R. (1995) Ultrastructural studies of neutral lipid localisation in *Streptomyces*. *Arch Microbiol* 164: 420-427.
- 10 Ratledge, C., Cohen, Z. 2008. Microbial and algal oils: Do they have a future for biodiesel or as commodity oils. *Lipid Technology* 20:155-160.
- Ratledge, C., Seekstra, H., Cohen, Z., Fichtali, J. 2005. Down-stream processing, extraction, and purification of single cell oils. In *Single Cell Oils*. Cohen Z, Ratledge C (eds). AOCS Press, Champaign, IL, U.S. 202-219.
- 15 Rice, P., Longden, I. y Bleasby, A. (2000) EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite, *Trends Genet*, 16, 276-277.
- Soror, S.H., Verma, V., Rao, R., Rasool, S., Koul, S., Qazi, G.N., Cullum J. 2007. A cold-active esterase of *Streptomyces coelicolor* A3(2): from genome sequence to enzyme activity *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 34:525-531.
- 20 Strobel, G. A., Knighton, B. Kluck, K., Ren, Y., Livinghouse, T., Griffin M, Spakowicz, D. y Sears, J. (2008) The production of myco-diesel hydrocarbons and their derivatives by the endophytic fungus *Gliocladium roseum* (NRRL 50072). *Microbiology* **154** (2008), 3319-3328; DOI 10.1099/mic.0.2008/022186-0.
- 25 Suutari, M. y Laakso, S. (1992) Changes in fatty acid branching and unsaturation of *Streptomyces griseus* and *Brevibacterium fermentans* as a response to growth temperature. *Appl Env Microb* 58: 2338-2340.
- 30 Wältermann, M., Stöveken, T y Steinbüchel. A. (2007). Key enzymes for biosynthesis of neutral lipid storage compounds in prokaryotes: Properties, function and occurrence of wax ester synthases/acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferases. *Biochimie* 89: 230-242.
- 35 Ylihonko, K, Tuikkanen, J, Jussila, S, Cong, L y Mäntsälä, P (1996) A gene cluster involved in nogalamycin biosynthesis from *Streptomyces nogalater*. sequence analysis and complementation of early-block mutations in the anthracycline pathway. *Mol Gen Genet* 251:113-120.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 40 <110> Neste Oil Oyj
- <120> Proceso y microorganismos para la producción de lípidos
- <130> BP201627
- 45 <160> 10
- <170> PatentIn versión 3.3
- 50 <210> 1
- <211> 1860
- <212> ADN
- <213> *Streptomyces coelicolor*
- 55 <220>
- <221> gen
- <222> (1)..(1860)
- 60 <400> 1

ES 2 685 502 T3

gtgcggtaga tgtgcgaggt ggcccggcgg accgcgatcg cgtcgggggtg gtcgacgtcc 60
 agctcgtcga gttccttcag tacgtcgagg cagagcgcca gccgttcggg gtcgataaccg 120
 gggccgtacg cggacgccgc cacctcgtcc gtggtcgccg caccgtcctg tgtcaccgtc 180
 atcgccgctg ccgttcctg gtcaccgtcg cggcgctccg ggaggcgacc gctgtcgaac 240
 agcggatattt attcagcgcg cggcgtggat ccaaaccgc cggggtcagg gacggcacgc 300
 cgtgagcaac gtctccacct cctcggccac cgccacggcg agccggtcga ggtccggcac 360
 cgccttcgcg tcggcgagca ggccgtagtg gacccgcccg cggtacgtcg agacggccac 420
 cgccagggag tggccgcggg ccagcggggc cagtggatag acctcggatga gcggggtgcc 480
 gcccagccgc agcccaggc tgggcagggg gacgctggtg accaggaggt cgaaccagag 540
 ccgggcggcc ccggagacca gtggcccgc gagccggtg ccgagcgccg ggacgtggtc 600
 ggcgagcagg gcgacggctc cggcgccgcg tccgggcccg gcgtccttgt tgcgggtccat 660
 ggcggcgcg accgtgccga ggcgggcgag cgggtcgggg tcgccgaccg gaagcctcat 720
 caggtacccg gagagccggt ttccctgggg gtgcgcgctg cgcgggcggc gcctggagac 780
 ggggatcagg gcccgggcg cgacgccctc gctgccgtcg ccgcttcgt ccagccagcg 840
 gcgcagggcg cccgcgacga ccgcgatcag tacgtcgttg acggtgccgc cgggtgtctt 900
 gcggacgtgg tgcacgtcgt cgaggtcgac ggacaccccc gcggtccggc ggggtcccga 960
 ggacgcggcg gtgagcgcg gcgaggaacg cacgtcgagg gtggacaacg ccgcggcggc 1020
 accgatgtcc agggcgcgcc cggcgtcggg cagggcgccg cgcagccggt cgggcagggc 1080
 gcgcacgtcc ggcaggagtc cgcgcggcgg ctgctcgggg cggggccggg gtgccggcag 1140
 gtccatcggg tccaggacac ccgcggccag cgtcagggcg cgcagaccgt cggccagggc 1200
 gtggtggaac ttgaacagca cggcgaagga cccgccgtcc gcgcccggca gcacgtgcgc 1260
 ctcccacggc ggccgtccgc gttccagggg gcgttccatc aggcgcccgg cccgggcgtg 1320
 gaagtccgtg gccggggcgt gcagccgcac gtggtcgagc gggtcgaagc gggggtcggg 1380
 ctgcgggtc gcgccgccga acgcgaacgg ccggcgcagg gccatcggcg gctgccaggt 1440
 gtcccggatc ctcatccga gtccgggcac cgcggggcg cgggccgca gcaggtccgc 1500
 cgcgagcgcg cccgcggtgg gcgagtcggc ctcgaagacg ccgagcgcg ccaggtgcat 1560
 ggggtgctcg gcggactcga tgttccagaa cgccaggtcg aggggagcga gcggatcggg 1620
 agtcaagggc ttgcctcga aggacgacgc atgggcggtg gatggacaac ggggtggaca 1680
 gcagtcaatc gctctccgac gattacggtc aagtacgatc acgctacgca cagttaacaa 1740
 gagattaa gttcccggc tttcgacagg ggcgggactg ctgtgactca tggggcgcct 1800
 gtgctcgcgt cggctcaggt cagcggcggc ggcaccgcct ctgtcccgtt accccacccg 1860

