

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 701 403**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.12.2010 PCT/US2010/062277**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.07.2011 WO11082190**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2010 E 10841651 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2018 EP 2519625**

54 Título: **Traustoquítridos recombinantes que crecen en sacarosa, y composiciones, métodos de preparación y usos de los mismos**

30 Prioridad:

**28.12.2009 US 290443 P**

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

**22.02.2019**

73 Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)  
Het Overloon, 1  
6411 TE Heerlen, NL**

72 Inventor/es:

**LIPPMEIER, JAMES CASEY;  
APT, KIRK E. y  
HANSEN, JON MILTON**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 701 403 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

Traustoquítridos recombinantes que crecen en sacarosa, y composiciones, métodos de preparación y usos de los mismos

5 Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a traustoquítridos recombinantes que crecen en sacarosa y cultivos celulares que comprenden los traustoquítridos recombinantes, así como métodos de producción de cultivos celulares, biomásas, aceites microbianos y composiciones usando los traustoquítridos recombinantes.

Antecedentes

15 Los ácidos grasos se clasifican basándose en la longitud y características de saturación de la cadena de carbono. Los ácidos grasos se denominan ácidos grasos de cadena corta, de cadena media o de cadena larga basándose en el número de carbonos presentes en la cadena, se denominan ácidos grasos saturados cuando no hay dobles enlaces presentes entre los átomos de carbono, y se denominan ácidos grasos insaturados cuando hay dobles enlaces presentes. Los ácidos grasos de cadena larga insaturados están monosaturados cuando hay únicamente un doble enlace presente y están poliinsaturados cuando hay más de un doble enlace presente.

20 Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) se clasifican basándose en la posición del primer doble enlace desde el extremo metilo del ácido graso: los ácidos grasos omega-3 (n-3) contienen un primer doble enlace en el tercer carbono, mientras que los ácidos grasos omega-6 (n-6) contienen un primer doble enlace en el sexto carbono. Por ejemplo, el ácido docosahexaenoico ("DHA") es un ácido graso poliinsaturado de cadena larga omega-3 (LC-PUFA) con una longitud de cadena de 22 carbonos y 6 dobles enlaces, a menudo denominado "22:6 n-3". Otros LC-PUFA omega-3 incluyen ácido eicosapentaenoico ("EPA"), denominado "20:5 n-3" y ácido docosapentaenoico omega-3 ("DPA n-3"), denominado "22:5 n-3". DHA y EPA se han llamado ácidos grasos "esenciales". Los LC-PUFA omega-6 incluyen ácido araquidónico ("ARA"), denominado "20:4 n-6" y ácido docosapentaenoico omega-6 ("DPA n-6"), denominado "22:5 n-6".

25 Los ácidos grasos omega-3 son moléculas biológicamente importantes que afectan a la fisiología celular debido a su presencia en las membranas celulares, regulan la producción y la expresión génica de compuestos biológicamente activos y sirven como sustratos biosintéticos. Roche, H. M., Proc. Nutr. Soc. 58: 397-401 (1999). El DHA, por ejemplo, representa aproximadamente un 15 %-20 % de los lípidos en la corteza cerebral humana y un 30 %60 % de los lípidos en la retina, está concentrado en los testículos y el esperma y es un componente importante de la leche materna. Jean-Pascal Bergé & Gilles Barnathan, Fatty Acids from Lipids of Marine Organisms: Molecular Biodiversity, Roles as Biomarkers, Biologically Active Compounds, and Economical Aspects, in Marine Biotechnology I 49 (T. Scheper, ed., 2005). El DHA representa hasta un 97 % de los ácidos grasos omega-3 en el cerebro y hasta un 93 % de los ácidos grasos omega-3 en la retina. Además, el DHA es esencial para el desarrollo tanto fetal como infantil, así como para el mantenimiento de las funciones cognitivas en adultos. *Id.* Los ácidos grasos omega-3, incluyendo DHA y EPA, también poseen propiedades antiinflamatorias. Véase, por ejemplo, *id.* y Simopoulos, A.P., J. Am. Coll. Nutr. 21: 495-595 (2002). En particular, el EPA compite con el ácido araquidónico por la síntesis de eicosanoides tales como prostaglandinas y leucotrienos a través de ciclooxigenasas y lipoxigenasas. *Id.* Como los ácidos grasos omega-3 no se sintetizan de *novo* en el cuerpo humano, estos ácidos grasos deben obtenerse de fuentes nutritivas.

30 Los traustoquítridos, que son organismos microalgáceos del orden *Thraustochytriales*, están reconocidos como fuentes alternativas para la producción de lípidos. Por ejemplo, se ha informado de que cepas de especies de traustoquítridos producen ácidos grasos omega-3 como un alto porcentaje de los ácidos grasos totales producidos por los organismos. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.130.242; y Huang, J. *et al.*, J. Am. Oil. Chem. Soc. 78: 605-610 (2001); Huang, J. *et al.*, Mar. Biotechnol. 5: 450-457 (2003). Los traustoquítridos también se han reconocido como fuentes de lípidos para la producción de biocombustibles. Véase, por ejemplo, la publicación de Estados Unidos n.º 2009/0064567 y el documento WO 2008/067605.

35 Aunque los traustoquítridos metabolizan la glucosa y/o la fructosa, que son los dos componentes de azúcar de la sacarosa, no parecen metabolizar de forma natural la sacarosa. Véase, por ejemplo, Aki *et al.*, JAOCS 80:789-794 (2003); Yokochi *et al.*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 49:72-76 (1998); Honda *et al.*, Mycol. Res. 4:439-448 (1998); Singh, World J. of Microbiology 12:76-81 (1996); Goldstein, American J. of Botany 50:271-279 (1963); y la Patente de Estados Unidos N.º 5.340.742. Por tanto, los cultivos de traustoquítridos incluyendo los cultivos comerciales e industriales, actualmente requieren jarabes de glucosa como fuentes de carbono y energía, en lugar de fuentes de carbohidratos más baratas que contienen sacarosa.

60 Existe una necesidad continuada de producción de traustoquítridos con la capacidad de crecer sobre fuentes de carbono alternativas tales como sacarosa para su uso en aplicaciones comerciales e industriales.

Breve resumen de la invención

La presente invención se refiere a un método de producción de un cultivo celular de traustocátricos, que comprende: (a) transformar una célula de traustocátricos con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica una invertasa heteróloga, en la que la invertasa está unida a la membrana plasmática de la célula de traustocátricos, y (b) cultivar la célula de traustocátricos transformada en un medio de cultivo que comprende sacarosa como fuente de carbono. En algunas realizaciones, la invertasa está unida de forma funcional a un péptido señal. En algunas realizaciones, la secuencia polinucleotídica que codifica la invertasa heteróloga es al menos un 90 % idéntica a la secuencia polinucleotídica de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, el método comprende además transformar la célula de traustocátricos con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica un transportador de sacarosa heterólogo. En algunas realizaciones, la secuencia polinucleotídica que codifica el transportador de sacarosa heterólogo es al menos un 90 % idéntica a la secuencia polinucleotídica de n.º de acceso L47346. En algunas realizaciones, el traustocátrico es un *Schizochytrium* o un *Thraustochytrium*.

La presente invención también se refiere a una célula de traustocátricos que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica una invertasa heteróloga, en la que la invertasa está unida a la membrana plasmática de la célula de traustocátricos. En algunas realizaciones, la invertasa está unida de forma funcional a un péptido señal. En algunas realizaciones, la secuencia polinucleotídica que codifica la invertasa heteróloga es al menos un 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, la célula comprende además una secuencia polinucleotídica que codifica un transportador de sacarosa heterólogo. En algunas realizaciones, la secuencia polinucleotídica que codifica el transportador de sacarosa heterólogo es al menos un 90 % idéntica a la secuencia de polinucleotídica de N.º de acceso L47346. En algunas realizaciones, el traustocátrico es un *Schizochytrium* o un *Thraustochytrium*.

La presente invención también se refiere a un cultivo de traustocátricos que comprende: (a) cualquiera de las células de traustocátricos de la invención y (b) un medio de cultivo celular que comprende sacarosa como fuente de carbono.

La presente invención también se refiere a un método de producción de una biomasa de traustocátricos, que comprende: (a) cultivar cualquiera de las células de traustocátricos de la invención en un medio de cultivo que comprende sacarosa como fuente de carbono, y (b) recoger la biomasa del medio de cultivo.

La presente invención también se refiere a un método de producción de un aceite microbiano, que comprende: (a) cultivar cualquiera de las células de traustocátricos de la invención en un medio de cultivo que comprende sacarosa como fuente de carbono para producir una biomasa, y (b) extraer un aceite de la biomasa.

La presente invención también se refiere a un método de producción de un producto alimenticio, cosmético, composición industrial o composición farmacéutica para un animal o ser humano, que comprende: (a) cultivar cualquiera de las células de traustocátricos de la invención en un medio de cultivo que comprende sacarosa como fuente de carbono, (b) recoger una biomasa del medio de cultivo y (c) preparar el producto alimenticio, cosmético, composición industrial o composición farmacéutica a partir de la biomasa. En algunas realizaciones, el método comprende además extraer un aceite de la biomasa y preparar el producto alimenticio, cosmético, composición industrial o composición farmacéutica a partir del aceite. En algunas realizaciones, el producto alimenticio es una fórmula infantil. En algunas realizaciones, el producto alimenticio es leche, una bebida, una bebida terapéutica, una bebida nutritiva o una combinación de las mismas. En algunas realizaciones, el producto alimenticio es un aditivo para alimentos para animales o seres humanos. En algunas realizaciones, el producto alimenticio es un suplemento nutritivo. En algunas realizaciones, el producto alimenticio es un pienso para animales.

La invención se define por las reivindicaciones. La materia objeto fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona solo a título informativo.

Breve descripción de los dibujos/figuras

La FIG. 1 muestra una tabla de uso de codones para *Schizochytrium*.  
 La FIG. 2 muestra un mapa plasmídico de pSchiz-EPCT(+)-s1Suc2\_CL0076, también denominado pCL0076 (SEQ ID NO: 2).  
 La FIG. 3 muestra el peso seco (g/l) de los sedimentos celulares de cultivos de *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 transformado con pCL0076 cultivado en sacarosa-SSFM. Los transformantes se denominaron 1-1, 1-3, 1-24, 3-1, 3-2, 3-5, 3-21, 4-1, 4-24 y 4-31. "Control" se refiere a células de *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 de tipo silvestre cultivadas en glucosa-SSFM.  
 La FIG. 4 muestra el contenido en grasa (expresado como el % en peso de la biomasa seca) en los sedimentos celulares de cultivos de *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 transformado con pCL0076, cultivado en sacarosa-SSFM. Los transformantes se denominan 1-1, 1-3, 1-24, 3-1, 3-2, 3-5, 3-21, 4-1, 4-24 y 4-31. "Control" se refiere a células de *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 de tipo silvestre cultivadas en glucosa-SSFM.

La FIG. 5 muestra el peso seco (g/l) de sedimentos celulares medido a lo largo del tiempo (días) para cultivos de *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 transformado con pCL0076, cultivado en sacarosa-SSF. Los transformantes se denominan 1-3 y 3-5. "Control" se refiere a células de *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 de tipo silvestre cultivadas en glucosa-SSF.

5 La FIG. 6 muestra el contenido en grasa (expresado como el % en peso de la biomasa seca) en sedimentos celulares de cultivos de dos transformantes cultivados en sacarosa-SSF. Los transformantes se denominan 1-3 y 3-5. "Control" se refiere a células de *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 de tipo silvestre cultivadas en glucosa-SSF.

10 La FIG. 7 muestra el peso seco (g/l) de sedimentos celulares de cultivos de *Schizochytrium* cepa B76-32 transformada con pCL0076 y recogidos después de 2 días o 7 días de cultivo en sacarosa-SSF. 2118\* se refiere a un subaislado de células de *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 de tipo silvestre cultivado en glucosa-SSF. B76-32\*\* se refiere a la cepa parental B76-32 cultivada en glucosa-SSF.

15 La FIG. 8 muestra el contenido en grasa de sedimentos celulares de cultivos de *Schizochytrium* cepa B76-32 transformado con pCL0076 y recogidos después de 2 días o 7 días de cultivo en sacarosa-SSF. La columna de más a la derecha muestra el contenido en grasa para cada muestra como % en peso de biomasa seca. La columna de más a la izquierda muestra para cada muestra el % de grasa total compuesta de grupos acilo con 18 o menos carbonos (gris claro) o 20 o más carbonos (gris medio). 2118\* se refiere a un subaislado de células de *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 de tipo silvestre cultivado en glucosa-SSF. B76-32\*\* se refiere a la cepa parental B76-32 cultivada en glucosa-SSF.

20 La FIG. 9A muestra una transferencia de Western para la proteína invertasa y la FIG. 9B muestra el correspondiente gel de SDS-PAGE teñido con Coomassie. El control de invertasa de *S. cerevisiae* y los sobrenadantes de un cultivo de 3 días del transformante de pCL0076 1-3 se cargaron en cantidades de 5 µg, 2,5 µg, 1,25 µg y 0,625 µg, respectivamente, como se indica en la parte superior de la transferencia de Western.

25 La FIG. 10A muestra un ensayo de actividad de invertasa ilustrado por la velocidad de reacción en función de la concentración de sacarosa.

La FIG. 10B muestra una representación de Lineweaver-Burk convencional utilizada para calcular  $K_m$  y  $V_{máx}$ .

La FIG. 11 muestra las estructuras de N-glucano detectadas en proteínas secretadas por *Schizochytrium* según se determina mediante NSI-Mapeo Total de Iones de N-glucanos permitilados.

30 La FIG. 12 muestra una tabla de especies de glucano obtenidas por NSI- Mapeo Total de Iones de N-glucanos permitilados.

La FIG. 13 muestra un mapa plasmídico de pCL0120 (SEQ ID NO: 5).

La FIG. 14 muestra una secuencia de ácido nucleico (SEQ ID NO: 4) con codones optimizados que codifica el péptido señal de Sec1 de *Schizochytrium* fusionado con la invertasa Suc1 madura de *Aspergillus niger* (N.º de acceso de GenBank S33920).

35 La FIG. 15 muestra un mapa plasmídico de pCL0137\_EPCT(+)-s1Suc1, también denominado pCL0137.

#### Descripción detallada de la invención

40 La presente invención se refiere a traustoquítridos recombinantes y cultivos celulares que comprenden los traustoquítridos recombinantes, así como métodos de producción de cultivos celulares, biomasas, aceites microbianos y composiciones usando los traustoquítridos recombinantes.

#### Traustoquítridos

45 De acuerdo con la presente invención, el término "traustoquítrido" se refiere a cualquier miembro del orden *Thraustochytriales*, que incluye la familia *Thraustochytriaceae*. La ubicación taxonómica actual de los traustoquítridos puede resumirse de la siguiente manera:

Reino: *Stramenopila* (*Chromista*)

50 Filo: *Labyrinthulomycota* (*Heterokonta*)

Clase: *Labyrinthulomycetes* (*Labyrinthulales*)

Orden: *Labyrinthulales*

Familia: *Labyrinthulaceae*

55 Orden: *Thraustochytriales*

Familia: *Thraustochytriaceae*

A fines de la presente invención, las cepas descritas como traustoquítridos incluyen los siguientes organismos:

60 Orden: *Thraustochytriales*; Familia: *Thraustochytriaceae*; Géneros: *Thraustochytrium* (Especies: sp., *arudimentale*, *aureum*, *benthicola*, *globosum*, *kinnei*, *motivum*, *multirudimentale*, *pachydermum*, *proliferum*, *roseum*, *striatum*), *Ulkenia* (Especies: sp., *amoeboidea*, *keruelensis*, *minuta*, *profunda*, *radiata*, *sailens*, *sarkariana*, *schizochytrrops*, *visurgensis*, *yorkensis*), *Schizochytrium* (Especies: sp., *aggregatum*, *limnaceum*, *mangrovei*, *minutum*, *octosporum*), *Japonochytrium* (Especies: sp., *marinum*), *Aplanochytrium* (Especies: sp., *haliotidis*, *keruelensis*, *profunda*, *stocchinoi*), *Althornia* (Especies: sp., *crouchii*) o *Elina* (Especies: sp., *marisalba*, *sinorifica*). A los fines de esta invención, las especies descritas dentro de *Ulkenia* se considerarán miembros del género *Thraustochytrium*.

65 *Aurantiochytrium*, *Oblongichytrium*, *Botryochytrium*, *Parietichytrium* y *Sicyoidochytrium* son géneros adicionales abarcados por la presente invención.

Las cepas de traustokuítridos incluyen, aunque sin limitación las cepas depositadas PTA-10212, PTA-10213, PTA-10214, PTA-10215, PTA-9695, PTA-9696, PTA-9697, PTA-9698, PTA-10208, PTA-10209, PTA-10210, PTA-10211, *Thraustochytrium* sp. (23B) (ATCC 20891); *Thraustochytrium striatum* (Schneider) (ATCC 24473); *Thraustochytrium aureum* (Goldstein) (ATCC 34304); *Thraustochytrium roseum* (Goldstein) (ATCC 28210); y *Japonochytrium* sp. (L1) (ATCC 28207). *Schizochytrium* incluye, aunque sin limitación, *Schizochytrium aggregatum*, *Schizochytrium limacinum*, *Schizochytrium* sp. (S31) (ATCC 20888), *Schizochytrium* sp. (S8) (ATCC 20889), *Schizochytrium* sp. (LC-RM) (ATCC 18915), *Schizochytrium* sp. (SR 21), la cepa depositada ATCC 28209 y la cepa depositada *Schizochytrium limacinum* IFO 32693.

En algunas realizaciones, la célula de traustokuítridos de la invención es una célula de *Schizochytrium* o *Thraustochytrium*. En algunas realizaciones, el traustokuítrido es de una especie seleccionada de *Schizochytrium* sp., *Schizochytrium aggregatum*, *Schizochytrium limacinum*, *Schizochytrium minutum*, *Thraustochytrium* sp., *Thraustochytrium striatum*, *Thraustochytrium aureum*, *Thraustochytrium roseum*, *Japonochytrium* sp. y cepas derivadas de los mismos.