5 <210> 2
 <211> 1380
 <212> ADN
 <213> *Streptomyces coelicolor*

ES 2 685 502 T3

<220>
 <221> gen
 <222> (1)..(1380)

5 <400> 2

cagtgagccg	tcagcgcgcc	gtcagggggc	ccggccagac	tcggtgcggc	cgggggggccc	60
ggattcactc	cccacacctg	ccggccggca	aaccgtccat	cacgcgagga	gcacacacgt	120
ggtttccccg	ctccgccgcc	gcaccaggcc	caccgcacac	cgcgcccgct	ccgcgggcgg	180
tgcccgggtg	cccgggcgtc	cgtgctgacc	ggcctcggtt	cctgtctgcc	gtcccgggtg	240
gtcaccaacg	cggagctgga	gcggacgatg	gacacctcgg	acgagtggat	ccggggcccgt	300
acggggatcg	cccagcgcta	cgtggccgaa	gagggcacc	tcacctccga	cctggcggtg	360
ggcgcggccg	agcgggact	gaagtccgcc	cgcttgacac	cggacgagat	cgacgcggtc	420
atcgtggcca	ccaccactcc	ggaccggccc	tgcccggcga	ccgcgccgac	ggtggcggcc	480
cggtcgggca	ccggcccggg	cccggcggtc	gacgtgtccg	cggtgtgctc	cggttcctc	540
tacggactcg	ccacggggtc	cggtctgatc	gcgtccggag	cggcggaacg	ggtcctggtc	600
atcggtgccg	agaccttctc	ccgcctcctc	aaccgcagg	accgctccac	ctcggtgatc	660
ttcggtgacg	gcgccggcgc	cgctcgtctg	cgccggggcg	agccggggga	gaccggtgcc	720
ctcggcccgc	tgccggctgg	cagcgacggc	accggcgtgg	acctgatcac	cgtgccggcc	780
ggcggaccgc	cgccggccgg	cgccggccga	ccggacgatc	tcgccgaccg	ctacttcacc	840
atggaggggca	agcgggtctt	ctggctcgcc	gtccagcgca	tgggcgagtg	cgccggagagc	900
gtgctcgacc	ggcggggtg	gcgggtggcg	gacgtggact	ggctggtcag	ccaccaggcc	960
aaccaccgca	tcaccgccc	gctcgcggac	gagatcggca	tccccgcga	gcgcagcgtc	1020
agcaacatcg	ccgaggtggg	caacaccgcc	gccgcctcca	tccccctcgc	gctcgaccac	1080
gcgcacgccc	ggggcaccct	ccggcccggc	gaccgggtgc	tcctcaccgc	cttcggcggc	1140
ggcctcacct	ggggtgccgc	cgccctgacc	tgcccggccg	tcgatccggt	ctgagggcgg	1200
ccggccgggc	ccggccgaag	cgccgcgaga	cgaccgatga	accaaggacg	accatgactc	1260
ctcggaaact	gatcaccgac	tacatcgccg	acgcctggat	ggcggcgac	gccgaaggcc	1320
tggagccgga	cacccccatc	gcggagctga	acatcatcga	ctccgccgcc	atcttcgacc	1380