De acuerdo con la presente invención, el término "transformación" se usa para hacer referencia a cualquier método por el que una molécula de ácido nucleico (es decir, una molécula recombinante de ácido nucleico) puede insertarse en una célula de traustokuítridos de la invención. En sistemas microbianos, el término "transformación" se usa para describir un cambio hereditario debido a la adquisición de ácidos nucleicos exógenos por el microorganismo y es esencialmente sinónimo del término "transfección". Las técnicas adecuadas de transformación para introducir moléculas de ácido nucleico en células de traustokuítridos incluyen, aunque sin limitación, bombardeo de partículas, electroporación, microinyección, lipofección, adsorción, infección y fusión de protoplastos.

Aunque la expresión "molécula de ácido nucleico" se refiere principalmente a la molécula física de ácido nucleico y las expresiones "secuencia de ácido nucleico" o "secuencia polinucleotídica" se refieren principalmente a la secuencia de nucleótidos en la molécula de ácido nucleico, las expresiones se usan de forma intercambiable, especialmente con respecto a una molécula de ácido nucleico, secuencia polinucleotídica o una secuencia de ácido nucleico que es capaz de codificar una proteína. En algunas realizaciones, las moléculas aisladas de ácido nucleico descritas en este documento se producen usando tecnología de ADN recombinante (por ejemplo, amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o clonación) o síntesis química. De acuerdo con la presente invención, una molécula "aislada" de ácido nucleico es una molécula de ácido nucleico que se ha retirado de su medio natural (es decir, que se ha sometido a manipulación humana), siendo su medio natural el genoma o cromosoma en que se encuentra la molécula de ácido nucleico en la naturaleza. Por tanto, "aislada" no refleja necesariamente el grado al que se ha purificado la molécula de ácido nucleico, sino que indica que la molécula no incluye un genoma completo o un cromosoma completo en que la molécula de ácido nucleico se encuentra en la naturaleza. Una molécula aislada de ácido nucleico puede incluir ADN, ARN (por ejemplo, ARNm) o derivados de ADN o ARN (por ejemplo, ADNc). Las moléculas aisladas de ácido nucleico incluyen moléculas de ácido nucleico naturales y homólogos de las mismas, incluyendo, aunque sin limitación, variantes alélicas naturales y moléculas de ácido nucleico modificadas en que se han insertado, eliminado, sustituido y/o invertido, nucleótidos de tal manera que dichas modificaciones proporcionan el efecto deseado sobre la secuencia, la función y/o la actividad biológica del péptido o proteína codificado.

El término "proteína" incluye moléculas polipeptídicas de una sola cadena, así como complejos de múltiples polipéptidos en los que los polipéptidos constituyentes individuales están unidos por medios covalentes o no covalentes. El término "polipéptido" incluye péptidos de dos o más aminoácidos de longitud, típicamente que tienen más de 5, 10 o 20 aminoácidos. En algunas realizaciones, un polipéptido como se describe en este documento es un polipéptido heterólogo. El término "heterólogo", como se usa en este documento, se refiere a una secuencia polipeptídica (o polinucleotídica), por ejemplo, que no se encuentra de forma natural en la célula de traustokuítridos de la invención.

*Schizochytrium* utiliza de forma natural azúcares de hexosa y glicerol como fuente de carbono en lugar de sacarosa. El examen de la base de datos genómica de *Schizochytrium* no revela genes necesarios para las etapas iniciales del catabolismo de la sacarosa, apoyando el hallazgo general de que los traustokuítridos metabolizan glucosa y/o fructosa, que son dos componentes de azúcar de la sacarosa, pero no metabolizan de forma natural sacarosa. Véase también, por ejemplo, Aki *et al.*, JAOCS 80: 789-794 (2003); Yokochi *et al.*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 49: 72-76 (1998); Honda *et al.*, Mycol. Res. 4: 439-448 (1998); Singh, World J. of Microbiology 12: 76-81 (1996); Goldstein, American J. of Botany 50: 271-279 (1963) y la Patente de Estados Unidos N.º 5.340.742.

La presente invención se refiere a una célula de traustokuítridos transformada con una molécula de ácido nucleico y comprende una secuencia polinucleotídica que codifica un polipéptido heterólogo asociado con el metabolismo de la sacarosa. El polipéptido es un polipéptido heterólogo. Una célula de traustokuítridos de la invención comprende una o más moléculas de ácido nucleico que comprenden una o más secuencias polinucleotídicas que codifican una o más sacarosas heterólogas, que comprenden una invertasa. En algunas realizaciones, la célula de traustokuítridos comprende una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica una invertasa secretasa. Como se describe en este documento, la célula de traustokuítridos comprende una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica una sacarasa citoplasmática. Como se

describe en este documento, la célula de traustóquítridos comprende una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica un transportador de sacarosa. En algunas realizaciones, la célula de traustóquítridos comprende una o más moléculas de ácido nucleico que comprenden uno o más polinucleótidos que codifican una o más sacarosas heterólogas y un transportador de sacarosa heterólogo. Como se describe en este documento, la célula de traustóquítridos comprende una o más moléculas de ácido nucleico que comprenden uno o más polinucleótidos que codifican una invertasa citoplasmática heteróloga y un transportador de sacarosa heterólogo. En algunas realizaciones, la célula de traustóquítridos comprende una o más moléculas de ácido nucleico que comprenden uno o más polinucleótidos que codifican una invertasa secretada heteróloga y un transportador de sacarosa heterólogo. En algunas realizaciones, la célula de traustóquítridos comprende una o más moléculas de ácido nucleico que comprenden uno o más polinucleótidos que codifican una invertasa citoplasmática heteróloga, una invertasa secretada heteróloga y un transportador de sacarosa heterólogo. En algunas realizaciones, la secuencia polinucleotídica tiene codones optimizados para maximizar la eficacia de traducción en la célula de traustóquítridos. En algunas realizaciones, la secuencia polinucleotídica codifica la sacarasa, el transportador de sacarosa o una combinación de los mismos, está integrada en el genoma de la célula de traustóquítridos. En algunas realizaciones, la secuencia polinucleotídica que codifica la sacarasa, el transportador de sacarosa o una combinación de los mismos, está integrada de forma estable en el genoma de la célula de traustóquítridos. Las sacarosas son partes de una familia de enzimas conocidas como glucósido hidrolasa (también denominadas glucosidasas) que catalizan la hidrólisis de los enlaces glucosídicos para generar dos azúcares más pequeños. Como se describe en este documento, una "sacarasa" es cualquier enzima que cataliza la hidrólisis de la sacarosa (también conocida como azúcar común o azúcar de mesa) a fructosa y glucosa. Como se describe en este documento, la sacarasa puede ser una sacarasa-isomaltosa, una levanasa, sacridasa, beta-fructosidasa, beta-fructofuranosidasas, fructohidrolasa, sacarasa, inulinasa, sacarosa alfa-glucohidrolasa, alfa-D-glucosidasa o una combinación de las mismas. En el método de la invención la sacarasa es una invertasa. En algunas realizaciones la sacarasa es la invertasa SUC2 de *Saccharomyces cerevisiae*; la invertasa SacC de *Zymomonas*; la invertasa INV1 de *Pichia*; la invertasa INV de *Debaryomyces*; una invertasa de otras fuentes fúngicas, protistas, de algas, vegetales o eucarióticas; o cualquiera de las combinaciones de los mismos. En determinadas realizaciones, la sacarasa es de una fuente procariótica tal como las bacterias corineformes o *Escherichia coli*. En algunas realizaciones, una sacarasa expresada en una célula de traustóquítridos de la invención comprende un patrón de glucosilación distinto que cuando se expresa en el organismo del que procede la sacarasa. En algunas realizaciones, la sacarasa que se expresa en la célula de traustóquítridos es una glucoproteína que comprende oligosacáridos de alta manosa. En algunas realizaciones, la célula de traustóquítridos también comprende una secuencia polinucleotídica que codifica una enzima necesaria para la sacarificación de materia prima de celulosa (por ejemplo, caña azúcar). Véase, por ejemplo, el documento U.S. 2009/0064567. En algunas realizaciones, la célula de traustóquítridos también comprende una secuencia polinucleotídica que codifica una fructoquinasa, una glucoquinasa, una hexoquinasa o una combinación de las mismas.

En algunas realizaciones, el sistema de expresión usado para la producción de sacarasa, un transportador de sacarosa, o una combinación de los mismos en una célula de traustóquítridos comprende elementos reguladores que se obtienen de secuencias de traustóquítridos. En algunas realizaciones, el sistema de expresión usado para la producción de una sacarasa, un transportador de sacarosa, o una combinación de los mismos en una célula de traustóquítridos comprende elementos reguladores que se obtienen de secuencias que no son de traustóquítridos, incluyendo secuencias derivadas de secuencias algáceas que no son de traustóquítridos. En algunas realizaciones, el sistema de expresión comprende una secuencia polinucleotídica que codifica una sacarasa, un transportador de sacarosa, o la combinación de los dos en la que la secuencia polinucleotídica está unida de forma funcional a cualquier secuencia promotora, cualquier secuencia terminadora y/o cualquier otra secuencia reguladora que sea funcional en una célula de traustóquítridos. El sistema de expresión descrito en este documento comprende secuencias polinucleotídicas que codifican una sacarasa expresada citoplásmicamente y un transportador de sacarosa. Pueden usarse secuencias reguladoras inducibles o constitutivamente activas. Las secuencias reguladoras incluyen, aunque sin limitación, secuencias reguladoras de *Schizochytrium* descritas en la publicación de Estados Unidos n.º 2010/0233760, la patente de Estados Unidos n.º 7.001.772 y las publicaciones de Estados Unidos n.º 2006/0275904 y 2006/0286650, tales como: un promotor OrfC, un terminador OrfC, un promotor largo EF1 de promotor corto EF1, un promotor Sec1, promotor corto 60S, promotor largo 60S, un promotor de la acetolactato sintasa, un terminador de la acetolactato sintasa, un promotor de  $\alpha$ -tubulina, un promotor de un sistema de policétido sintasa (PKS), un promotor de ácido graso desaturasa, un promotor de actina, un terminador de actina, un promotor del factor 1 de elongación alfa ( $\text{efl}\alpha$ ), un terminador de  $\text{efl}\alpha$ , un promotor de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa ( $\text{gapdh}$ ), un terminador de  $\text{gapdh}$  y combinaciones de los mismos.

En algunas realizaciones, la sacarasa se secreta en el medio de fermentación por un traustóquítrido recombinante transformado con un gen de la sacarasa. En algunas realizaciones, la sacarasa es una proteína secretada que comprende un péptido señal. En algunas realizaciones, el péptido señal está asociado de forma natural con la sacarasa exógena (es decir, el péptido señal es la secuencia señal nativa de la sacarasa exógena). En algunas realizaciones, el péptido señal no está asociado de forma natural con la sacarasa exógena, pero es en cambio un péptido señal heterólogo, tal como un péptido señal procedente de un microorganismo del filo *Labyrinthulomycota*. En algunas realizaciones, el péptido señal es de un traustóquítrido. En algunas realizaciones, el péptido señal es de un *Schizochytrium* o un *Thraustochytrium*. En algunas realizaciones, el péptido señal es el péptido señal de Sec1 de *Schizochytrium* (SEQ ID NO: 3). Un "péptido señal" incluye péptidos de longitud completa y fragmentos funcionales

del mismo, péptidos de fusión y homólogos de un péptido señal de origen natural. Un homólogo de un péptido señal difiere de un péptido señal de origen natural en que al menos uno o varios, aunque sin limitación a uno o varios, aminoácidos se han delecionado (por ejemplo, una versión truncada de la proteína, tal como un péptido o fragmento), insertado, invertido, sustituido y/o derivatizado (por ejemplo, por glucosilación, fosforilación, acetilación, acilación (por ejemplo, miristoilación y palmitoilación), prenilación, amidación y/o adición de glucosilfosfatidil inositol). En algunas realizaciones, los homólogos de un péptido señal conservan actividad como una señal al menos en un traustoquítrido, aunque la actividad puede aumentarse, disminuirse o hacerse dependiente de determinados estímulos. En algunas realizaciones, la secuencia del péptido señal incluye, aunque sin limitación, una secuencia de *Schizochytrium* descrita en la Publicación de Estados Unidos N.º 2010/0233760, tal como: un péptido señal del transportador de Na/Pi, un péptido señal del transportador de Na/Pi acortado, un péptido señal de alfa-1,6-manosiltransferasa (ALG12), un péptido señal de una proteína de unión a inmunoglobulina (BiP), un péptido señal de alfa-1,3-glucosidasa (GLS2), un péptido señal similar a alfa-1,3-1,6-manosidasa, un péptido señal de similar a alfa-1,3-1,6-manosidasa n.º 1, un péptido señal de similar a alfa-1,2-manosidasa, un péptido señal de similar a beta-xilosidasa, un péptido señal de caroteno sintasa y un péptido señal de Sec1.

Como se describe en este documento, la sacarasa se expresa citoplasmáticamente junto con la expresión de un transportador de sacarosa. En algunas realizaciones, la sacarasa está unida a membrana, por ejemplo, la sacarasa-isomaltasa, que tiene un dominio que se extiende en membrana N-terminal (anclaje de señal). En determinadas realizaciones, la sacarasa está localizada en el exterior de la membrana plasmática. Como se describe en este documento, la sacarasa está fusionada a un dominio que se extiende en membrana.

En algunas realizaciones, se usa un casete de expresión para la expresión de una sacarasa, un transportador de sacarosa o una combinación de los mismos en una célula de traustoquítridos. El diseño y la construcción de casetes de expresión usa técnicas convencionales de biología molecular conocidas para los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3.ª edición. En algunas realizaciones, la célula de traustoquítridos comprende un casete de expresión que contiene elementos genéticos, tales como al menos las siguientes, unidos de forma funcional de tal manera que son funcionales en la célula de traustoquítrido: un promotor; una secuencia codificante que comprende una sacarasa, un transportador de sacarosa o una combinación de los mismos; y una región terminadora. En algunas realizaciones, el casete de expresión comprende además una secuencia polinucleotídica que codifica un péptido señal o un dominio de membrana unido de forma funcional a la sacarasa o el transportador de sacarosa. La expresión "dominio de membrana", como se usa en este documento, se refiere a cualquier dominio dentro de un polipéptido que dirige el polipéptido a una membrana y/o permite que el polipéptido mantenga su asociación con una membrana e incluye aunque sin limitación, un dominio transmembrana (por ejemplo, una región de un único o múltiples dominios de membrana), un dominio monotópico integrado, una secuencia de anclaje de señal, una secuencia señal de ER, una señal de transferencia de parada N-terminal o interna o C-terminal, un anclaje de glucosilfosfatidilinositol y combinaciones de los mismos. Un dominio de membrana puede estar localizado en cualquier posición en el polipéptido, incluyendo el extremo N-terminal, el extremo C-terminal o el centro de polipéptido. Un dominio de membrana puede asociarse con adhesión permanente o temporal de un polipéptido a una membrana. En algunas realizaciones, un vector recombinante comprende el casete de expresión. Los vectores recombinantes incluyen, aunque sin limitación, plásmidos, fagos y virus. En algunas realizaciones, el vector recombinante es un vector linealizado. En algunas realizaciones, el vector recombinante es un vector de expresión. Como se usa en este documento, la expresión "vector de expresión" se refiere a un vector que es adecuado para la producción de un producto codificado (por ejemplo, una sacarasa, un transportador de sacarosa o una combinación de los mismos). En algunas realizaciones, una secuencia polinucleotídica que codifica la sacarasa, el transportador de sacarosa, o una combinación de los mismos se inserta en el vector recombinante para producir una molécula de ácido nucleico recombinante. En algunas realizaciones, la secuencia polinucleotídica que codifica la sacarasa, el transportador de sacarosa, o una de los mismos se inserta en el vector de tal manera que une de forma funcional la secuencia de ácido nucleico a secuencias reguladoras en el vector, lo que posibilita la transcripción y la traducción de la secuencia de ácido nucleico dentro del microorganismo recombinante. En algunas realizaciones, un marcador de selección posibilita la selección de un microorganismo recombinante en que se ha introducido satisfactoriamente una molécula de ácido nucleico recombinante de la presente invención. Los marcadores de selección incluyen, aunque sin limitación, los marcadores de selección descritos en la publicación de Estados Unidos n.º 2010/0233760 y la patente de Estados Unidos n.º 7.001.772, tales como la acetolactato sintasa de *Schizochytrium* o ble bacteriana. En algunas realizaciones, el marcador de selección es un marcador auxotrófico, un marcador de selección dominante (tal como, por ejemplo, una enzima que degrada la actividad de antibiótico) u otra proteína implicada en la selección de transformación.

En algunas realizaciones, la célula de traustoquítridos está modificada genéticamente para introducir o deleccionar genes implicados en las rutas biosintéticas asociadas con el transporte y/o síntesis de hidratos de carbono, incluyendo las implicadas en la glucosilación. Por ejemplo, la célula de traustoquítridos puede modificarse deleccionando genes de glucosilación endógenos y/o insertando genes de glucosilación humanos o animales para permitir patrones de glucosilación que se asemejen de forma estrecha al de los seres humanos. La modificación de la glucosilación en levadura se ejemplifica en, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N.º 7.029.872 y las Publicaciones de Estados Unidos N.º 2004/0171826, 2004/0230042, 2006/0257399, 2006/0029604 y 2006/0040353.

En algunas realizaciones, la célula de traustóquitridos incluye una célula en la que se emplean elementos víricos de ARN para aumentar o regular la expresión génica.

5 Una secuencia polinucleotídica de cualquiera de los métodos de la invención codifica un polipéptido heterólogo que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o que es idéntica a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido asociado con una invertasa. En algunas realizaciones, una secuencia polinucleotídica de cualquiera de los métodos de la invención codifica un polipéptido heterólogo que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o que es idéntica a: la secuencia de aminoácidos de la invertasa SUC2 de *Saccharomyces cerevisiae*; la invertasa SacC de *Zymomonas*; la invertasa INV1 de *Pichia*; la invertasa INV de *Debaryomyces*; una invertasa de otras fuentes fúngicas, de protistas, de algas, vegetales o eucariótica; o una invertasa de una fuente procariótica como las bacterias corineformes o *Escherichia coli*. En algunas realizaciones, una secuencia polinucleotídica de cualquiera de los métodos de la invención codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o que es idéntica a la secuencia de aminoácidos codificada por el N.º de acceso L47346. En algunas realizaciones, una secuencia polinucleotídica de cualquiera de los métodos de la invención codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o que es idéntica a la secuencia de aminoácidos codificada por la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, una secuencia polinucleotídica de cualquiera de los métodos de la invención es al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o que es idéntica a: la secuencia polinucleotídica del n.º de acceso L47346 o la secuencia polinucleotídica de la SEQ ID NO: 1.

Cultivos de traustóquitridos, biomasas y aceites microbianos

30 La presente invención también se refiere a un cultivo celular de traustóquitridos que comprende cualquiera de las células de traustóquitridos de la invención como se describe en este documento y un medio de cultivo celular que comprende sacarosa como fuente de carbono.

35 En este documento se describe un método de producción de un cultivo celular de traustóquitridos, que comprende transformar una célula de traustóquitridos con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia polinucleotídica que comprende un polipéptido asociado con el metabolismo de sacarosa como se describe en este documento, seleccionar la célula de traustóquitridos transformada y cultivar la célula de traustóquitridos transformada en un medio de cultivo que comprende sacarosa como fuente de carbono, en el que se produce un cultivo celular de traustóquitridos. En este documento se describe un cultivo celular de traustóquitridos producido por el método.

40 En algunas realizaciones, la sacarosa es la fuente de carbono principal en el medio de cultivo celular. En algunas realizaciones, la sacarosa es la única fuente de carbono en el medio de cultivo celular. Las fuentes de sacarosa incluyen, aunque sin limitación, caña de azúcar, remolacha azucarera y otras plantas. La composición de la sacarosa purificada o parcialmente purificada puede ser predominantemente sacarosa, es decir, sacarosa purificada/refinada, extractos de sacarosa crudos o una mezcla de sacarosa, glucosa y fructosa (por ejemplo, melaza).

50 En algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende melaza, un jarabe o jugo de cualquier vegetal productor de sacarosa (por ejemplo, jugo de caña de azúcar o jugo de remolacha azucarera) o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el medio de cultivo comprende una materia prima que contiene celulosa, tal como bagazo de caña de azúcar. En algunas realizaciones, el medio de cultivo celular comprende una sacarosa. Como se describe en este documento, la célula de traustóquitridos secreta una sacarosa heteróloga en el medio de cultivo.

55 Las condiciones de cultivo para células de traustóquitridos incluyen, aunque sin limitación, un medio, biorreactor, temperatura, pH y condiciones de oxígeno eficaces que permiten la producción de proteínas y/o la recombinación. Un medio eficaz se refiere a cualquier medio en que típicamente se cultiva una célula de traustóquitridos. Dicho medio típicamente comprende un medio acuoso que tiene fuentes asimilables de carbono, nitrógeno y fosfato, así como sales, minerales, metales y otros nutrientes apropiados, tales como vitaminas. Las fuentes de nitrógeno incluyen, aunque sin limitación, peptona, extracto de levadura, polipeptona, extracto de malta, extracto de carne, casaminoácidos, licor de macerado de maíz, fuentes de nitrógeno orgánico, glutamato de sodio, urea, fuentes de nitrógeno inorgánico, acetato de amonio, sulfato de amonio, cloruro de amonio, nitrato de amonio y sulfato de sodio. Las condiciones de cultivo no limitantes adecuadas para traustóquitridos se describen, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 5.340.742. también se describen diversos parámetros de fermentación para inocular, cultivar y recuperar la microflora, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos n.º 5.130.242. los medios líquidos o sólidos pueden contener agua salada natural o artificial. Las células de traustóquitridos de la presente invención pueden

cultivarse en biorreactores de fermentación, matraces de agitación, tubos de ensayo, placas de microvaloración y placas Petri.

El volumen de fermentación puede ser cualquier volumen usado para el crecimiento de traustocáritidos, incluyendo volúmenes comerciales e industriales. En algunas realizaciones, el volumen de fermentación (volumen de cultivo) es de al menos 2 l, al menos 10 l, al menos 50 l, al menos 100 l, al menos 200 l, al menos 500 l, al menos 1000 l, a menos 10 000 l, al menos 20 000 l, al menos 50 000 l, al menos 100 000 l, al menos 150 000 l, al menos 200 000 l, al menos 250 000 l, al menos 300 000 l, al menos 350 000 l al menos 400 000 l o al menos 500 000 l. En algunas realizaciones, el volumen de fermentación es de 2 l a 2 000 000 l, de 2 l a 1 000 000 l, de 2 l a 500 000 l, de 2 l a 200 000 l, de 2 l a 100 000 l, de 2 l a 50 000 l, de 2 l a 25 000 l, de 2 l a 20 000 l, de 2 l a 15 000 l, de 2 l a 10 000 l, de 2 l a 5000 l, de 2 l a 1000 l, de 2 l a 500 l o de 2 l a 100 l.

La presente invención también se refiere a un método de producción de una biomasa de traustocáritidos, que comprende cultivar una célula de traustocáritidos de la invención en un medio de cultivo que comprende sacarosa como fuente de carbono, y recoger una biomasa del medio de cultivo. Una biomasa de traustocáritidos es una biomasa celular recogida obtenida por cualquier método convencional para el aislamiento de una biomasa de traustocáritidos, tal como se describe en la patente de Estados Unidos n.º 5.130.242 y la publicación de Estados Unidos n.º 2002/0001833. La biomasa recogida puede contener células de traustocáritidos, así como fragmentos celulares de traustocáritidos.

La presente invención también se refiere a un método de producción de un aceite microbiano que comprende cultivar una célula de traustocáritidos de la invención en un medio de cultivo que comprende sacarosa como fuente de carbono para producir una biomasa, y extraer un aceite de la biomasa. El aceite puede extraerse de una biomasa recién recogida o puede extraerse de una biomasa recogida previamente que se ha almacenado en condiciones que evitan el deterioro. Pueden usarse métodos conocidos para cultivar un traustocáritidos de la invención, para aislar una biomasa del cultivo, para extraer un aceite microbiano de la biomasa y para analizar el perfil de ácidos grasos de los aceites extraídos de la biomasa. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 5.130.242.

Un aceite microbiano puede ser cualquier aceite derivado de cualquier traustocáritidos, incluyendo, por ejemplo: un aceite crudo extraído de la biomasa de un traustocáritido sin procesamiento adicional; un aceite refinado que se obtiene tratando un aceite crudo con procesamiento adicional tal como refinado, blanqueado y/o desodorizado; un aceite diluido obtenido diluyendo un aceite crudo o refinado; o un aceite enriquecido que se obtiene, por ejemplo, tratando un aceite crudo o refinado con métodos adicionales de purificación para aumentar la concentración de un ácido grado en el aceite.

En algunas realizaciones, el aceite crudo puede aislarse de un traustocáritido usando técnicas convencionales, sin someterse a refinamiento o purificación adicional. Por ejemplo, el aceite crudo puede aislarse usando extracción con disolvente, tal como, aunque sin limitación, extracción con hexano o extracción con isopropanol. En algunas realizaciones, el aceite crudo puede aislarse usando métodos de extracción físicos y/o mecánicos tales como, aunque sin limitación, extracción a través del uso de un homogeneizador o por prensado.

En algunas realizaciones, el aceite crudo puede someterse a procesamiento adicional, tal como refinado, desolventización, desodorizado, hibernación, filtración en frío y/o blanqueado. Dichos aceites "procesados" incluyen aceites microbianos que se han sometido a extracción con disolvente y uno o más procesamientos adicionales. En algunas realizaciones, los aceites están mínimamente procesados. Aceites "mínimamente procesados" incluyen aceites microbianos que se han sometido a extracción con disolvente y filtración. En ciertas relaciones, los aceites mínimamente procesados se someten además a hibernación.

En algunas realizaciones, se usa un método similar al proceso FRIOLEX® (Westfalia Separator Industry GmbH, Alemania) para extraer los aceites microbianos producidos por los traustocáritidos. El proceso FRIOLEX® es un proceso de extracción física de aceite basado en agua, por el que la materia prima que contiene aceite puede usarse directamente para extraer aceite sin usar ningún método convencional de extracción con disolvente. En este proceso, puede usarse un disolvente orgánico soluble en agua como auxiliar del proceso y el aceite se separa del caldo de materia prima por separación de densidad usando la gravedad o fuerzas centrifugas. El documento WO 96/05278 divulga dichos métodos de extracción.

Después de haber extraído el aceite, el aceite puede recuperarse o separarse de los componentes no lipídicos por cualquier medio adecuado conocido en la técnica. En algunas realizaciones, se usan técnicas físicas y/o mecánicas de bajo coste para separar las composiciones que contienen lípidos de las composiciones no lipídicas. Por ejemplo, si se crean múltiples fases o fracciones por el método de extracción usado para extraer el aceite, donde una o más fases o fracciones contienen lípidos, un método para recuperar las fases o fracciones que contienen lípidos puede implicar la eliminación física de las fases o fracciones que contienen lípidos de las fases o fracciones no lipídicas, o viceversa. En algunas realizaciones, se usa un método de tipo FRIOLEX® para extraer los lípidos producidos por los microorganismos, y la fase ligera rica en lípidos después se separa físicamente de la fase pesada rica en proteínas (tal como por desnatado de la fase rica en lípidos que está en la parte superior de la fase pesada rica en proteínas después de la separación por densidad).

Los aceites microbianos producidos por traustóquitridos de la presente invención pueden recuperarse de la autólisis o lisis inducida exponiendo las células de traustóquitridos a una condición que incluye, aunque sin limitación, un cierto pH, una cierta temperatura, la presencia de una enzima, la presencia de un detergente, alteraciones físicas o combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, la lisis o autólisis de las células de traustóquitridos se realiza por el uso de fuerzas mecánicas. En realizaciones adicionales de la presente invención, la lisis o autólisis de las células de traustóquitridos va seguida por separación mecánica de los lípidos de las composiciones no lipídicas.

Las enzimas adecuadas que pueden usarse para inducir la lisis de las células de traustóquitridos incluyen, aunque sin limitación, enzimas disponibles en el mercado o mezclas enzimáticas tales como proteinasa K o ALCALASE®. En algunas realizaciones, los traustóquitridos productores de aceite experimentan lisis inducida en presencia de un detergente, tal como detergentes iónicos (catiónicos o aniónicos), detergentes no iónicos, detergentes zwitteriónicos o combinaciones de los mismos. En realizaciones adicionales de la presente invención, los métodos de alteración física tales como molienda mecánica como homogeneización líquida, uso de ondas de sonido de alta frecuencia en sonicación, métodos de ciclos de congelación/descongelación, prensado, extrusión o molienda pueden usarse para inducir la lisis de los traustóquitridos productores de aceite. La extracción de los aceites puede tener lugar en los fermentadores al final de la fermentación por lisis en tanque de las células de traustóquitridos.

En algunas realizaciones, los cultivos celulares, biomasas y aceites microbianos producidos a partir de las células de traustóquitridos de la invención cultivados en sacarosa tienen las mismas características o características sustancialmente similares (por ejemplo, densidades celulares, pesos celulares en seco, productividades de ácido graso y perfiles de ácidos grasos) asociadas con cultivos, biomasa y aceites microbianos producidos a partir de las células de traustóquitridos no transformadas correspondientes cultivadas en glucosa y/o fructosa. En algunas realizaciones, el peso celular en seco de una biomasa producida a partir de un cultivo de traustóquitridos de la invención es mayor después de su crecimiento en sacarosa que el peso celular en seco obtenido en condiciones idénticas del crecimiento de un cultivo de las células de traustóquitridos no transformadas correspondientes en glucosa y/o fructosa. En algunas realizaciones, la cantidad total de ácidos grasos como porcentaje del peso celular en seco de la biomasa es mayor después del crecimiento de un traustóquitrido de la invención en sacarosa que la cantidad obtenida en condiciones idénticas del cultivo de una célula de traustóquitridos no transformada correspondiente en glucosa y/o fructosa.

#### Métodos de producción de composiciones

La presente invención también se refiere a un método de preparación de un producto alimenticio, cosmético, composición industrial o composición farmacéutica para animales o seres humanos, que comprende cultivar una célula de traustóquitridos de la invención en un medio de cultivo que comprende sacarosa como fuente de carbono para producir una biomasa, recoger la biomasa y preparar el producto alimenticio, cosmético, composición industrial o composición farmacéutica para animales o seres humanos a partir de la biomasa.

Las biomasas de traustóquitridos pueden secarse antes de su uso en una composición por métodos que incluyen, aunque sin limitación, secado por congelación, secado al aire, secado por pulverización, secado en embudo, secado al vacío (liofilización) o un proceso similar. Como alternativa, una biomasa recogida y lavada puede usarse directamente en una composición sin secado. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos n.º 5.130.242 y 6.812.009.

En algunas realizaciones, el método de preparación de un producto alimenticio, cosmético, composición industrial o composición farmacéutica para animales o seres humanos comprende además extraer un aceite de la biomasa. Los aceites microbianos pueden usarse como material de partida para producir de forma eficaz un producto enriquecido en un ácido graso tal como DHA o EPA. Por ejemplo, los aceites microbianos pueden someterse a diversas técnicas de purificación conocidas en la técnica, tales como destilación o aducción de urea, para producir un producto de potencia mayor con mayores concentraciones de DHA, EPA u otro ácido graso. Los aceites microbianos también pueden usarse en reacciones químicas para producir compuestos derivados de ácidos grasos en los aceites, tales como ésteres y sales de DHA EPA u otro ácido graso.

Cualquier traustóquitrido que se haya transformado como se describe en este documento para crecer en sacarosa puede seleccionarse para preparar cualquiera de las composiciones descritas basándose en un atributo deseable del traustóquitrido, tal como, aunque sin limitación, la densidad celular de un cultivo celular del traustóquitrido, los porcentajes y tipos de ácidos grasos asociados con la célula seca de una biomasa del traustóquitrido, el perfil de ácidos grasos asociado con la biomasa y/o el aceite microbiano del traustóquitrido, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la biomasa o aceite microbiano de traustóquitridos comprende un mayor porcentaje de ácidos grasos poliinsaturados que ácidos grasos monoinsaturados. En algunas realizaciones, la biomasa o aceite microbiano de traustóquitridos comprende un porcentaje mayor de ácidos grasos omega-3 que ácidos grasos omega-6. En algunas realizaciones, la biomasa o aceite microbiano de traustóquitridos comprende un porcentaje mayor de DHA que otros ácidos grasos omega-3. En algunas realizaciones, la biomasa de traustóquitridos comprende un porcentaje mayor de DHA que otros ácidos grasos poliinsaturados. En algunas realizaciones, la biomasa o aceite microbiano de traustóquitridos comprende un mayor porcentaje de EPA que otros

ácidos grasos omega-3. En algunas realizaciones, la biomasa o aceite microbiano de traustoquítridos comprende un porcentaje mayor de EPA que otros ácidos grasos poliinsaturados.

5 Una composición puede incluir uno o más excipientes. Como se usa en este documento, "excipiente" se refiere a un componente, o mezcla de componentes, que se usa en una composición para dar características deseables a la composición, incluyendo alimentos, así como composiciones farmacéuticas, cosméticas e industriales. Un excipiente puede describirse como un excipiente "farmacéuticamente aceptable" cuando se añade a una composición farmacéutica, lo que significa que el excipiente es un compuesto, material, composición, sal y/o forma de dosificación que es adecuada, dentro del alcance del criterio médico apropiado, para su contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica excesiva u otras complicaciones problemáticas sobre la duración deseada del contacto acorde con una relación de beneficio/riesgo razonable. En algunas realizaciones, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del Gobierno Federal o Estatal o enumerado en la farmacopea estadounidense u otra farmacopea internacional reconocida en líneas generales para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos. Pueden usarse diversos excipientes. En algunas realizaciones, el excipiente puede ser, aunque sin limitación, un agente alcalino, un estabilizante, un antioxidante, un agente de adhesión, un agente de separación, un agente de recubrimiento, un componente de fase exterior, un componente de liberación controlada, un disolvente, un tensioactivo, un humectante, un agente tamponante, un relleno, un emoliente o combinaciones de los mismos. Los excipientes, además de los analizados en este documento, pueden incluir excipientes enumerados en, aunque sin limitación, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21.<sup>a</sup> ed. (2005).

25 En algunas realizaciones, la composición es un producto alimenticio. Un producto alimenticio es cualquier alimento para consumo por animales o seres humanos, e incluye composiciones tanto sólidas como líquidas. Un producto alimenticio puede ser un aditivo para alimentos para animales o seres humanos. Los alimentos incluyen, aunque sin limitación, alimentos comunes; productos líquidos, incluyendo leches, bebidas, bebidas terapéuticas y bebidas nutritivas; alimentos funcionales; suplementos; nutraceúticos; fórmulas infantiles, incluyendo fórmulas para bebés prematuros; alimentos para mujeres embarazadas o mujeres en periodo de lactancia; alimentos para adultos; alimentos geriátricos; y alimentos para animales.

30 En algunas realizaciones, una biomasa o aceite microbiano de traustoquítridos puede usarse directamente como o incluirse como un aditivo dentro de uno o más de: un aceite, materia grasa, producto para untar, otro ingrediente graso, bebida, salsa, alimento de base láctea o de soja (tal como leche, yogur, queso y helado), un alimento horneado, un producto nutritivo, por ejemplo, como un suplemento nutritivo (en forma de cápsula o comprimido), un suplemento vitamínico, un suplemento dietético, una bebida energética, un producto alimenticio en polvo acabo o semiacabado y combinaciones de los mismos.