10 <210> 3
 <211> 446
 <212> PRT
 <213> *Streptomyces coelicolor*

15 <400> 3

ES 2 685 502 T3

Met Thr Pro Asp Pro Leu Ala Pro Leu Asp Leu Ala Phe Trp Asn Ile
 1 5 10 15

Glu Ser Ala Glu His Pro Met His Leu Gly Ala Leu Gly Val Phe Glu
 20 25 30

Ala Asp Ser Pro Thr Ala Gly Ala Leu Ala Ala Asp Leu Leu Ala Ala
 35 40 45

Arg Ala Pro Ala Val Pro Gly Leu Arg Met Arg Ile Arg Asp Thr Trp
 50 55 60

Gln Pro Pro Met Ala Leu Arg Arg Pro Phe Ala Phe Gly Gly Ala Thr
 65 70 75 80

Arg Glu Pro Asp Pro Arg Phe Asp Pro Leu Asp His Val Arg Leu His
 85 90 95

Ala Pro Ala Thr Asp Phe His Ala Arg Ala Gly Arg Leu Met Glu Arg
 100 105 110

Pro Leu Glu Arg Gly Arg Pro Pro Trp Glu Ala His Val Leu Pro Gly
 115 120 125

Ala Asp Gly Gly Ser Phe Ala Val Leu Phe Lys Phe His His Ala Leu
 130 135 140

Ala Asp Gly Leu Arg Ala Leu Thr Leu Ala Ala Gly Val Leu Asp Pro
 145 150 155 160

Met Asp Leu Pro Ala Pro Arg Pro Arg Pro Glu Gln Pro Pro Arg Gly
 165 170 175

Leu Leu Pro Asp Val Arg Ala Leu Pro Asp Arg Leu Arg Gly Ala Leu
 180 185 190

Ser Asp Ala Gly Arg Ala Leu Asp Ile Gly Ala Ala Ala Ala Leu Ser
 195 200 205

Thr Leu Asp Val Arg Ser Ser Pro Ala Leu Thr Ala Ala Ser Ser Gly

ES 2 685 502 T3

	210					215						220				
	Thr	Arg	Arg	Thr	Ala	Gly	Val	Ser	Val	Asp	Leu	Asp	Asp	Val	His	His
	225					230					235					240
	Val	Arg	Lys	Thr	Thr	Gly	Gly	Thr	Val	Asn	Asp	Val	Leu	Ile	Ala	Val
					245					250					255	
	Val	Ala	Gly	Ala	Leu	Arg	Arg	Trp	Leu	Asp	Glu	Arg	Gly	Asp	Gly	Ser
				260					265					270		
	Glu	Gly	Val	Ala	Pro	Arg	Ala	Leu	Ile	Pro	Val	Ser	Arg	Arg	Arg	Pro
			275					280					285			
	Arg	Ser	Ala	His	Pro	Gln	Gly	Asn	Arg	Leu	Ser	Gly	Tyr	Leu	Met	Arg
		290					295					300				
	Leu	Pro	Val	Gly	Asp	Pro	Asp	Pro	Leu	Ala	Arg	Leu	Gly	Thr	Val	Arg
	305					310					315					320
	Ala	Ala	Met	Asp	Arg	Asn	Lys	Asp	Ala	Gly	Pro	Gly	Arg	Gly	Ala	Gly
					325					330					335	
	Ala	Val	Ala	Leu	Leu	Ala	Asp	His	Val	Pro	Ala	Leu	Gly	His	Arg	Leu
				340					345					350		
	Gly	Gly	Pro	Leu	Val	Ser	Gly	Ala	Ala	Arg	Leu	Trp	Phe	Asp	Leu	Leu
			355					360					365			
	Val	Thr	Ser	Val	Pro	Leu	Pro	Ser	Leu	Gly	Leu	Arg	Leu	Gly	Gly	His
		370					375					380				
	Pro	Leu	Thr	Glu	Val	Tyr	Pro	Leu	Ala	Pro	Leu	Ala	Arg	Gly	His	Ser
	385					390					395					400
	Leu	Ala	Val	Ala	Val	Ser	Thr	Tyr	Arg	Gly	Arg	Val	His	Tyr	Gly	Leu
					405					410					415	
	Leu	Ala	Asp	Ala	Lys	Ala	Val	Pro	Asp	Leu	Asp	Arg	Leu	Ala	Val	Ala
				420					425					430		
	Val	Ala	Glu	Glu	Val	Glu	Thr	Leu	Leu	Thr	Ala	Cys	Arg	Pro		
			435					440					445			