35 Una lista parcial de composiciones alimenticias que pueden incluir un aceite microbiano incluye, aunque sin limitación, productos de base de soja (leches, helados, yogures, bebidas, cremas, productos para untar, blanqueadores); sopas y mezclas de sopa; pastas, masas y artículos alimenticios horneados incluyendo, por ejemplo, productos de pastelería fina, cereales de desayuno, tortas, pasteles de queso, empanadas, magdalenas, galletas, barras, panes, rosquillas, bizcochos, muffins, pasteles, bollos, picatostes, tentempié, golosinas, pasteles de merienda, empanadas, barras de granola/aperitivo y pastas tostadas; dulces; confitería dura; chocolate y otro tipo de confitería; chicles; productos alimenticios líquidos, por ejemplo, leches, bebidas energéticas, fórmulas infantiles, bebidas carbonatadas, té, comidas líquidas, zumos de frutas, bebidas basadas en frutas, bebidas basadas en hortalizas; jarabes multivitamínicos, sustitutos de comidas, alimentos medicinales y jarabes; mezclas de bebidas energéticas; pasta; producto de pescado procesados; productos de carne procesados; productos de aves de corral procesados; jugos y salsas; condimentos (salsa de tomate, mahonesa, etc.); productos para untar a base de aceite vegetal; productos lácteos; yogur; mantequillas; productos lácteos congelados; helados; postres congelados; yogures congelados; productos alimenticios semisólidos tales como alimentos para bebés; pudines y postres de gelatina; queso procesado y no procesado; mezclas de panqueques; barras alimenticias incluyendo barras energéticas; mezclas de gofres; aderezos de ensalada; mezclas sustitutivas de huevo; frutos secos y aderezos basados en frutos secos; aperitivos salados tales como patatas fritas y otros fritos y crujientes, fritura de maíz, tortitas fritas, aperitivos extruidos, palomitas de maíz, galletas saladas, patatas fritas y frutos secos; especialmente aperitivos tales como salsas, aperitivos de frutos secos, aperitivos de carne, cortezas de cerdo, barras alimenticias saludables y tortas de arroz/maíz.

50 En algunas realizaciones, un aceite microbiano puede usarse para complementar una fórmula infantil. La fórmula infantil puede complementarse con un aceite microbiano en solitario o en combinación con un aceite físicamente refinado derivado de un microorganismo que produce ácido araquidónico (ARA). Un microorganismo que produce ARA, por ejemplo, es *Mortierella alpina* o *Mortierella* sect. *Schmuckeri*. Como alternativa, las fórmulas infantiles pueden complementarse con un aceite microbiano en combinación con un aceite rico en ARA, incluyendo ARASCO® (Martek Biosciences, Columbia, MD).

65 En algunas realizaciones, la composición es un pienso para animales. Un "animal" significa cualquier organismo no humano que pertenece al reino Animalia e incluye, sin limitación, animales acuáticos y animales terrestres. La expresión "pienso para animales" o "alimento para animales" se refiere a cualquier alimento destinado a animales no

humanos, sea para peces; peces comerciales; peces ornamentales; larvas de peces; bivalvos; moluscos; crustáceos; mariscos; camarón; larva de camarón; artemia, rotíferos, camarones en salazón; filtradores; anfibios; reptiles; mamíferos; animales domésticos; animales de granja; animales de zoológico; animales para deportes; de reproducción; animales de carreras; animales de exhibición; animales de crianza; animales raros o en peligro; animales de compañía; mascotas tales como perros, gatos, cobayas, conejos, ratas, ratones o caballos; primates tales como monos (por ejemplo, cebus, macaco, verde africano, patas, cynomolgus y cercopithecus), simios, orangutanes, babuinos, gibones y chimpancés; cánidos tales como perros y lobos, félicos tales como gatos, leones y tigres; équidos tales como caballos, burros y cebras; animales para alimentación tales como vacas, ganado bovino, cerdos y ovejas; ungulados tales como ciervos y jirafas; roedores tales como ratones, ratas, hámsteres y cobayas; y así sucesivamente. Un pienso para animales incluye, aunque sin limitación, un pienso de acuicultura, un pienso para animales domésticos incluyendo pienso para mascotas, un pienso para animales de zoológico, un pienso para animales de trabajo, un pienso para ganado o una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, la composición es un pienso o suplemento para piensos para cualquier animal cuya carne o productos se consumen por los seres humanos, tal como cualquier animal del que se obtiene carne, huevos o leche para consumo humano. Cuando se alimenta a dichos animales, pueden incorporarse nutrientes tales como LC-PUFA en la carne, la leche, los huevos u otros productos de dichos animales para aumentar su contenido de estos nutrientes.

En algunas realizaciones, la composición es un material secado por pulverización que puede desmenuzarse para formar partículas de un tamaño apropiado para su consumo por zooplancton, artemias, rotíferos y filtradores. En algunas realizaciones, el zooplancton, las artemias o los rotíferos alimentados por la composición se suministran a su vez a larvas de peces, peces, marisco, bivalvos o crustáceos.

En algunas realizaciones, la composición es una composición farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas adecuadas incluyen, aunque sin limitación, una composición antiinflamatoria, un fármaco para el tratamiento de cardiopatía coronaria, un fármaco para el tratamiento de arteriosclerosis, un agente quimioterapéutico, un excipiente activo, un fármaco para la osteoporosis, un antidepresivo, un anticonvulsivo, un fármaco contra *Helicobacter pylori*, un fármaco para el tratamiento de enfermedad neurodegenerativa, un fármaco para el tratamiento de enfermedad hepática degenerativa, un antibiótico, una composición que reduce el nivel de colesterol y una composición que reduce el nivel de triglicéridos. En algunas realizaciones, la composición es un alimento médico. Un alimento médico incluye un alimento que está en una composición a consumirse o administrarse de forma externa bajo la supervisión de un médico y que está destinada para el tratamiento dietético específico de una afección, para la que se establecen necesidades nutritivas distintivas, basándose en los principios científicos reconocidos, por evaluación médica.

En algunas realizaciones, el aceite microbiano puede formularse en una forma de dosificación. Las formas de dosificación pueden incluir, aunque sin limitación, comprimidos, cápsulas, sobres, píldoras, pastillas, polvos y gránulos, y formas parenterales de dosificación, que incluyen, aunque sin limitación, soluciones, suspensiones, emulsiones y polvos secos que comprenden una cantidad eficaz del aceite microbiano. También es sabido en la técnica que dichas formulaciones también pueden contener diluyentes, rellenos, disgregantes, aglutinantes, lubricantes, tensioactivos, vehículos hidrófobos, vehículos hidrosolubles, emulsionantes, tampones, humectantes, hidratantes, solubilizantes, conservantes y similares farmacéuticamente aceptables. Las formas de administración pueden incluir, aunque sin limitación, comprimidos, grageas, cápsulas, comprimidos encapsulados y píldoras, que contienen el aceite microbiano y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados.

Para administración oral, el aceite microbiano puede combinarse con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Dichos vehículos posibilitan que los aceites microbianos se formen como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, compuestos líquidos, suspensiones y similares, para ingesta oral por un sujeto a tratar. En algunas realizaciones, la forma de dosificación es un comprimido, píldora o comprimido encapsulado. Las preparaciones farmacéuticas para uso oral pueden obtenerse añadiendo un excipiente sólido, opcionalmente moliendo la mezcla resultante y procesando la mezcla de gránulos, después de añadir auxiliares adecuados, si se desea para obtener comprimidos o núcleos de gragea. Los excipientes adecuados incluyen, aunque sin limitación, rellenos tales como azúcares incluyendo, aunque sin limitación, lactosa, sacarosa, manitol y sorbitol; preparaciones de celulosa tales como, aunque sin limitación, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio y polivinilpirrolidona (PVP). Si se desea, pueden añadirse agentes disgregantes tales como, aunque sin limitación, la polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido algínico o una sal del mismo tal como alginato de sodio. Las preparaciones farmacéuticas que pueden usarse por vía oral incluyen, aunque sin limitación, cápsulas de ajuste por presión hechas de gelatina, así como cápsulas selladas blandas hechas de gelatina y un plastificante, tal como glicerol o sorbitol.

En algunas realizaciones, la composición es un cosmético, los cosméticos incluyen, aunque sin limitación, emulsiones, cremas, lociones, máscaras, jabones, champús, limpiadores, cremas faciales, acondicionadores, maquillajes, agentes de baño y líquidos de dispersión. Los agentes cosméticos pueden ser medicinales o no medicinales.

En algunas realizaciones, la composición es una composición industrial. En algunas realizaciones, la composición es un material de partida para uno o más productos fabricados. Un producto fabricado incluye, aunque sin limitación, un polímero; un material fotosensible fotográfico; un detergente; un aceite industrial; o un detergente industrial. Por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 7.259.006 describe el uso de una grasa y aceite que contiene DHA para la producción de ácido behénico y la producción de materiales sensibles fotográficos usando ácido behénico.

#### Métodos de producción de biocombustibles

En este documento se describe un método para producir un biocombustible a partir de un traustokuítrido recombinante de la invención.

Como se usa en este documento, "biocombustible" se refiere a cualquier combustible que se produce a partir de y usando una biomasa o un aceite microbiano de un traustokuítrido de la invención incluyendo, aunque sin limitación, un biodiésel, un diésel renovable, un diésel renovable coprocesado, un biocombustible de aviones, un aceite de calefacción y un aditivo de combustible. Puede usarse cualquier método conocido en la técnica para generar un biocombustible a partir de las biomásas y aceites microbianos de los traustokuítridos de la presente invención incluyendo, aunque sin limitación, cualquier método descrito en el documento WO 2005/035693, la publicación de Estados Unidos n.º 2005/0112735, 2007/027633, el documento WO 2006/127512, la publicación de Estados Unidos n.º 2007/0099278, la publicación de Estados Unidos n.º 2007/0089356, el documento WO 2008/067605, la publicación de Estados Unidos n.º 2009/0035842 y la publicación de Estados Unidos n.º 2009/0064567. Cualquiera de los biocombustibles descritos en este documento puede mezclarse con un combustible fósil. Por ejemplo, un biodiésel puede mezclarse con un diésel fósil a relaciones de un 1 %-99 %. Como se describe en este documento un aceite microbiano de un traustokuítrido de la invención se usa como punto de partida para la producción de un biocombustible, aunque no se haya sometido a procesamiento convencional. Los ejemplos de procesamiento convencional que puede evitarse incluyen refinado (por ejemplo, refinado físico, refinado en sílice o refinado cáustico), desolventización, desodorizado, hibernación, filtración en frío y/o blanqueado. Por tanto, como se describe en este documento, los aceites no se han sometido a refinado, desolventización, desodorizado, hibernación, filtración en frío, blanqueado o una combinación de los mismos.

Como se describe en este documento el método de producción de un biocombustible comprende cultivar un traustokuítrido de la invención en un medio de cultivo que comprende sacarosa como fuente de carbono para producir una biomasa, extraer un aceite de la biomasa y producir un biocombustible transesterificando el aceite, craqueando el aceite, procesando el aceite por despolimerización térmica, añadiendo el aceite a un proceso de refinado de petróleo tradicional o una combinación de los mismos.

Como se describe en este documento el biocombustible se produce transesterificando el aceite. En algunas realizaciones, el biocombustible es un biodiésel. Se conocen diversas formas de biodiésel e incluyen, aunque sin limitación, biodiéseles descritos en el documento WO 07/061903, la patente de Estados Unidos n.º 7.172.635, la patente EP n.º 1 227 143, el documento WO 02/38709, el documento WO 02/38707 y la publicación de Estados Unidos n.º 2007/0113467. La transesterificación de los triglicéridos en el aceite produce ésteres de ácido graso de cadena larga, es decir, ésteres de alquilo y puede realizarse por cualquier método conocido en la técnica para la producción de biocombustibles. Como se describe en este documento el éter de alquilo es un éster de metilo o un éster de etilo. Como se describe en este documento la extracción del aceite de la biomasa de traustokuítridos y la transesterificación del aceite pueden realizarse simultáneamente. En algunas realizaciones, la extracción del aceite de la biomasa de traustokuítridos y la transesterificación del aceite se realizan por separado. Véase, por ejemplo, la publicación de Estados Unidos n.º 2009/0064567.

Como se describe en este documento la transesterificación se realiza usando un alcohol de alquilo inferior y un catalizador ácido o básico. Los alcoholes adecuados para su uso en la presente invención incluyen cualquier alcohol de alquilo inferior que contenga de 1 a 6 átomos de carbono (es decir, un alcohol de alquilo C<sub>1-6</sub>, tal como alcoholes de metilo, etilo, isopropilo, butilo, pentilo, hexilo e isómeros de los mismos). Como se describe en este documento el alcohol comprende de un 5 % en peso a un 70 % en peso, de un 5 % en peso a un 60 % en peso, de un 5 % en peso a un 50 % en peso, de un 7 % en peso a un 40 % en peso, de un 9 % en peso a un 30 % en peso o de un 10 % en peso a un 25 % en peso de la mezcla de composición oleosa, el alcohol y una base catalítica. Como se describe en este documento la composición oleosa y la base pueden añadirse a etanol puro o metanol puro. La cantidad de alcohol usada puede variar con la solubilidad del aceite en el alcohol. Puede usarse cualquier base conocida en la técnica que sea adecuada para su uso como reactivo, incluyendo bases de la fórmula ROM, en la que M es un catión monovalente y RO es un alcóxido de un alcohol de alquilo C<sub>1-6</sub>. Los ejemplos de bases adecuadas incluyen, aunque sin limitación, sodio elemental, metóxido de sodio, etóxido de sodio, metóxido de potasio y etóxido de potasio. Como se describe en este documento la base es etóxido de sodio. Como se describe en este documento la base se añade a la reacción con la composición oleosa y el alcohol en una cantidad de 0,05 a 2,0 equivalentes molares de triglicéridos en el aceite, de 0,05 a 1,5 equivalentes molares, de 0,1 a 1,4 equivalentes molares, de 0,2 a 1,3 equivalentes molares o de 0,25 a 1,2 equivalentes molares. El aceite que comprende triglicéridos, el alcohol y la base se hacen reaccionar juntos a una temperatura y durante una cantidad de tiempo que permite la producción de un éster a partir de los restos de ácido graso y el alcohol. Como se describe en este documento la reacción de la composición en presencia de un alcohol y una base se realiza a una temperatura de

20 °C a 140 °C, de 20 °C a 120 °C, de 20 °C a 110 °C, de 20 °C a 100 °C o de 20 °C a 90 °C. Como se describe en este documento la reacción de la composición en presencia de un alcohol y una base se realiza a una temperatura de al menos 20 °C, al menos 75 °C, al menos 80 °C, al menos 85 °C, al menos 90 °C, al menos 95 °C, al menos 105 °C o al menos 120 °C. Como se describe en este documento la reacción de la composición en presencia de un alcohol y una base se realiza a una temperatura de 20 °C, 75 °C, 80 °C, 85 °C, 90 °C, 95 °C, 105 °C o 120 °C. Como se describe en este documento la reacción de la composición en presencia de un alcohol y una base se realiza durante un tiempo de 2 horas a 36 horas, de 3 horas a 36 horas, de 4 horas a 36 horas, de 5 horas a 36 horas o de 6 horas a 36 horas. Como se describe en este documento la reacción de la composición en presencia de un alcohol y una base se realiza durante 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 10, 12, 16, 20, 24, 28, 32 o 36. Como se describe en este documento la reacción de la composición oleosa, el alcohol y la base puede realizarse llevando a reflujo los componentes para producir los ésteres de ácido graso, tales como los ésteres de PUFA. Como se describe en este documento la reacción de la composición oleosa puede realizarse a una temperatura que no provoca el reflujo de los componentes de reacción. Por ejemplo, llevar a cabo la reacción de la composición oleosa a presiones mayores de la presión atmosférica puede aumentar el punto de ebullición de los disolventes presentes en la mezcla de reacción. En dichas condiciones, la reacción puede producirse a una temperatura en la que los disolventes hervirían a presión atmosférica, pero no provocaría el reflujo de los componentes de reacción. Como se describe en este documento la reacción se realiza a una presión de 34,47 kPa (5 libras por pulgada cuadrada (psi)) a 137,89 kPa (20 psi), de 48,26 kPa (7 psi) a 103,42 kPa (15 psi); o de 62,05 kPa (9 psi) a 82,73 kPa (12 psi). Como se describe en este documento la reacción se realiza a una presión de 48,26 kPa (7 psi), 55,15 kPa (8 psi), 62,05 kPa (9 psi), 68,94 kPa (10 psi), 75,84 kPa (11 psi) o 82,73 kPa (12 psi). Las reacciones realizadas a presión pueden realizarse a las temperaturas de reacción enumeradas anteriormente. Como se describe en este documento las reacciones realizadas a presión pueden realizarse a al menos de 20 °C a 140 °C, de 20 °C a 120 °C, 20 °C 110 °C, de 20 °C a 100 °C o de 20 °C a 90 °C. Como se describe en este documento las reacciones realizadas a presión pueden realizarse a al menos 70 °C, al menos 75 °C, al menos 80 °C, al menos 85 °C o al menos 90 °C. Como se describe en este documento las reacciones realizadas a presión pueden realizarse a 70 °C, 75 °C, 80 °C, 85 °C o 90 °C.

Las cantidades reducidas de PUFA en un aceite usadas para producir un biocombustible, tal como un biodiésel pueden aumentar la densidad de energía del biocombustible y pueden reducir la cantidad de sitios para oxidación potencial o sulfatación. Como se describe en este documento la biomasa de traustóquitridos o aceite microbiano, o la fracción de triglicéridos del mismo, comprende un porcentaje mayor de ácidos grasos monoinsaturados que ácidos grasos poliinsaturados. Como se describe en este documento el aceite microbiano se fracciona para eliminar los ácidos grasos poliinsaturados. Como se describe en este documento el aceite se hidrogena para convertir los ácidos grasos poliinsaturados en ácidos grasos monoinsaturados. Para asegurar que pueden quemarse porcentajes mayores de biocombustible derivado de aceite microalgáceo, puede usarse cualquier método de hidrogenación parcial o total de aceites, como es rutinario en la fabricación de margarinas. Como se describe en este documento los traustóquitrido que producen niveles bajos de PUFA se usan para producir los aceites microbianos. Como se describe en este documento se seleccionan traustóquitridos de la invención que producen mayores cantidades de ácidos grasos monoinsaturados que ácidos grasos poliinsaturados. Como se describe en este documento menos de un 50 % de los ácidos grasos insaturados en el aceite biológico son PUFA. Como se describe en este documento los ácidos grasos insaturados en el aceite biológico contienen menos de un 40 %, menos de un 30 %, menos de un 20 %, menos de un 10 % o menos de un 5 % de PUFA. Como se describe en este documento el aceite microbiano comprende menos de un 50 %, menos de un 40 %, menos de un 30 %, menos de un 20 %, menos de un 10 % o menos de un 5 % en peso de PUFA.