<210> 4
 <211> 335
 <212> PRT
 <213> *Streptomyces coelicolor*

<400> 4

10	Met	Thr	Arg	Ala	Ser	Val	Leu	Thr	Gly	Leu	Gly	Ser	Cys	Leu	Pro	Ser
	1				5					10					15	

ES 2 685 502 T3

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

ES 2 685 502 T3

Ala Ala Ser Ile Pro Leu Ala Leu Asp His Ala His Ala Arg Gly Thr
 290 295 300

Leu Arg Pro Gly Asp Arg Val Leu Leu Thr Ala Phe Gly Gly Gly Leu
 305 310 315 320

Thr Trp Gly Ala Ala Ala Leu Thr Trp Pro Ala Val Asp Pro Val
 325 330 335

5 <210> 5
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Cebador directo

<400> 5
 ggtggagcat gtggtta 18

15 <210> 6
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Cebador inverso

<400> 6
 ccattgtagc acgtgtgt 18

25 <210> 7
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Cebador directo

35 <400> 7
 atttctagaa aaccgtccat cacgcgag 28

40 <210> 8
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Cebador inverso

<400> 8
 attaagccta ctagtatggt cgtccttggt tcatac 35

50 <210> 9
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador directo

55 <400> 9
 atttctagaa ctagtgatcg tacttgaccg taatac 35

ES 2 685 502 T3

<210> 10
<211> 36
<212> ADN
<213> Artificial

5

<220>
<223> Cebador inverso

10

<400> 10
attaagcttg ctagccgaac agcggatttt attcag 36

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para producir lípidos, que comprende:
- 5 - cultivar células bacterianas del género *Streptomyces* en un medio que comprende material lignocelulósico como fuente o fuentes de carbono y/o de nutrientes, en donde dicho material lignocelulósico se añade al medio de cultivo sin la hidrólisis de los polisacáridos;
- recuperar los lípidos de las células de dichas bacterias o del medio de cultivo.
- 10 2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el material lignocelulósico comprende desecho o desechos o residuo o residuos orgánicos industriales, desecho o desechos o residuo o residuos orgánicos agrícolas o cualquier mezcla de los mismos.
- 15 3. El proceso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que el medio de cultivo comprende como fuente de carbono adicional glicerol, una fracción de la industria del azúcar o del almidón, jarabe o jarabes de azúcar o almidón o azúcar o azúcares purificados o cualquier mezcla de los mismos.
- 20 4. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la cantidad de triacilgliceroles en el medio de cultivo gastado es al menos de 1 g/litro.
5. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el medio de cultivo no es estéril o pasteurizado.
- 25 6. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el medio de cultivo comprende inhibidores de la lipasa.
7. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la especie de *Streptomyces* se selecciona del grupo de especies que comprende *Streptomyces roseosporus*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces albus*, *Streptomyces peucetius*, *Streptomyces aureofaciens*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces coelicolor*,
30 *Streptomyces hygroscopicus*, *Streptomyces avermitilis* y *Streptomyces lydicus*.
8. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que las células bacterianas se modifican genéticamente para expresar un gen endógeno o exógeno que codifica DGAT (EC 2.3.1.20) y/o la proteína vehículo 3-cetoacil-acil sintasa III (EC: 2.3.1.41).
- 35 9. el proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que las células bacterianas se hacen deficientes en la producción de agentes antibióticos.
- 40 10. Un cultivo celular para la producción de lípidos, que comprende
- (a) una población de células bacterianas del género *Streptomyces*, en el que dichas células bacterianas se modifican genéticamente para expresar un gen endógeno o exógeno que codifica DGAT (EC 2.3.1.20) y/o la proteína vehículo 3-cetoacil-acil sintasa III (EC: 2.3.1.41), en donde la modificación genética del hospedador *Streptomyces*
- 45 (i) se lleva a cabo introduciendo en el hospedador *Streptomyces* un gen exógeno de otra especie de *Streptomyces* o una copia o copias adicionales de un gen endógeno, o
(ii) el gen se expresa bajo otro promotor dando como resultado una expresión aumentada del gen, o
(iii) el hospedador *Streptomyces* está genéticamente modificado de tal manera que o bien el gen se expresa
50 más abundantemente o bien aumenta la actividad del producto génico; y
- (b) un medio de cultivo que comprende material lignocelulósico como fuente o fuentes de carbono y/o nutrientes, en donde dicho material lignocelulósico se añade al medio de cultivo sin hidrólisis de los polisacáridos.
- 55 11. El cultivo de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la especie de *Streptomyces* se selecciona del grupo de especies que comprenden *Streptomyces roseosporus*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces albus*, *Streptomyces peucetius*, *Streptomyces aureofaciens*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces hygroscopicus*, *Streptomyces avermitilis* y *Streptomyces lydicus*.
- 60 12. El cultivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11, en el que las células bacterianas están genéticamente modificadas para expresar uno o más genes seleccionados del grupo que comprende
- (a) sco0958 que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 1 y/o sco5888 que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2;
- 65 (b) una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que muestra al menos un 60 % de identidad con SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 4.