Además de los métodos de transesterificación descritos anteriormente, también pueden usarse otras técnicas de reducción de la viscosidad de los aceites microbianos para producir biocombustibles. Estas técnicas incluyen, aunque sin limitación, el uso de lipasas, catálisis supercrítica con metanol y el uso de sistemas de células completas que implican la sobreexpresión citoplasmática de lipasas en una célula hospedadora seguida por permeabilización del hospedador para permitir la catálisis de transesterificación de triglicéridos dentro del citoplasma. Como se describe en este documento una célula de traustóquitridos de la invención también comprende una secuencia polinucleotídica que codifica una lipasa para la catálisis de transesterificación de triglicéridos dentro del citoplasma. Véanse, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 7.226.771, la publicación de Estados Unidos n.º 2004/0005604, el documento WO 03/089620, el documento WO 05/086900, la publicación de Estados Unidos n.º 2005/0108789, el documento WO 05/032496, el documento WO 05/108533, la patente de Estados Unidos n.º 6.982.155, el documento WO 06/009676, el documento WO 06/133698, el documento WO 06/037334, el documento WO 07/076163, el documento WO 07/056786 y el documento WO 06/124818.

Como se describe en este documento el biocombustible se produce por craqueo del aceite. En algunas realizaciones, el biocombustible es un biocombustible de aviones. En la técnica se entiende que "craqueo" describe la reducción de la longitud de la cadena de los ácidos grasos en un aceite por métodos tales como los usados en la industria de aceites. Como se describe en este documento la presencia de una cantidad significativa de ácido graso poliinsaturado en el aceite proporcionará mayor flexibilidad y diversidad para la producción de hidrocarburos, ya que los múltiples sitios de insaturación en un ácido graso poliinsaturado proporcionan múltiples sitios para la escisión para generar hidrocarburos. Por ejemplo, ciertos combustibles de aviones requieren hidrocarburos con dos a ocho

carbonos. Los ácidos grasos poliinsaturados pueden escindirse a través de procesos conocidos en la técnica, tales como craqueo para producir hidrocarburos más cortos de diversas longitudes de cadena.

5 Como se describe en este documento el biocombustible se produce por despolimerización térmica. En algunas realizaciones, el biocombustible es un diésel renovable. Como se usa en este documento la despolimerización térmica incluye cualquier proceso para la producción de diésel renovable usando agua sobrecalentada.

10 Como se describe en este documento el biocombustible se produce añadiendo el aceite a un proceso de refinado del petróleo durante la producción del combustible diésel. Como se describe en este documento el biocombustible es un diésel renovable coprocesado.

15 Habiendo descrito en líneas generales esta invención, puede obtenerse una comprensión adicional por acceso a los ejemplos proporcionados en este documento. Estos ejemplos son con fines ilustrativos únicamente y no pretenden ser limitantes.

#### Ejemplo 1

##### Construcción del vector de expresión pCL0076

20 El vector pAB0018 (N.º de acceso de ATCC PTA-9616) se digirió con *Bam*HI y *Nde*I dando como resultado dos fragmentos de 838 pb y 9879 pb de longitud. El fragmento de 9879 pb se fraccionó mediante técnicas electroforéticas convencionales en un gel de agar, se purificó utilizando kits de purificación de ADN comerciales y se ligó a una secuencia (SEQ ID NO: 1) que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica la señal de secreción nativa de la proteína Sec1 de *Schizochytrium* sp. número de ATCC 20888 seguido de una secuencia  
25 sintética que codifica la proteína invertasa madura (SUC2) de *Saccharomyces cerevisiae*, con codones optimizados utilizando la tabla de uso de codones de *Schizochytrium* de la FIG. 1 (la optimización de codones se realizó en Blue Heron Biotechnology, Bothell, WA). La secuencia de fusión que contiene las secuencias que codifican el péptido señal de Sec1 de *Schizochytrium* y la proteína invertasa secretada SUC2 de *Saccharomyces cerevisiae* (N.º de acceso de GenBank P00724) se insertó en el vector de *Schizochytrium* pSchiz, seguido de la digestión con *Bam*HI y  
30 *Nde*I para producir la SEQ ID NO: 1.

Después, se utilizó el producto de ligamiento para transformar una cepa suministrada de forma comercial de células de *E. coli* DH5 $\alpha$  (Invitrogen), utilizando los protocolos del fabricante. Se propagaron varios de los clones resultantes y sus plásmidos se extrajeron y purificaron. Estos plásmidos se exploraron después mediante digestiones de  
35 restricción y/o PCR para confirmar que el ligamiento generó los vectores plasmídicos esperados. Uno de tales vectores plasmídicos, resultante del ligamiento del fragmento de 9879 pb y la SEQ ID NO. 1, se verificó mediante secuenciación de Sanger y se denominó pCL0076 (SEQ ID NO: 2). Véase la FIG. 2.

#### Ejemplo 2

##### 40 Crecimiento de *Schizochytrium* en sacarosa

Se cultivaron cultivos de *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 y un derivado genéticamente modificado de *Schizochytrium*, denominado B76-32, en medio M2B que consiste en glucosa 10 g/l, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,8 g/l, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 g/l,  
45 MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O 2 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 g/l, KCl 0,5 g/l, CaCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O 0,1 g/l, MES 0,1 M (pH 6,0) metales PB26 al 0,1 % y vitaminas PB26 al 0,1 % PB26 (v/v). Las vitaminas PB26 consistían en vitamina B12 50 mg/ml, tiamina 100 mg/ml, y Ca-pantotenato 100 mg/ml. Los metales PB26 se ajustaron a pH 4,5 y consistían en FeSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O 3 g/l, MnCl<sub>2</sub>•4H<sub>2</sub>O 1 g/l, ZnSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O 800 mg/ml, CoCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O 20 mg/ml, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O 10 mg/ml, CuSO<sub>4</sub>•5H<sub>2</sub>O 600 mg/ml y NiSO<sub>4</sub>•6H<sub>2</sub>O 800 mg/ml. Las soluciones madre de PB26 se esterilizaron por filtración por separado y se añadieron  
50 al caldo después del tratamiento con autoclave. La glucosa, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y CaCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O se autoclavaron cada uno de forma separada de los ingredientes del caldo restantes, antes de mezclar, para impedir la precipitación de sales y la caramelización de los hidratos de carbono. Todos los ingredientes del medio se adquirieron en Sigma Chemical (St. Louis, MO). La cepa B76-32 es un derivado de *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 diseñado técnicamente de acuerdo con la Patente de Estados Unidos N.º 7.211.418 y las Publicaciones de Estados Unidos N.º 2008/0022422 y  
55 2008/0026434.

Los cultivos de *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 y B76-32 se cultivaron hasta la fase logarítmica y se transformaron con el vector pCL0076 utilizando electroporación con un pretratamiento enzimático, como se describe a  
60 continuación.

*Electroporación con pretratamiento enzimático* - Las células se cultivaron en 50 ml de medio M50-20 (véase la publicación de Estados Unidos n.º 2008/0022422) en un agitador a 200 r.p.m. durante 2 días a 30 °C. Las células se diluyeron a 1:100 en medio M2B (véase el siguiente párrafo) y se cultivaron durante una noche (16-24 h), intentando alcanzar la fase semilogarítmica de crecimiento (DO<sub>600</sub> de 1,5-2,5). Las células se centrifugaron en un tubo cónico  
65 de 50 ml durante 5 min a aproximadamente 3000 x g. El sobrenadante se retiró y las células se resuspendieron en manitol 1 M, pH 5,5, en un volumen adecuado para alcanzar una concentración final de 2 unidades DO<sub>600</sub>. Se

separaron en alícuotas 5 ml de las células en un matraz de agitación de 25 ml y se modificó con  $\text{CaCl}_2$  10 mM (solución madre 1,0 M, esterilizada en filtro) y 0,25 mg/ml de proteasa XIV (solución madre de 10 mg/ml, esterilizada en filtro; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Los matraces se incubaron en un agitador a 30 °C y aproximadamente 100 r.p.m. durante 4 h. Las células se controlaron al microscopio para determinar el grado de formación de protoplastos, con las células individuales deseadas. Las células se centrifugaron durante 5 min a aproximadamente 2500 x g en tubos de fondo redondo (es decir, tubos Falco™ de 14 ml, BD Biosciences, San José, CA). El sobrenadante se retiró y las células se resuspendieron suavemente con 5 ml de glicerol al 10 % enfriado en hielo. Las células se volvieron a centrifugar durante 5 min a aproximadamente 2500 x g en tubos de fondo redondo. El sobrenadante se retiró y las células se resuspendieron suavemente con 500 µl de glicerol al 10 % enfriado en hielo, usando puntas de pipeta de orificio ancho. Se separaron en alícuotas 90 µl de células en una electrocubeta prerrefrigerada (cubeta Gene Pulser® - espacio de 0,1 cm o espacio de 0,2 cm Bio-Rad, Hercules, CA). Se añadió de 1 µg a 5 µg de ADN (en menos de o igual a un volumen de 10 µl) a la cubeta, se mezclaron suavemente con una punta de pipeta y se colocaron en hielo durante 5 min. Las células se sometieron a electroporación a 200 ohm (resistencia), 25 µF (capacitancia) y 250 V (para un espacio de 0,1 cm) o 500 V (espacio de 0,2 cm). Se añadieron 0,5 ml de medio M50-20 inmediatamente a la cubeta. Las células entonces se transfirieron a 4,5 ml de medio M50-20 en un matraz de agitación de 25 ml y se incubaron durante 2-3 h a 30 °C y aproximadamente 100 r.p.m. en un agitador. Las células se centrifugaron durante 5 min a aproximadamente 2500 x g en tubos de fondo redondo. El sobrenadante se retiró y el sedimento celular se resuspendió en 0,5 ml de medio M50-20. Las células se sembraron en placas en una cantidad apropiada (2 a 5) de placas M2B con selección apropiada (si era necesario) y se incubaron a 30 °C.

Los transformantes se seleccionaron para el cultivo en medio M2B + SMM o se seleccionaron directamente para el cultivo en sacarosa, mediante la siembra en placas en MSFM + sacarosa. Para la selección de MSFM + sacarosa, después de 1-2 semanas se volvieron a sembrar colonias en placas con varios pases en medio que contenía sacarosa recién preparado. Se determinó que la expresión de invertasa se puede utilizar como un marcador de selección para colonias de traustóquitridos cultivadas en sacarosa como única fuente de carbono.

Para los siguientes experimentos, se seleccionaron transformantes primarios para el cultivo en medio M2B sólido que contenía agar 20 g/l (VWR, West Chester, PA) y SMM 10 µg/ml (Chem Service, Westchester, PA) después de 2-6 días de incubación a 27 °C. Todos los transformantes primarios se transfirieron de forma manual a placas de M2B con SMM recién preparadas. Después de 1 semana las colonias se transfirieron a MSFM y sacarosa 5 g/l sin SMM. Después de 1 semana, las colonias más grandes se transfirieron a placas de medio MSFM/sacarosa recién preparadas. Diez de los transformantes de *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 cultivados en sacarosa se seleccionaron para la caracterización adicional y se denominaron 1-1, 1-3, 1-24, 3-1, 3-2, 3-5, 3-21, 4-1, 4-24 y 4-31, respectivamente. Nueve de los transformantes de B76-32 cultivados en sacarosa se seleccionaron para la caracterización adicional y se denominaron B76-32 n.º 2, n.º 12, n.º 19, n.º 26, n.º 30, n.º 39, n.º 42, n.º 56 y n.º 61.

Las colonias cultivadas en sacarosa (1-1, 1-3, 1-24, 3-1, 3-2, 3-5, 3-21, 4-1, 4-24, 4-31) se retiraron de las placas utilizando un asa de siembra y se transfirieron a tubos de cultivo que contenían 5 ml de medio de sacarosa, y se cultivaron durante 4 días a 29 °C en un agitador. Se utilizaron 2 ml de este cultivo para inocular 50 ml de medio (MSFM o SSFM) en matraces de 250 ml y se cultivaron a 29 °C en un agitador a 200 rpm.

Los matraces de control de la cepa parental *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 se cultivaron del mismo modo pero utilizando medio que contenía glucosa. Las células se recogieron 7 días después. Las células se centrifugaron y se lavaron con una mezcla de isopropanol:agua destilada al 50 %. Las células sedimentadas se liofilizaron, se pesaron, y se realizó el análisis de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME, forma siglada de *fatty acid methyl esters*). Para el análisis de FAME, se extrajeron aceites de los cultivos celulares utilizando procedimientos convencionales y se analizaron en cuanto a la composición de ácidos grasos como porcentaje de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) totales. Véase, por ejemplo, la Publicación de Estados Unidos N.º 2010/0239533. Se sometió a ensayo el crecimiento y el contenido en grasa de los transformantes de CL0076 de *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 o B76-32 de forma gravimétrica y mediante cromatografía de gases de los aceites derivatizados, como se describió anteriormente en la Publicación de Estados Unidos N.º 2008/0022422.

Los resultados se muestran en las Tablas 5-8. Los pesos secos y el contenido en grasa de los sedimentos procedentes de los cultivos en matraces de agitación de los transformantes, así como de las cepas parentales se muestran en las FIG. 3-8.

Medio SSFM: glucosa o sacarosa 50 g/l,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  13,6 g/l,  $\text{K}_2\text{SO}_4$  0,7 g/l, KCl 0,36 g/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  2,3 g/l, MES 0,1 M (pH 6,0),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1,2 g/l, glutamato monosódico 0,13 g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,056 g/l y  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,2 g/l. Se añadieron vitaminas a 1 ml/l a partir de una reserva que consistía en vitamina B12 0,16 g/l, tiamina 9,7 g/l y Ca-pantotenato 3,3 g/l. Se añadieron oligoelementos a 2 ml/l a partir de una reserva que consistía en ácido cítrico 1 g/l,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5,2 g/l,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  1,5 g/l,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,5 g/l,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0,02 g/l,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,02 g/l,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  1,0 g/l y  $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1,0 g/l, ajustado a pH 2,5.

Medio SFM modificado (MSFM): glucosa o sacarosa 10 g/l, NaCl 25,0 g/l, KCl 1,0 g/l,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,2 g/l, 5 g/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5,0 g/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 g/l,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0,3 g/l, HEPES 0,1 M (pH 7,0), metales PB26 al 0,1 % y

Vitaminas PB260 al 1 % (v/v). Las vitaminas se añadieron a 2 ml/l a partir de una reserva que consistía de vitamina B12 0,16 g/l, tiamina 9,7 g/l y Ca-pantotenato 3,3 g/l. Se añadieron oligoelementos a 2 ml/l a partir de una reserva que consistía en ácido cítrico 1 g/l, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 5,2 g/l, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 1,5 g/l, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1,5 g/l, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0,02 g/l, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,02 g/l, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 1,0 g/l y NiSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O 1,0 g/l, ajustado a pH 2,5.

La Tabla 5 muestra el crecimiento y los niveles de grasa de *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 cultivado en MSFM con glucosa, fructosa, sacarosa o sin añadir una fuente de carbono.

La Tabla 6 muestra el peso seco y el % de ácidos grasos para *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 cultivado en medio MSFM con glucosa (control) y para las líneas celulares transformadas de *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 cultivadas en medio MSFM con sacarosa.

La Tabla 7 muestra el peso seco y el % de ácidos grasos para *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 cultivado en medio SSFM con glucosa (control) y para las líneas celulares transformadas de *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 cultivadas en medio SSFM con sacarosa.

La Tabla 8 muestra el peso seco y el % de ácidos grasos para *Schizochytrium* B76-32 cultivado en medio SSFM con glucosa (control) y para las líneas celulares transformadas de *Schizochytrium* B76-32 cultivadas en medio SSFM con sacarosa.

Tabla 5. Crecimiento y niveles de grasa en *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 cultivado en MSFM con glucosa, fructosa, sacarosa o sin añadir una fuente de carbono

	Glucosa	Fructosa	Sacarosa	Sin añadir carbono
PS (g/l)	2,84	2,65	0,16	0,11
% AG	66,5	65,3	ND	ND
PS = Peso seco AG = Ácidos grasos				

Tabla 6. Líneas celulares transformadas de *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 cultivadas en medio MSFM con sacarosa

	control de 20888	1-1	1-3	3-2	3-5	3-21	4-1	4-24	4-31
PS (g/l)	2,94	2,49	2,79	2,21	2,60	2,64	2,44	3,05	2,24
% AG	70,87	70,79	72,36	67,97	69,78	71,05	68,84	73,85	73,66
PS = Peso seco AG = Ácidos grasos									

Tabla 7. Líneas celulares transformadas de *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 cultivadas en medio SSFM con sacarosa

	control de 20888	1-1	1-3	1-24	3-1	3-2	3-5	3-21	4-1	4-24	4-31
PS (g/l)	11,24	10,04	10,51	9,99	8,40	10,29	9,03	8,34	8,16	10,63	10,92
% AG	78,22	78,20	76,29	77,10	77,37	77,71	74,97	73,44	73,65	80,05	79,82
PS = Peso seco AG = Ácidos grasos											

Tabla 8. Líneas celulares transformadas de B76-32 cultivadas en medio SSFM con sacarosa

	control de B76-32	n.º 2	n.º 12	n.º 19	n.º 26	n.º 30	n.º 39	n.º 42	n.º 56	n.º 61
PS día 7 (g/l)	10,56	13,37	10,21	13,26	7,88	10,26	11,81	10,47	12,84	8,97
% AG	62,8	74,3	75,2	65,4	66,9	65,1	64,8	71,4	77,9	73,7
PS = Peso seco AG = Ácidos grasos										

### Ejemplo 3

#### Expresión de la invertasa en *Schizochytrium*

Se recogieron los sobrenadantes sin células de cultivos de matraces de agitación de 50 ml de *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 clon 1-3 transformado con pCL0076 (Ejemplo 2) cultivado en SSFM durante 3 días (véase la Publicación de Estados Unidos N.º 2008/0022422) después de que los cultivos se centrifugaran a 5000 x g. Los sobrenadantes de cultivo se utilizaron de forma directa para SDS-PAGE o se concentraron de 50 a 100 veces utilizando concentradores disponibles en el mercado equipados con membranas permeables que permiten la concentración de todos los componentes más pesados que 10 kDa. La concentración de proteína total se midió mediante el ensayo de Bradford (Biorad). La expresión de la invertasa se verificó después mediante análisis de inmunotransferencia seguido de un procedimiento de inmunotransferencia convencional (Sambrook *et al.*). Brevemente, las proteínas (0,625 µg a 5 µg) se separaron en SDS-PAGE en un gel de bis-tris (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.). Después, las proteínas se tiñeron con azul de Coomassie (SimplyBlue Safe Stain, Invitrogen,

Carlsbad, CA, EE.UU.) o se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno y se sondaron en cuanto a la presencia de proteína invertasa con un antisuero para invertasa (Open Biosystems, Huntsville, AL), obtenido de conejos que se habían inyectado con una preparación pura de invertasa de *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma, St. Louis, MO). Posteriormente, la membrana se incubó con un anticuerpo secundario de ratón anti conejo acoplado a fosfatasa alcalina (Promega Corporation, Madison, WI). Después, la membrana se trató con solución de 5-bromo-4-cloro-3-indoil-fosfato/nitro azul de tetrazolio (BCIP/NBT), de acuerdo con las instrucciones del fabricante (KPL, Gaithersburg, MD). En la FIG. 9 se presenta un ejemplo. En los paneles 9A y 9B se presentan, respectivamente, una inmunotransferencia anti invertasa y el correspondiente gel teñido con azul de Coomassie. De las cuatro bandas principales observadas en los sobrenadantes de cultivo del clon 1-3, solo una mostró reaccionar con el antisuero anti invertasa. La identidad de la proteína se confirmó mediante análisis de secuencia peptídica.