13. El medio de cultivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que las células bacterianas se hacen deficientes en la producción de antibióticos tales como antibióticos lipopeptídicos o agentes quimioterapéuticos tales como daunomicina.

5 14. Un hospedador seleccionado del grupo de especies que comprende *Streptomyces roseosporus*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces albus*, *Streptomyces peucetius*, *Streptomyces aureofaciens*, *Streptomyces lividans*,
10 *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces hygroscopicus*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces lydicus* genéticamente modificado para expresar un gen endógeno o exógeno que codifica DGAT (EC 2.3.1.20) y/o la proteína vehículo 3-cetoacil-acil sintasa III (EC: 2.3.1.41), en donde la modificación genética del hospedador *Streptomyces*

(i) se lleva a cabo introduciendo en el hospedador *Streptomyces* un gen exógeno de otra especie de *Streptomyces* o una copia o copias adicionales de un gen endógeno, o

15 (ii) el gen se expresa bajo otro promotor dando como resultado una expresión aumentada del gen, o

(iii) el hospedador *Streptomyces* está genéticamente modificado de tal manera que o bien el gen se expresa más abundantemente o bien aumenta la actividad del producto génico.

20 15. El hospedador de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el hospedador se selecciona del grupo de especies que comprende *Streptomyces roseosporus* y *Streptomyces albus*.