Ejemplo 4

Actividad invertasa en *Schizochytrium*

Se midió la actividad de sacarasa por la tasa de liberación de fructosa y glucosa a partir de sacarosa. El ensayo se realizó añadiendo sacarosa al sobrenadante del caldo de fermentación y se midió el contenido de glucosa/fructosa mediante HPLC.

Se cultivó *Schizochytrium* sp. B76-32 clone n.º 2 transformado con pCL0076 (ejemplo 2) en MSFM (con sacarosa) hasta que se alcanzó una  $DO_{600nm}$  de aproximadamente 4 en matraces de agitación de 50 ml a 29 °C. Las células se centrifugaron durante 15 min a 4500 x g y se midió la actividad de invertasa en el sobrenadante. La invertasa se sometió a ensayo añadiendo sacarosa 0,1 M a volúmenes variables de caldo de fermentación y ajustando el volumen final a 1 ml. La reacción se incubó a 55 °C durante 3 min. La finalización de la reacción se realizó a 100 °C durante 10 min, y después se congeló antes de la cuantificación de la glucosa, fructosa y sacarosa mediante HPLC. La HPLC se realizó utilizando una versión modificada del procedimiento descrito en Liu *et al.*, Food Sci. 28: 293-296 (2007). Brevemente, se separaron los mono- y disacáridos utilizando HPLC con una columna de NH<sub>2</sub> Luna y se detectaron utilizando un RID (detector de índice de refracción). La identificación se llevó a cabo comparando los tiempos de retención con los de los patrones. La cuantificación se hizo mediante una calibración de patrón externo. En la FIG. 10A se muestra la velocidad de reacción en función de la concentración de sacarosa. La Km (33,4 mM) y la Vmáx (glucosa 6,98 mM/min) se calcularon a partir del diagrama de Lineweaver-Burk convencional. Véase la FIG. 10B.

Ejemplo 5

Glucosilación de la invertasa en *Schizochytrium*

Las proteínas de sobrenadante del Ejemplo 4 se separaron mediante SDS-PAGE en un gel de bis-tris al 4-12 % (Invitrogen). Las proteínas se tiñeron después con azul de Coomassie (SimplyBlue™ Safe Stain, Invitrogen, Carlsbad, CA). Las proteínas teñidas de interés se cortaron a partir del gel y los cortes se cortaron en pequeños trozos (~1 mm<sup>3</sup>), y se destiñeron de forma alterna con bicarbonato de amonio (BicAm) 40 mM y acetonitrilo al 100 % hasta que el color se volvió claro. Se volvió a aumentar el tamaño del gel desteñido en DTT 10 mM en BicAm 40 mM a 55 °C durante 1 h. La solución de DTT se cambió por yodoacetamida (IAM) 55 mM y se incubó en oscuridad durante 45 min. La incubación se siguió de lavado de forma alterna con BicAm 40 mM y acetonitrilo al 100 %, dos veces. Se volvió a aumentar el tamaño del gel deshidratado con solución de tripsina (tripsina en BicAm 40 mM) en hielo durante 45 min, de forma inicial, y la digestión de las proteínas se llevó a cabo a 37 °C durante una noche. El sobrenadante se transfirió a otro tubo. Los péptidos y los glucopéptidos se extrajeron del gel en series de acetonitrilo al 20 % en ácido fórmico al 5 %, acetonitrilo al 50 % en ácido fórmico al 5 % y después acetonitrilo al 80 % en ácido fórmico al 5 %. Las soluciones de muestra se secaron y combinaron en un tubo. La digestión con tripsina extraída se pasó a través de un cartucho C18 Sep-Pak® (Waters Corporation, Milford, MA) y se lavó con ácido acético al 5 % para eliminar los contaminantes (tal como sales y SDS). Se eluyeron los péptidos y los glucopéptidos en series de isopropanol al 20 % en ácido acético al 5 %, isopropanol al 40 % en ácido acético al 5 % e isopropanol al 100 %, y se secaron en un concentrador de velocidad al vacío. Las muestras secas se combinaron y después se reconstituyeron con tampón de fosfato de sodio 50 mM (pH 7,5) y se calentaron a 100 °C durante 5 min para inactivar a tripsina. La digestión con tripsina se incubó con PNGasa F a 37 °C durante una noche para liberar los N-glicanos. Después de la digestión, la muestra se pasó a través de un cartucho C18 Sep-Pak® y la fracción de hidratos de carbono se eluyó con ácido acético al 5 % y se secó mediante liofilización. Los oligosacáridos unidos en N liberados se permitieron basándose en el método de Anumula y Taylor (Anumula y Taylor, 1992) y se les realizó el perfil mediante espectrometría de masas. El análisis por espectrometría de masas se realizó siguiendo el método desarrollado en el Centro de Investigación de Hidratos de Carbono Complejos (Aoki K *et al.*, J. Biol. Chem. 282: 9127-42 (2007)). El análisis de masa se determinó usando NSI-LTQ/MS<sub>n</sub>. Brevemente, los glucanos permitidos se disolvieron en NaOH 1 mM en metanol al 50 % y se infundieron directamente en el instrumento (espectrometría de masas de trampa lineal de iones Finnigan™ LTQ™, Thermo Electron Corporation, Waltham, MA) a un caudal constante de 0,4 µl/min. El análisis de MS se realizó en el modo de ion positivo. Para el mapeo total de iones, se examinó el análisis de MS/MS automatizado (a una energía de colisión de 35), intervalo de m/z de 500 a 2000, en ventanas de 2,8 unidades de masas sucesivas que solapaban con la ventana anterior en 2 unidades de masa.

El mapeo total de iones se realizó para examinar la presencia de iones de fragmentos indicativos de glucanos. Se tomaron todos los datos de MS/MS de m/z 500 hasta m/z 2000 y se analizaron los datos brutos de forma manual. El cromatograma y la tabla de especies obtenidos mediante el mapeo total de iones-NSI se muestran en las FIG. 11 y FIG. 12. Este cromatograma se procesó mediante el filtro de exploración, una pérdida neutral de m/z 139, que es la de la pérdida neutral característica de los glucanos de tipo de alta manosa. El mapeo total de iones reveló que esta muestra contiene una serie de glucanos de tipo de alta manosa con cadenas de manosa largas.

#### Ejemplo 6

##### Expresión de la invertasa de *Aspergillus niger* en *Schizochytrium*

Se digirió el vector pAB0018 (N.º de acceso ATCC PTA-9616) con HindIII, se trató con nucleasa de frijol chino, se purificó y después se digirió adicionalmente con KpnI, generando cuatro fragmentos de diversos tamaños. Se aisló un fragmento de 2552 pb mediante técnicas electroforéticas convencionales en un gel de agar y se purificó utilizando kits de purificación de ADN comerciales. Después se realizó una segunda digestión de pAB0018 con PmeI y Kpn. Se aisló y purificó un fragmento de 6732 pb a partir de la digestión y se ligó al fragmento de 2552 pb. Después se utilizó el producto del ligamiento para transformar cepas disponibles en el mercado de células *E. coli* DH5- $\alpha$  competentes (Invitrogen) utilizando el protocolo del fabricante. Se propagaron los plásmidos procedentes de clones resistentes a ampicilina, se purificaron y después se exploraron mediante digestiones de restricción o PCR para confirmar que el ligamiento había generado las estructuras plasmídicas esperadas. Un plásmido verificado se designó pCL0120. Véanse la FIG. 13 y la SEQ ID NO: 5.

A la secuencia polinucleotídica que codifica la forma madura de la proteína invertasa secretada Suc1 procedente del hongo *Aspergillus niger* (N.º de acceso de GenBank S33920) se le optimizaron los codones para la expresión en *Schizochytrium* utilizando la tabla de uso de codones de *Schizochytrium* de la FIG. 1 (la optimización de codones se realizó en Blue Heron Biotechnology, Bothell, WA). Se sintetizó la secuencia con codones optimizados y la secuencia polinucleotídica resultante se fusionó a una secuencia polinucleotídica que codifica el péptido señal de Sec1 de *Schizochytrium* ("ss de Sec1") como un líder N-terminal en lugar del péptido señal endógeno. La región codificante resultante de la secuencia de ácidos nucleicos "s1Suc1" (SEQ ID NO: 4) se muestra en la FIG. 14. El polinucleótido s1Suc1 con codones optimizados se clonó en el vector pCL0120 utilizando sitios de restricción BamHI y NdeI en 5' y 3' para la inserción y ligamiento de acuerdo con técnicas convencionales. En la FIG. 15 se muestra un mapa plasmídico del vector resultante, pCL0137. Se transformó la cepa de tipo silvestre *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 con este vector y los clones resultantes se seleccionaron en medio SSFM sólido que contenía SMM. Después, los clones resistentes a SMM se resembraron en placa en medio SSFM sólido que contenía sacarosa como única fuente de carbono para someterlos a ensayo en cuanto al crecimiento. Dependiendo del experimento de transformación, entre el 50 % y el 90 % de los transformantes primarios resistentes a SMM tuvieron la capacidad de crecer en medio de sacarosa.

#### Ejemplo 7

##### Expresión de la invertasa secretada, la invertasa citoplasmática y el transportador de sacarosa en *Schizochytrium*

Se optimizaron los codones del gen del transportador de alfa-glucósido AGT1 de *Saccharomyces cerevisiae* (N.º de acceso de GenBank L47346) para la expresión en *Schizochytrium* y se insertó en el vector pCL0121 (SEQ ID NO: 6), que comprende un marcador de selección para ZEOCIN™, para producir el vector pCL0125 (SEQ ID NO: 7).

Se optimizaron los codones del gen del transportador de sacarosa SUT1 de *Solanum tuberosum* (patata) (N.º de acceso de GenBank X69165) para la expresión en *Schizochytrium* y se insertó en el vector pCL0121 (SEQ ID NO: 6), que comprende un marcador de selección para ZEOCIN™, para producir el vector pCL0126 (SEQ ID NO: 8).

Se optimizaron los codones de la secuencia polinucleotídica que codifica la proteína invertasa SUC2 citoplasmática de *Saccharomyces cerevisiae* (N.º de acceso de GenBank P00724) para la expresión en *Schizochytrium* y se insertó en el vector pCL0122 (SEQ ID NO: 9), que comprende un marcador de selección de paromomicina, para producir el vector pCL0127 (SEQ ID NO: 10).

*Schizochytrium* sp. B76-32 clon n.º 19 transformado con pCL0076 se transformó adicionalmente con pCL0125 o pCL0126, que comprendían el transportador de alfa-glucósido AGT1 y el transportador de sacarosa SUT1, respectivamente. Los transformantes se seleccionaron con antibióticos y la presencia de los genes transportadores se confirmó por PCR. Los transformantes se transformaron adicionalmente con pCL0127 que comprendía SUC2 citoplasmática, se seleccionaron con antibiótico y se analizaron en cuanto al crecimiento en sacarosa basándose en el peso seco y el contenido de FAME, como se describe en el Ejemplo 2. Se observó el crecimiento en sacarosa y la producción de ácidos grasos.

Se transformaron células de *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 de tipo silvestre con: (1) pCL0125, que comprendía el transportador de alfa-glucósido AGT1, en combinación con pCL0127, que comprendía SUC2 citoplasmática; o (2)

5 pCL0126, que comprendía el transportador de sacarosa SUT1, en combinación con pCL0127, que comprendía SUC2 citoplasmática. Los transformantes se cultivaron y seleccionaron en sacarosa. Cada una de las combinaciones de pCL0125/pCL0127 y pCL0126/pCL0127 produjeron transformantes que tenían la capacidad de crecer en sacarosa. Se identificaron y congelaron los transformantes positivos. En una fecha posterior, los transformantes positivos se descongelaron y se transformaron adicionalmente con pCL0076 que comprendía la invertasa secretada, se seleccionaron con antibiótico y se analizaron en cuanto a los niveles de crecimiento y FAME, como se describe en el Ejemplo 2.

10 *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 transformado con pCL0076 que comprendía la invertasa secretada SUC2 (clon 1-3, Ejemplo 2) se transformó adicionalmente con: (1) pCL0125, que comprendía el transportador de alfa-glucósido AGT1, en combinación con pCL0127, que comprendía SUC2 citoplasmática; o (2) pCL0126, que comprendía el transportador de sacarosa SUT1, en combinación con pCL0127, que comprendía SUC2 citoplasmática. Los transformantes se cultivaron y seleccionaron en ZEOCIN™ y paromomicina. Se identificaron y congelaron los transformantes positivos. En una fecha posterior, los transformantes positivos se descongelaron y se analizaron en cuanto al crecimiento en sacarosa y en cuanto a los ésteres metílicos de ácidos grasos, como se describe en el Ejemplo 2.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 20 <110> Martek biosciences corporation
- <120> Traustoquítridos recombinantes que crecen en sacarosa, y composiciones, métodos de preparación y usos de los mismos
- 25 <130> 2715.046PC01/JUK/SAS/BNC
- <140> A asignar
- <141> Con la presente
- 30 <150> 61/290.443
- <151> 28-12-2009
- <160> 10
- 35 <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- <211> 1614
- <212> ADN
- 40 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> pSCHIZ SecI-Invertasa
- 45 <400> 1

ES 2 701 403 T3

ggatccatga agttcgcgac ctcggtcgca attttgcttg tggccaacat agccaccgcc 60  
 ctcgcgtcga tgaccaacga gacctcggac cgcctctctg tgcactttac ccccaacaag 120  
 ggttgatga acgatcccaa cggcctctgg tacgacgaga aggatgctaa gtggcacctt 180  
 tactttcagt acaaccctaa cgacaccgtc tggggcaccc cgctcttctg gggccacgcc 240  
 acctccgacg acctcaccaa ctgggaggac cagcccattg ctatcgcccc caagcgcaac 300  
 gactcgggag ctttttcgg ttccatggtt gtggactaca acaacacctc cggttttttt 360  
 aacgacacca ttgacccccg ccagcgtctc gtcgccatct ggacctaca cacgcccag 420  
 agcgaggagc agtacatcag ctacagcctt gatggaggct acacctttac cgagtaccag 480  
 aagaacctg tctcgcgcg caactccacc cagttccgag acctaaagg tttttggtac 540  
 gagccttccc agaagtggat tatgaccgcc gctaagtgc aggattaca gatcgagatc 600  
 tacagcagcg acgacctcaa gtccctggaag cttgagtccg cctttgcca cgagggtttt 660  
 ctcggatacc agtacgagtg ccccggtctc atcgaggctc ccaccgagca ggaccogtcc 720  
 aagtctact gggtcatgtt tatttccatc aacctggcg cccctgscgg cggcagcttc 780  
 aaccagtact tcgtcggctc ctttaacggc acgcattttg aggccttcga caaccagtcc 840  
 cgcgtcgtcg acttcggcaa ggactactac gccctccaga ccttcttta caccgacccc 900  
 acctacggca ggcctctcg tattgcttgg gctccaact gggagtactc cgctttctgc 960  
 cccactaacc cctggcgcag ctogatgtcc ctcgtccgca agttttcgt taacaaccgag 1020  
 taccaggcca accccgagac cgagcttatt aacctgaagg ccgagcctat tctcaacatc 1080  
  
 tccaacgctg gccctggtc ccgctttgct actaaccta ccctcaccaa ggccaactcc 1140  
 tacaacgtcg atctctcaa ctccacoggt actcttgagt ttgagctcgt ctacgcogtc 1200  
 aacaccacc agaccatctc caagtccgtc ttcgcgacc tctccctctg gttcaagggc 1260  
 cttgaggacc ccgaggagta cctgocgatg ggttttgagg totccgcctc ctacttcttc 1320  
 ctcgatcgcg gtaactcaa ggttaagttt gtcaaggaga acccctactt tactaacctg 1380  
 atgagcgtca acaaccagcc ctttaagtc gagaacgatc ttagctacta caaggtttac 1440  
 ggctcctcg accagaacat tctcgagctc tactttaacg acggagatgt cgtcagcacc 1500  
 aacacctact ttatgaccac tggaaacgcc ctccgagcg tgaacatgac caccggagtc 1560  
 gacaacctct tttacattga caagtttcag gttcggaggg ttaagtaaca tatg 1614

<210> 2  
 <211> 11495  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> pCL0076

10

<400> 2

ES 2 701 403 T3

ctcttatctg cctcgcgcgg ttgaccgcgg cttgactctt ggcgcttgcc gctcgcatacc 60  
 tgccctcgctc ggcgcagggg gggggcgagt ggggtgggtcc gcagccttcc ggcctcagccc 120  
 gctagctcgc tcgcgcctg ctgcagccag cagggcagca ccgcacggca ggcaggtccc 180  
 ggcgcgatc gatcgatcca tcgatccatc gatccatcga tcgtgcggtc aaaaagaaag 240  
 gaagaagaaa ggaaaaagaa aggcgtgctc acccgagtgc gcgctgagcg cccgctcgcg 300  
 gtcccgcgga gcctccgct tagtccccgc ccgcgcgcgc gcagtcccc gggaggcacc 360  
 gcgcacctct cgcgccccc tcgcgcctcg ccgattcccc gcctccccct ttccgcttct 420  
 tcgcgcctc cgctcgcggc cgcgtcgcgc ggcccccgt ccctatctgc tcccagggg 480  
 ggcactccgc accttttgcg ccgctgccc cgcgcgcggc cgcgccgcgc ccctggttc 540  
 cccgcgcgagc gcggccgct cgcgcgcgca agactcgcgc cgtgccgcc cgagcaacgg 600  
 gtggcgcgcg cgcgcgcggc ggcggggcgc ggcgcgcgct aggcggggct aggcgcggc 660  
 taggcgaaac gccgcccccg ggcgcgcgc ccgcccgcct cagagcagtc gccgcgccag 720  
 accgccaacg cagagaccga gaccgaggtc cgtcgcgcc gacacgcgc cgacgcgcgg 780  
 cagggacgag gagcacgacg ccgcgcgcgc ccgcgcgggg ggggggaggg agaggcagga 840  
 cgcgggagcg agcgtgcatg tttccgcgc agacgacgcc gcgcgcgctg gagaggagat 900  
 aaggcgcttg gatcgcgaga gggccagcca ggctggaggc gaaaatgggt ggagaggata 960  
 gtatcttgcg tgcttgacg aggagactga cgaggaggac ggatacgtcg atgatgatgt 1020

ES 2 701 403 T3

gcacagagaa gaagcagttc gaaagcgact actagcaagc aagggatcca tgaagttcgc 1080  
gacctcggtc gcaatthttgc ttgtggccaa catagccacc gccctcgggt cgatgaccaa 1140  
cgagacctcg gaccgccttc tcgtgcactt taccoccaa acgggttggg tgaacgatcc 1200  
caacggcctc tggtagcagc agaaggatgc taagtggcac ctttactttc agtacaacct 1260  
taacgacacc gtctggggca ccccgctctt ctggggccac gccacctccg acgacctcac 1320  
caactgggag gaccagccca ttgctatcgc ccccaagcgc aacgactcgg gagctthttc 1380  
cggttccatg gttgtggact acaacaacac ctccggthtt tttaacgaca ccattgacct 1440  
ccgccagcgc tgcgtcgcca tctggacctc caacacgccc gagagcggag agcagtagat 1500  
cagctacagc cttgatggag gctacacctt taccgagtag cagaagaacc ctgtcctcgc 1560  
cgccaactcc acccagttcc ggcaccctaa ggtthtttgg tagagcctt cccagaagtg 1620  
gattatgacc gcgctaagt cgcaggatta caagatcgag atctacagca ggcagcacct 1680  
caagtcttgg aagcttgagt ccgcctttgc caacgagggt thttctggat accagtagca 1740  
gtgccccggg ctcatcgagg tccccaccga gcaggaccgg tccaagtctt actgggtcat 1800  
gtttatttcc atcaaccctg ggcocctcgc cgggggcagc ttcaaccagt acttcgtcgg 1860  
ctcctthaac ggcacgcatt ttgaggcctt cgacaaccag tcccgcgtcg tgcacttcgg 1920  
caaggactac tacgcctcc agacctctt taacaccgac cccacctacg gcagcgcctt 1980  
cggatttget tgggcctcca actgggagta ctccgctthc gtcccacta acccctggcg 2040  
cagctcgatg tccctcgtcc gcaagthttc gcttaacacc gagtaccagg ccaaccccgca 2100  
gaccgagctt attaacctga aggccgagcc tattctcaac atctccaacg ctggccccctg 2160  
gtcccgttht gctactaaca ctaccctcac caaggccaac tcttacaacg togatctctc 2220  
caactccacc ggtactcttg agtttgagct cgtctacgcc gtcaacacca cccagacct 2280  
ctccaagtcc gtcttcgccc acctctccct ctggttcaag ggccttgagg accccgagga 2340  
gtacctgcgc atgggtthtt aggtctccgc ctctctcttc thctctgatc ggggtaactc 2400  
caaggthaaq thttgtcaagg agaaccctca ctttactaac cgtatgagcg tcaacaacca 2460  
gccctthaaq tccgagaacg atcttagcta ctacaaggth tacggcctcc togaccagaa 2520  
cattctcgag ctctacttht acgacggaga tgtcgtcagc accaacacct actthtatgac 2580  
cactggaaac gccctcggca gcgtgaacat gaccaccgga gtcgacaacc tctthttacat 2640  
tgacaagtht caggthtcgg aggttaagta acatattgth tgagagatcc gaaagtgaac 2700  
cttctcctaa cccgacagcg aatggcggga gggggcgggc taaaagatcg tattacatag 2760  
tattthtccc ctactcttht tgtttgtctt thttthttth ttgaacgcat tcaagccact 2820  
tgtctgggtt tacttthttg thttgttget tgettgttg cttgcctget tcttggctag 2880  
acggcccaaa aaagggaana aattcattca tggcacagat aagaaaaaga aaaagthttg 2940

ES 2 701 403 T3

cgaccaccgt catcagaaag caagagaaga gaaacactcg cgctcacatt ctgctcgcg 3000  
 taagaatctt agccacgcat acgaagtaat ttgtccatct ggcgaatctt tacatgagcg 3060  
 ttttcaagct ggagcgtgag atcatacctt tcttgatcgt aatgttccaa ccttgcatag 3120  
 gcctogttgc gatccgctag caatgcgtcg tactcccgtt gcaactgcgc catcgccctca 3180  
 ttgtgacgtg agttcagatt cttctcgaga ccttcgagcg ctgctaattt cgcctgacgc 3240  
 tccttctttt gtgcttccat gacacgcgcg ttcaccgtgc gttccacttc ttcctcagac 3300  
 atgcccttgg ctgcctogac ctgctcggta agcttcgtcg taatctctc gatctcggaa 3360  
 ttcttcttgc cctccatcca ctggcacca tacttgagcag cctgttcaac acgctcattg 3420  
 aaaaactttt cattctcttc cagctccgca acccgcgctc gaagctcatt cacttcgccc 3480  
 accacggctt cggcatogag cgcgaaatca gtcgcccgaac tttccgaaag atacaccacg 3540  
 gcccctccgc tgctgctgcg cagcgtcatc atcagtcgcg tgttatcttc gcgcagattc 3600  
 tccacctgct cgttaagcag cttcacggtg gcctcttgat tctgagggct cacgtcgtgg 3660  
 attagcgctt gcagctcttg cagctccgtc agcttgaag agctcgtaat catggctttg 3720  
 cacttgtcca gacgtcgcag agcgttcgag agccgcttcg cgttatctgc catggacgct 3780  
 tctgcgctcg cggcctccct gacgacagtc tcttgagtt tcactagatc atgtccaatc 3840  
 agcttgcggt gcagctctcc aatcacgttc tgcatcttgt ttgtgtgtcc gggccgccc 3900  
 tcgtcttgcg atttgogaat ttctctctcg agctcgcgtt cgagctccag ggcgccttta 3960  
 agtagctcga agtcagccgc cgttagcccc agctccgtcg ccgcgctcag acagtcggtt 4020  
 agcttgatcc gattccgctt ttccatggca agtttaagat cctggcccag ctgcacctcc 4080  
 tgcgccttgc gcatcatgcg cggttccgccc tggcgcaaaa gcttcgagtc gtatcctgcc 4140  
 tgccatgccg gcgcaatggc acgcacgagc gacttgagtt gccaaactatt catcgccgag 4200  
 atgagcagca ttttgatctg catgaacaac tcgtcagagt cgtcatcctc tgcctcctcc 4260  
 agctctgcgg gcgagcgacg ctctccttgc agatgaagcg agggccgcag gcctccgaag 4320  
 agcacctctt gcgcgagatc ctctccgctc gtcgcccctc gcaggattgc ggtcgtgtcc 4380  
 gccatcttgc cgcacagca gcttttgctc gctctgcacc ttcaatttct ggtgccgctg 4440  
 gtgcccgtgg tgccccttgt gctggtgctg gtgctggtgc tgggtgctgg gccttgtgct 4500  
 ggtgctgcca cagacaccgc cgtcctgct gctgctcttc cggccccctc gccgcccgcg 4560  
 cgagcccccg ccgcgcgccc tgccctgggct ctccgcgctc tccgcgggct cctcggcctc 4620  
 ggccctgcgg tccgcgacga cgtctgcgcg gccgatggtg cggatctgct ctagagggcc 4680  
 cttcgaaggt aagcctatcc ctaacctct cctcggctc gattctacgc gtaccggtca 4740  
 tcatcaccat caccattgag tttaaacggg cccagcacg tgctaogaga tttcgattcc 4800

ES 2 701 403 T3

accgcccct tctatgaaag gttgggcttc ggaatcgttt tccgggacgc cggtggatg 4860  
 atcctccagc gcggggatct catgctggag ttcttcgcc accccaactt gtttattgca 4920  
 gcttataatg gttacaaata aagcaatagc atcacaatc tcacaaataa agcatttttt 4980  
 tcaactgcatt ctagtgtggg tttgtccaaa ctcatcaatg tatcttatca tacatggctc 5040  
 acctgcagga acctgcatta atgaatcggc caacgcgcgg ggagaggcgg tttgcgtatt 5100  
 gggcgtctt ccgcttcctc gctcactgac tcgctgcgct cggtcgttcg gctgcggcga 5160  
 gcggtatcag ctcaactcaa ggcgtaata cggttatcca cagaatcagg ggataacgca 5220  
 ggaaagaaca tgtgagcaaa aggccagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggcgcggtg 5280  
 ctggcgtttt tccataggct ccgccccct gacgagcatc acaaaaatcg acgctcaagt 5340  
 cagaggtggc gaaaccgac aggactataa agataaccagg cgtttcccc tggaaactcc 5400  
 ctgctgcgct ctctgttcc gaccctgcg cttaccggat acctgtccgc ctttctccct 5460  
 tcgggaagcg tggcgcttc tcatagctca cgctgtagggt atctcagttc ggtgtaggtc 5520  
 gttcgtcca agctgggctg tgtgcaagaa cccccgttc agcccgaccg ctgcgcctta 5580  
 tccgtaact atcgtcttga gtccaaccg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca 5640  
 gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag 5700  
 tgggtgccta actacggcta cactagaaga acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag 5760  
 ccagttacct tcggaaaag agttgtagc tcttgatccg gcaaaaaac caccgctggt 5820  
 agcggtggtt tttttgttg caagcagcag attacgcgca gaaaaaagg atctcaagaa 5880  
 gatccttga tctttctac ggggtctgac gctcagtgga acgaaaactc acgttaaggg 5940  
 attttggtca tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tccttttaa ttaaaaatga 6000  
 agttttaa atcaatctaaag tataatgag taaacttgggt ctgacagtta ccaatgctta 6060  
 atcagtgagg cacctatctc agcgatctgt ctatttcggt catccatagt tgctgactc 6120  
 cccgtcgtgt agataactac gatacgggag ggcttaccat ctggccccag tgctgcaatg 6180  
 ataccgcgag acccagctc accgctcca gatttatcag caataaacca gccagccgga 6240  
 agggccgagc gcagaagtgg tcctgcaact ttatccgct ccatccagtc tattaattgt 6300  
 tgccgggaag ctagagtaag tagttcgcca gttaatagtt tgcgcaacgt tgttgccatt 6360  
 gctacaggca tcgtggtgtc acgctcgtcg tttggtatgg cttcattcag ctccggttcc 6420  
 caacgatcaa ggcgagttac atgatcccc atgttgtgca aaaaagcgggt tagctccttc 6480  
 ggtcctccga tcgttgcag aagtaagttg gccgcagtggt tatcaactcat ggttatggca 6540  
 gcaactgcata attctcttac tgtcatgcca tccgtaagat gcttttctgt gactgggtgag 6600  
 tactcaacca agtcattctg agaatagtg atgcggcgac cgagttgctc ttgccggcg 6660  
 tcaatacggg ataataccgc gccacatagc agaactttaa aagtgtcat cattggaaaa 6720

ES 2 701 403 T3

cgttcttcgg ggcgaaaact ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag ttcgatgtaa 6780  
 cccactcgtg cacccaactg atcttcagca tcttttactt tcaccagcgt ttctgggtga 6840  
 gcaaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa aagggataa gggcgacacg gaaatggtga 6900  
 atactcatac tcttcctttt tcaatattat tgaagcattt atcagggtta ttgtctcatg 6960  
 agcggataca tatttgaatg tatttagaaa aataaaciaa taggggttcc ggcacattt 7020  
 ccccgaaaag tgccacctga cgtotaagaa accattatta tcatgacatt aacctataaa 7080  
 aataggcgtg tcacgaggcc ctttcgtctc gcgcgtttcg gtgatgacgg tgaaaacctc 7140  
 tgacacatgc agctcccgga gacggtcaca gcttgtctgt aagcggatgc cgggagcaga 7200  
 caagcccgtc agggcgctgc agcgggtggt ggcgggtgct ggggctggct taactatgct 7260  
 gcatcagagc agattgtact gagagtgcac caagctttgc ctcaacgcaa ctaggcccag 7320  
 gcctactttc actgtgtctt gtottgcctt tcacaccgac cgagtgtgca caaccgtgtt 7380  
 ttgcacaaag cgcaagatgc tcaactgact gtgaagcaaa ggttcgcgcg aagcactgct 7440  
 gactgcgagg atgaggatga ctggcagcct gttcaaaaac tgaanaatccg cgatgggtca 7500  
 gctgccattc gcgcatgacg cctgcgagag acaagttaac tcgtgtcact ggcattgctt 7560  
 agcatcttta cgcgagcaaa attcaatcgc tttatTTTTT cagtttcgta accttctcgc 7620  
 aaccgcgaat cgccgtttca gcctgactaa tctgcagctg cgtggcactg tcagtctgct 7680  
 agtcagtctg gcgcgctggt ccagcaccga ggtcgcgctg cgcgcgcctt ggaccgctgc 7740  
 tgctactgct agtggcacgg caggtaggag cttgttgccg gaacaccagc agccgccagt 7800  
 cgacgccagc caggggaaag tccggcgtcg aaggagagg aaggcggcgt gtgcaacta 7860  
 acgttgacca ctggcgcctc ccgacacgag caggaagcag gcagctgcag agcgcagcgc 7920  
 gcaagtgcag aatgcgcgaa agatccactt gcgcgcggcg ggcgcgcact tgcgggcgcg 7980  
 gcgcggaaca gtgcggaaag gagcgggtgca gacggcgcgc agtgacagtg ggcgcaaacg 8040  
 cgcgcagtaa gcagcggcgg ggaacggtat acgcagtgcc gcgggccgcc gcacacagaa 8100  
 gtatacgcgg gccgaagtgg ggcgtcgcgc gcgggaagtg cggaatggcg ggcaaggaaa 8160  
 ggaggagacg gaaagagggc gggaaagaga gagagagaga gtgaaaaaag aaagaaagaa 8220  
 agaaagaaag aaagaaagct cggagccacg ccgcggggag agagagaaat gaaagcacgg 8280  
 cacggcaaag caaagcaaag cagaccacgc cagaccacgc cgaggagga gcgcgcgag 8340  
 gaccgcgcg gcgagcgcg gagcacggcg cgcgagcgcg cgagcgcgag agcgcgcgag 8400  
 cgagcaaggc ttgctgcgag cgatcgcgag agcgcgcggg aaggatgagc gcgaccgcg 8460  
 cggcgcgag gacagcggcg gcgctgtcct cggcgcgtgac gacgcctgta aagcgcgagc 8520  
 agcagcagca gctgcgcgta ggcgcggcgt cggcacggct ggcggccgcg gcgttctcgt 8580

ES 2 701 403 T3

ccggcacggg cggagacggg gccaaagaagg cggccgcggc gagggcggtc tccacgggac 8640  
 gcggcccca cgcgacacgc gagaagagct cgctggccac ggtccaggcg gcgacggacg 8700  
 atgcgcgctt cgtcggcctg accggcgccc aatccttca tgagctcatg cgcgagcacc 8760  
 aggtggacac catctttggc taccctggcg gcgccattct gcccgtttt gatgccattt 8820  
 ttgagagtga cgcgcttcaa gttcattctc gctcggcacg agcagggcgc cggccacatg 8880  
 gccgagggct acgogcgcgc cacgggcaag cccggcggtg tccctcgtcac ctogggccct 8940  
 ggagccacca acaccatcac cccgatcatg gatgcttaca tggacggtac gccgctgctc 9000  
 gtgttcaccg gccaggtgca gacctctgct gtcggcacgg acgctttcca ggagtgtgac 9060  
 attgttggca tcagccgcgc gtgcaccaag tggaacgtca tggtaagga cgtgaaggag 9120  
 ctcccgcgcc gcaccaatga ggcctttgag attgccatga gggcccgccc gggctccgctg 9180  
 ctcgtogatc ttccctaagga tgtgaccgcc gttgagctca aggaaatgcc cgacagctcc 9240  
 ccccagggtg ctgtgcgcca gaagcaaaag gtcgagcttt tccacaagga gcgcattggc 9300  
 gtcctggca cggccgactt caagctcatt gccgagatga tcaaccgtgc ggagcgaccc 9360  
 gtcactatg ctggccaggg tgtcatgcag agcccgttga atggcccggc tgtgctcaag 9420  
 gagttcgcgg agaaggcca cattcccgtg accaccacca tgcagggctc cggcggcttt 9480  
 gacgagcgta gtcccctctc cctcaagatg ctcggcatgc acggctctgc ctacgccaac 9540  
 tactcgatgc agaacgcga tcttatcctg gcgctcggtg cccgctttga tgatcgtgtg 9600  
 acgggcccgc ttgacgcctt tgetccggag gctcggcctg ccgagcgcga gggccgcggc 9660  
 ggcatcgttc actttgagat ttcccccaag aacctccaca aggtcgtcca gccacccgtc 9720  
 gcggtcctcg gcgacgtggt cgagaacctc gccaacgtca cgcgccacgt gcagcgccag 9780  
 gagcgcgagc cgtggtttgc gcagatgcc gattggaagg agaagcacc ttttctgctc 9840  
 gagtctgtt attcggacga caaggttctc aagccgcagc aggtcctcac ggagcttaac 9900  
 aagcagattc tcgagattca ggagaaggac gccgaccagg aggtctacat caccacgggc 9960  
 gtcggaagcc accagatgca ggcagcgcag ttccttaoct ggaccaagcc gcgccagtgg 10020  
 atctcctcgg gtggcgcgg cactatgggc tacggccttc cctcggccat tggcgccaag 10080  
 attgccaagc ccgatgctat tgttattgac atcgatggtg atgcttctta ttcgatgacc 10140  
 ggtatggaat tgatcacagc agccgaattc aaggttggcg tgaagattct tcttttgag 10200  
 aacaacttte agggcatggt caagaacggt caggatctct tttacgaaa gcgctactcg 10260  
 ggccaccgcc atgttcaacc cgcgcttoga caaggtcgc gatgcgatgc gtgccaaggg 10320  
 tctctactgc gcgaaacagt cggagctcaa ggacaagatc aaggagtctc tcgagtacga 10380  
 tgagggctcc gtcctcctcg aggtttctgt ggacaaggac acgctcgtct tgcccatggt 10440  
 ccccgtggc tttccgctcc acgagatggt cctcagacct cctaagccca aggacgccta 10500