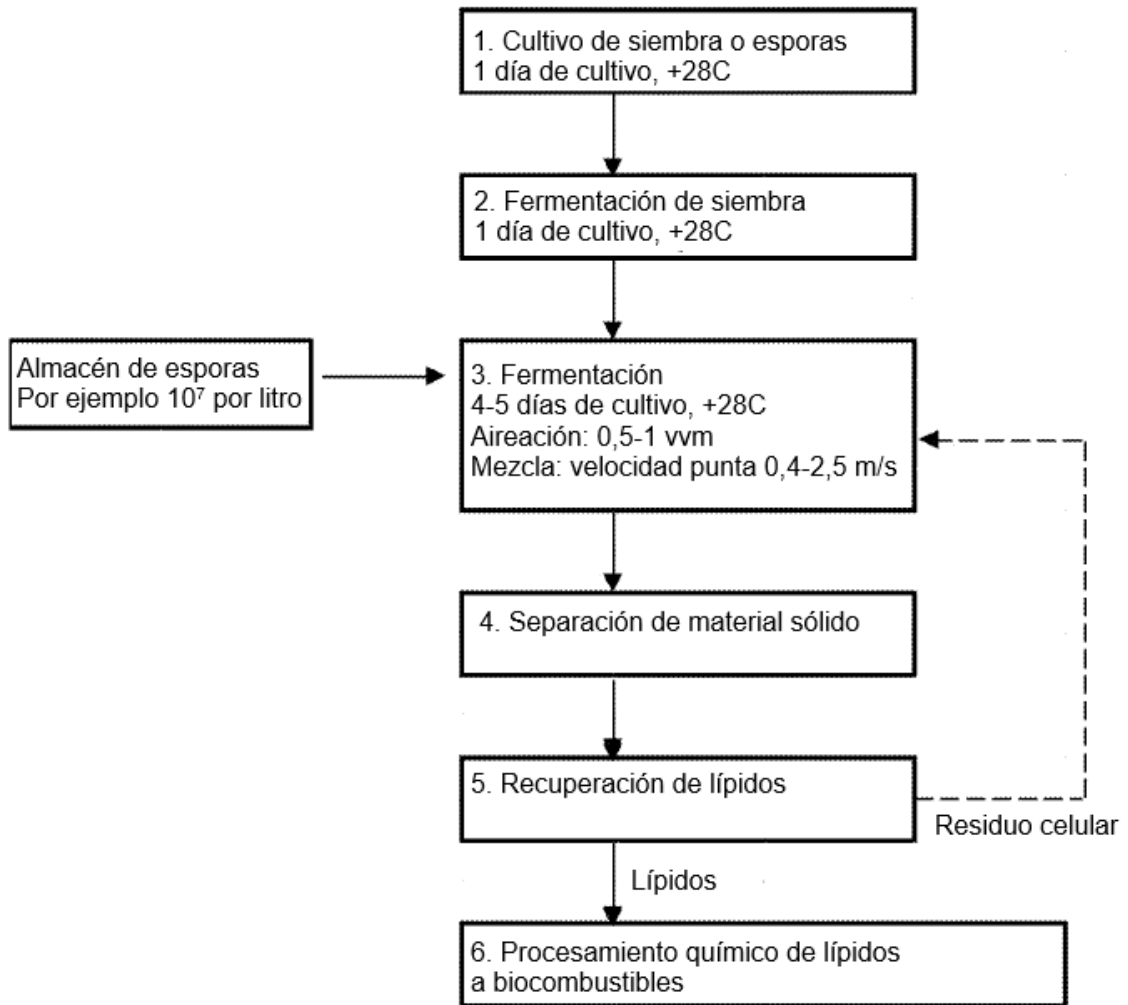


Fig. 1

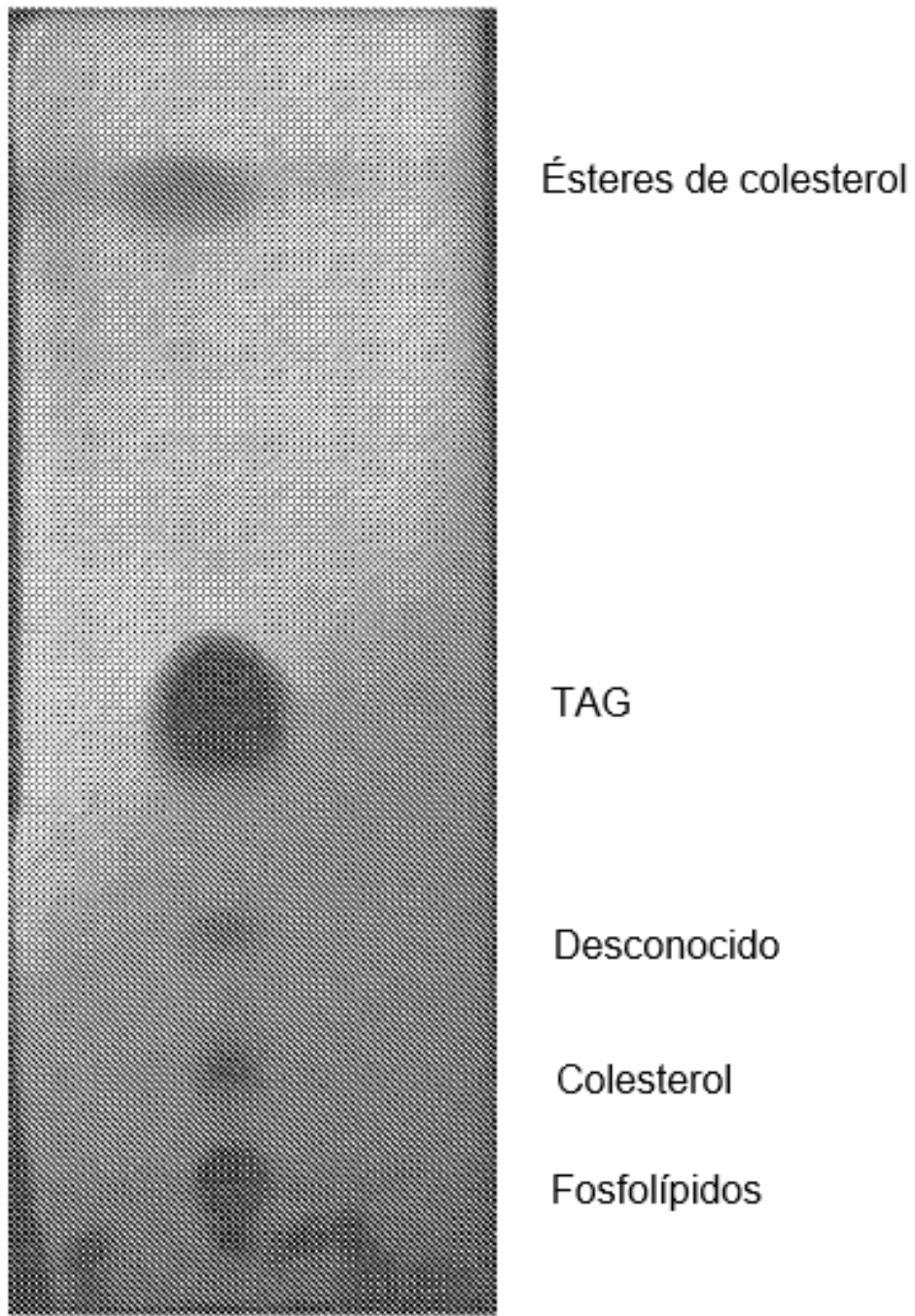


Fig. 2

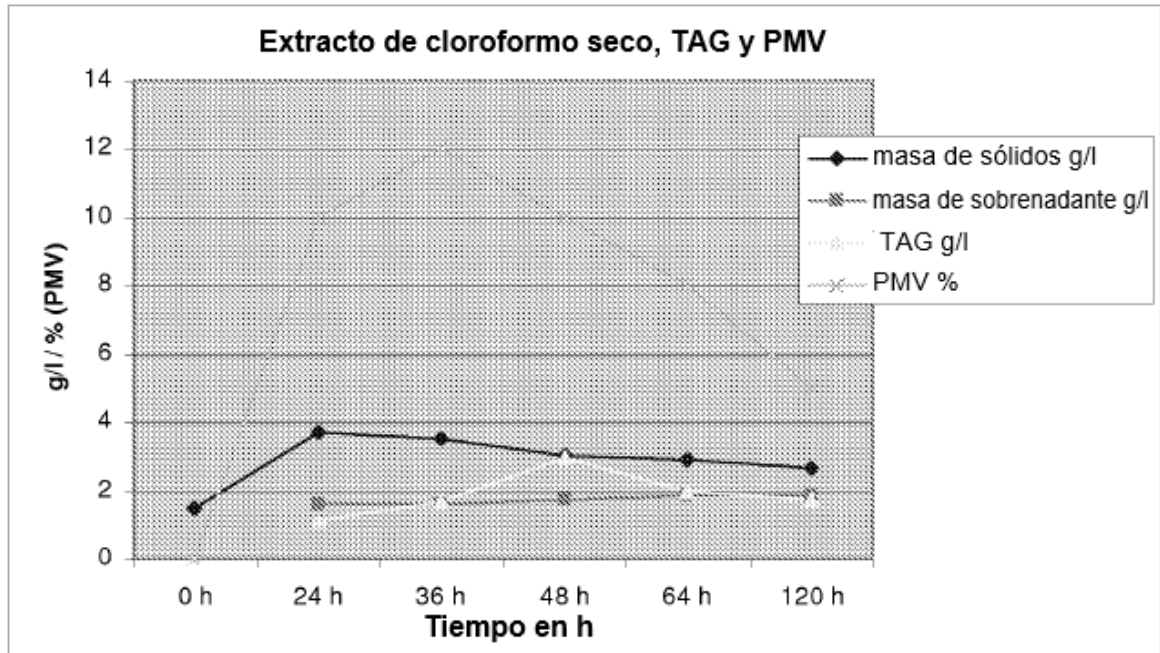


Fig. 3A

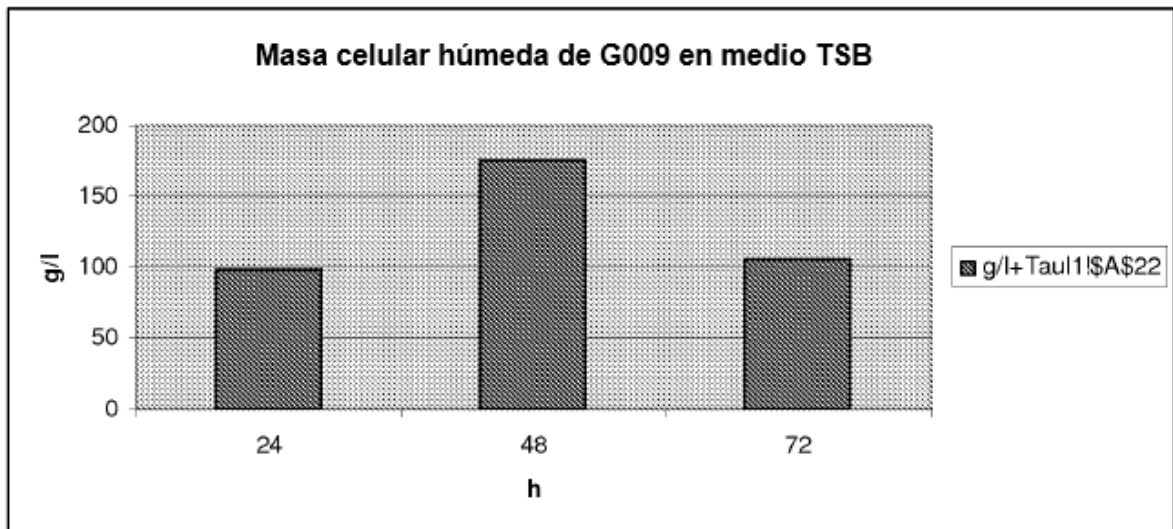


Fig. 3B

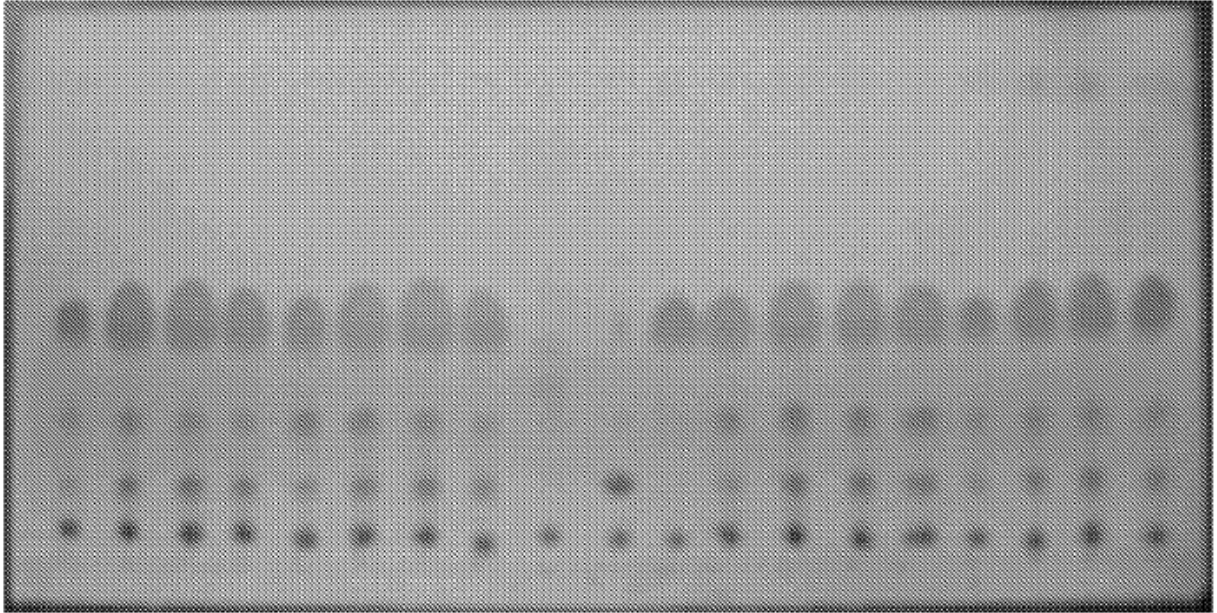


Fig. 4

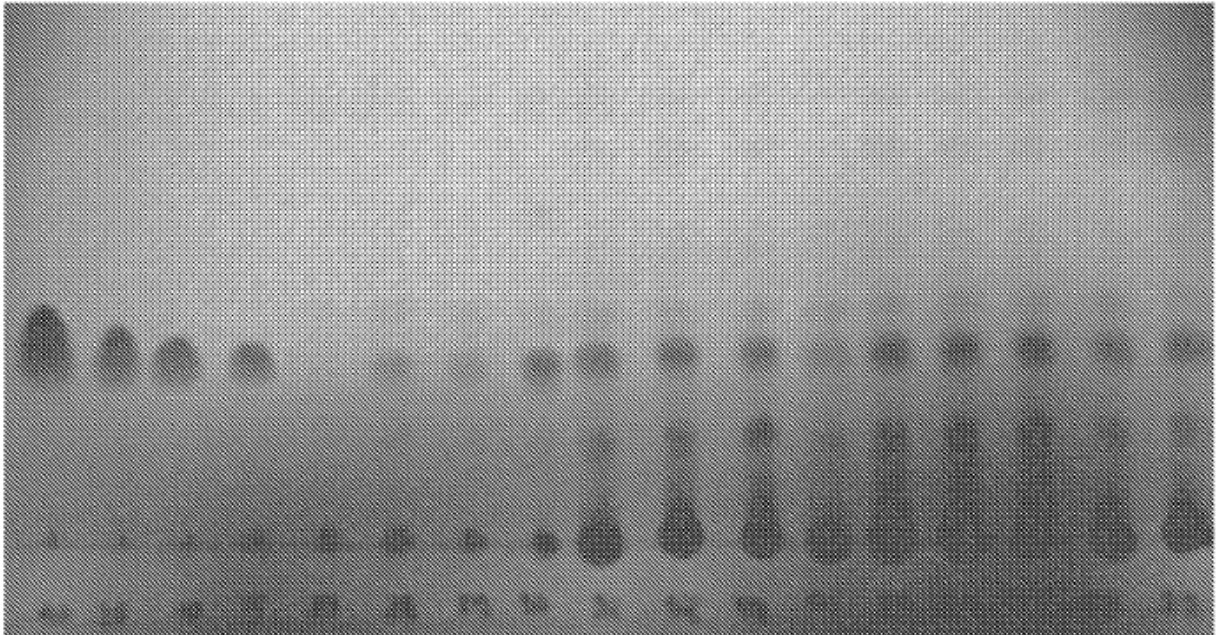


Fig. 5