ES 2 701 403 T3

agttcttttt tccatggcgg gcgagcgagc gagcgcgoga gcgcgcaagt gcgcaagcgc 10560  
 cttgccttgc tttgcttcgc ttcgctttgc tttgcttcac acaacctag tatgaattca 10620  
 agttttcttg cttgtcggcg atgcctgcct gccaacccagc cagccatccg gccggccgtc 10680  
 cttgacgcct tcgcttccgg cgcggccatc gattcaattc acccatccga tacgttccgc 10740  
 cccctcacgt ccgtctgcgc acgacccctg cacgaccacg ccaaggccaa cgcgcgcgctc 10800  
 agctcagctt gtcgacgagt cgcacgtcac atatctcaga tgcatttggga ctgtgagtgt 10860  
 tattatgccca ctagcacgca acgatcttcg gggtcctcgc tcattgcatc cgttcggggc 10920  
 ctgcaggcgt ggacgcgagt cgcgcgcgag acgctgcagc aggccgctcc gacgcgaggg 10980  
 ctogagctcg ccgcgcccgc gcgatgtctg cctggcgccg actgatctct ggagcgcaag 11040  
 gaagacacgg cgacgcgagg aggaccgaag agagacgctg gggtagcag gatatacccg 11100  
 gggcgggaca ttggttccgc ataacctccc ccattcgagc ttgctcgtcc ttggcagagc 11160  
 cgagcgcgaa cggttccgaa cgcggcaagg attttggtc tggtaggtgg actccgatcg 11220  
 aggcgcaggt tctcgcaggt ttctcgcaggt ccggcagtggt tcgttagaaa tagggagtgc 11280  
 cggagtcttg acgcgcctta gctcaactctc cgcccacgcy cgcacgcgcy ccatgccgcc 11340  
 gtcccgtctg tcgctgcgct ggccgcgacc ggctgcgcca gactacgaca gtgggacaga 11400  
 gctcagggcg acgcgaatcg ctccgggttg aagggtttca agggtcgggc gtcgtcgcgt 11460  
 gccaaagtga aaatagtagg gggggggggg ggtac 11495

5 <210> 3  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> *Schizochytrium*  
 <400> 3

Met Lys Phe Ala Thr Ser Val Ala Ile Leu Leu Val Ala Asn Ile Ala  
 1 5 10 15

Thr Ala Leu Ala  
 20

10  
 15 <210> 4  
 <211> 1785  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Secuencia de ácido nucleico con codones optimizados  
 <400> 4

ES 2 701 403 T3

atgaagttcg cgacctcggc cgcaatthttg cttgtggcca acatagccac cgccctcgcg 60  
 gcctccccct cgatgcagac ccgtgcctcc gtcgtcattg attacaaagt cgctcctcct 120  
 aacctotcca cctcccgaa cggcagcctc tttgagacct ggcgtcctcg cgcccacggt 180  
 cttcccccta acggtcagat tggcgatccc tgcctccact acaccgatcc ctgcactggc 240  
 ctctttcacg tcggctttct ccacgatggc tccggcattt cctccgccac tactgacgac 300  
 ctcgctacct acaaggatct caaccagggc aaccaggcca tcgtccccgg cggatcaaac 360  
 gaccctgtcg ctgttttcga cggctcogtc attccttccg gcattaacgg cctccctacc 420  
 ctctctaca cctccgtcag ctacctccc attcactggc ccatccccta caccgcggc 480  
 tccgagacgc agagcctggc tgtctccagc gatggtggct ccaactttac taagctcgac 540  
 cagggccccg ttattcctgg ccccccttt gcctacaacg tcaccgcctt ccgcgacccc 600  
 tacgtctttc agaaccccc cctgcactcc ctctccact ccaagaacaa cacctggtac 660  
 accgtcattt cgggtggcct ccacggcaag ggcgccgcc agtttcttta ccgtcagtac 720  
 gaccccgact ttcagtactg ggagtctctc ggccagtggc ggcacgagcc taccaactcc 780  
 acctggggca acggcacctg ggccggccgc tgggccttca acttcgagac cggcaacgtc 840  
 ttttcgcttg acgagtacgg ctacaacccc cacggccaga tcttctccac cattggcacc 900  
 gagggctccg accagcccgt tgtccccag ctacctcca tccagatat gctttgggtc 960  
 tccggtaacg tttcgcgcaa cggatcgggt tccttcactc ccaacatggc cggcttcctc 1020  
 gactgggggt tctcgtccta cgcgcgcgcg ggtaagggtc ttccttccac gtcgctcccc 1080  
 tccaccaagt ccggtgcccc cgatcgcttc atttcgtaag tttggctctc cggcgacctc 1140  
 tttgagcagg ctgagggtt tcctaccaac cagcagaact ggaccggcac cctcctcctc 1200  
 ccccgtagac tccggtcct ttacatccc aacgtggttg ataacgccct tgcgcgcgag 1260  
 tccggcgctt cctggcaggt cgtctcctcc gatagctcgg ccggtactgt ggagctccag 1320  
 accctcggca tttccatcgc ccgcgagacc aaggccgcc tcctgtccgg cacctcgttc 1380  
 actgagtcgg accgcactct taactcctcc ggcgtcgttc cctttaagcg tccccctcc 1440  
 gagaagtttt tcgtcctctc cgcacagctc tccttcccc cctccgcccg cggctcgggc 1500  
 ctcaagtccg gcttccagat tctttcctcc gagctcgagt ccaccacggc ctactaccag 1560  
 tttagcaacg agtccatcat cgtcgaccgc agcaaacaca gcgccgccgc ccgtactacc 1620  
 gacggtatcg actcctcgc cgaggccggc aagetccgcc tctttgacgt cctcaacggc 1680  
 ggcgagcagg ctattgagac cctcgacctt accctcgtcg ttgataactc cgtgctcgag 1740  
 atttacgcca acggtcgttt cgcgctttcc acctgggttc gctaa 1785

<210> 5  
 <211> 9291  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

ES 2 701 403 T3

<220>  
<223> pCL0120

<400> 5

5

```

ctcttatctg cctcgcgccg ttgaccgccg cttgactctt ggcgcttgcc gctcgcgatcc      60
tgcctcgctc gcgcaggcgg gcgggcgagt ggggggttcc gcagccttcc gcgctcgcgcc      120
gctagctcgc tcgcgccgtg ctgcagccag cagggcagca ccgcacggca ggcaggctcc      180
ggcgcggatc gatcgatcca tcgatccatc gatccatcga tcgtgcggtc aaaaagaaag      240
gaagaagaaa ggaaaaagaa aggcgtgcgc acccgagtgc gcgctgagcg cccgctcgcg      300
gtcccgcgga gcctccggtg tagtccccgc cccgcgcgcg gcagtccccg gggaggcatc      360
gcgcacctct cgcgcgcccc tcgcgcctcg ccgattcccc gcctccccct ttccgcttct      420
tcgcgcctc cgtcgcggc cgcgtcgcgc gcgccccgct ccctatctgc tccccagggg      480
ggcactccgc accttttgcg cccgctgccg ccgcccgcgc cgcgccgcgc ccctggtttc      540
ccccgcgagc gcggccgctg cgcgcgcgaa agactcgcgc cgtgccgccc cgagcaacgg      600
gtggcgcgcg cgcgcgcgcg ggcggggcgc ggcggcgctg aggcggggct aggcgcgggc      660
taggcgaaac gccgcccccg ggcgcgcgcg ccgcccgctc cagagcagtc gccgcgccag      720
accgccaacg cagagaccga gaccgaggtg cgtcgcgccc gagcacgcgc cgaocgcggg      780
cagggacgag gagcacgacg ccgcgcgcgc ccgcgcgggg ggggggaggg agaggcagga      840
cgcgggagcg agcgtgcatg tttccgcgcg agacgacgcc gcgcgcgctg gagaggagat      900
aaggcgcctg gatcgcgaga gggccagcca ggctggaggc gaaaatgggt ggagaggata      960
gtatcttgcg tgcttgagcg aggagactga cgaggaggac ggatacgtcg atgatgatgt     1020
gcacagagaa gaagcagttc gaaagcgact actagcaagc aagggatcca tgaagtctgc     1080
gacctcggtc gcaattttgc ttgtggccaa catagccacc gccctcgcgc agagcgatgg     1140
ctgcaccccc accgaccaga cgatggtgag caagggcgag gagctgttca ccggggtggt     1200
gcccatcctg gtcgagctgg accggcagct aaacggccac aagttcagcg tgtccggcga     1260
gggcgagggc gatgccacct acggcaagct gacctgaag ttcactctga ccaccggcaa     1320
gctgcccgtg ccctggccca ccctcgtgac caccctgacc tacggcgtgc agtgcttcag     1380
ccgctacccc gaccacatga agcagcacga cttcttcaag tccgccatgc ccgaaggcta     1440
cgtccaggag cgcaccatct tcttcaagga cgacggcaac tacaagacc gcgcccaggt     1500
gaagttcgag ggcgacaccc tggtgaaccg catcgagctg aagggcacgc acttcaagga     1560
ggacggcaac atcctgggac acaagctgga gtacaactac aacagccaca acgtctatat     1620
catggccgac aagcagaaga acggcatcaa ggtgaacttc aagatccgcc acaacatcga     1680
ggacggcagc gtgcagctcg ccgaccacta ccagcagaac acccccatcg gcgacggccc     1740
cgtgctgctg cccgacaacc actacctgag caccagctcc gccctgagca aagaccccaa     1800

```

ES 2 701 403 T3

cgagaagcgc gatcacatgg tcctgctgga gttcgtgacc gccgccggga tcaactctcgg 1860  
 catggacgag ctgtacaagc accaccatca ccaccactaa catatgagtt atgagatccg 1920  
 aaagtgaacc ttgtcctaac ccgacagcga atggcgggag gggcggggct aaaagatcgt 1980  
 attacatagt atttttcccc tactctttgt gtttgtcttt tttttttttt tgaacgcatt 2040  
 caagccactt gtctgggttt acttgtttgt ttgcttgctt gcttgcttgc ttgcctgctt 2100  
 cttggtcaga cggcccaaaa aagggaaaaa attcattcat ggcacagata agaaaaagaa 2160  
 aaagtttgtc gaccaccgtc atcagaaagc aagagaagag aaacactcgc gtcacattc 2220  
 tcgctcgcgt aagaatctta gccacgcata cgaagtaatt tgtccatctg gcgaatcttt 2280  
 acatgagcgt tttcaagctg gagcgtgaga tcataccttt ctgatcgtg atgttccaac 2340  
 cttgcatagg cctcgttgcg atccgctagc aatgcgtcgt actcccgttg caactgcgcc 2400  
 atcgcctcat tgtgacgtga gttcagattc ttctcgagac cttecgagcgc tgctaatttc 2460  
 gcctgacgct ccttcttttg tgcttccatg acacgcgcgt tcaccgtgcg ttccacttct 2520  
 tcctcagaca tgcccttggc tgccctgacc tgctcggtaa aacgggcccc agcacgtgct 2580  
 acgagatttc gattccaacc cgccttcta tgaaaggttg ggcttoggaa tcgttttccg 2640  
 ggacgccggc tggatgatcc tccagcggg ggatctcatg ctggagttct tcgccaccc 2700  
 caacttgttt attgcagctt ataatggtta caataaagc aatagcatca caaatttcac 2760  
 aaataaagca tttttttcac tgcattctag ttgtggtttg tccaaactca tcaatgtatc 2820  
 ttatcataca tggctgacct gcaggaacct gcattaatga atcggccaac gcgcggggag 2880  
 aggcggtttg cgtattgggc gctcttcgc ttctcgcctc actgactcgc tgcgctcgg 2940  
 cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggg tatccacaga 3000  
 atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg 3060  
 taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttoca taggctcgc cccctgacg agcatcacia 3120  
 aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcgtt 3180  
 tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgcgctta ccggatacct 3240  
 gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct 3300  
 cagttcgtg taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc 3360  
 cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aaccggtaa gacacgactt 3420  
 atcgccaactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcgggtg 3480  
 tacagagttc ttgaagtggg ggcctaacta cggctacact agaagaacag tatttggtat 3540  
 ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa 3600  
 acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa 3660

ES 2 701 403 T3

aaaaggatct caagaagatc ctttgatcct ttctacgggg tctgacgctc agtggaaacga 3720  
 aaactcacgt taagggattt tggcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct 3780  
 ttaaattaa aatgaagtt ttaaatcaat ctaaagtata tatgagtaaa cttggtctga 3840  
 cagttaccaa tgcttaatca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttcgttcacc 3900  
 catagttgcc tgactcccog tctgttagat aactacgata cgggagggct taccatctgg 3960  
 ccccagtgct gcaatgatac cgcgagacc acgctcaccg gctccagatt taccagcaat 4020  
 aaaccagcca gccggaagg cgcgagcag aagtggctct gcaactttat ccgcctccat 4080  
 ccagctctatt aattgttgc ggaagctag agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg 4140  
 caacgttgtt gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggttc 4200  
 atcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt tgtgcaaaaa 4260  
 agcggttagc tccttcggtc ctccgatcgt tgtcagaagt aagtggccg cagtgttacc 4320  
 actcatggtt atggcagcac tgcataattc tcttactgtc atgccatccg taagatgctt 4380  
 ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag 4440  
 ttgtcttgc ccggcgtcaa tacgggataa taccgogcca catagcagaa ctttaaaagt 4500  
 gctcatcatt ggaaaaagtt cttcggggcg aaaactctca aggatcttac cgctgttgag 4560  
 atccagttcg atgtaaccca ctctgtcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac 4620  
 cagcgtttct gggtgagcaa aacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc 4680  
 gacacggaat tgttgaatac tcatactctt cctttttcaa tattattgaa gcatttatca 4740  
 gggttattgt ctcagagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg 4800  
 ggtccgcgc acatttccc gaaaagtgcc acctgacgtc taagaaacca ttattatcat 4860  
 gacattaacc tataaaaata ggcgtatcac gaggcccttt cgtctcgcgc gtttcggtga 4920  
 tgacggtgaa aacctctgac acatgcagct cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc 4980  
 ggatgccggg agcagacaag cccgtcaggg cgcgtcagcg ggtgttggcg ggtgtcgggg 5040  
 ctggcttaac tatgcggcat cagagcagat tgtactgaga gtgcaccaag ctttgcctca 5100  
 acgcaactag gcccaggcct actttcactg tgtcttctct tgcctttcac accgaccgag 5160  
 tgtgcacaac cgtgttttgc acaaagcgca agatgctcac tcgactgtga agcaaaggtt 5220  
 gcgcgcaagc gactgcgact gcgaggatga ggatgactgg cagcctgttc aaaaactgaa 5280  
 aatcccgcat gggtcagctg ccattcgcgc atgacgcctg cgagagacaa gtttaactcg 5340  
 gtcactggca tgtcctagca tctttacgcg agcaaaattc aatcgttta ttttttcagt 5400  
 ttcgtaacct tctcgaacc gcgaatgcc gtttcagcct gactaatctg cagctgcgtg 5460  
 gcaactgtcag tcagtcagtc agtcgtcgc gctgttccag caccgaggtc gcgcgtcgc 5520  
 gcgcctggac cgctgtctct actgctagtg gcacggcagg taggagcttg ttgccggaac 5580

ES 2 701 403 T3

accagcagcc gccagtcgac gccagccagg ggaaagtccg gcgtcgaagg gagaggaagg 5640  
 cggcgtgtgc aaactaacgt tgaccactgg cgccccccga cagcagcagg aagcaggcag 5700  
 ctgcagagcg cagcgcgcaa gtgcagaatg cgcgaaagat ccacttgccg gcggcggcgg 5760  
 cgcacttgcg ggccggcgcg ggaacagtgc ggaaaggagc ggtgcagacg gcgcgcagtg 5820  
 acagtggcgg caaagcccg cagtaagcag cggcggggaa cggtataccg agtgcccgcg 5880  
 gccgccgcac acagaagtat acgcgggccc aagtggggcg tcgcgcgcgg gaagtgcgga 5940  
 atggcgggca aggaaagcag gagacggaaa gagggcggga aagagagaga gagagagtga 6000  
 aaaaagaaag aaagaaagaa agaaagaaag aaagctcggg gccacgccgc ggggagagag 6060  
 agaaatgaaa gcacggcacg gcaaagcaaa gcaaagcaga cccagccaga cccagccgag 6120  
 ggaggagcgc gcgcaggacc cgcgcggcga gcgagcgcgc acggcgcgcg agcgcgcgag 6180  
 cgagcgcgag cgcgcgcgag caaggcttgc tgcgagcgat cgagcgcgag agcgggaagg 6240  
 atgagcgcga cccgcgcggc gacgaggaca gcggcggcgc tgtcctcggc gctgacgacg 6300  
 cctgtaaagc agcagcagca gcagcagctg cgcgtaggcg cggcgtcggc acggctggcg 6360  
 gccgcggcgt tctcgtccgg cacgggcgga gacgcggcca agaaggcggc cgcggcggag 6420  
 gcgttctcca cgggacgcgg ccccaacgcg acacgcgaga agagctcgtt ggccacggtc 6480  
 caggcggcga cggacgatgc gcgcttcgtc ggcctgaccg gcgccccaaat ctttcatgag 6540  
 ctcatgcgcg agcaccaggt ggacaccatc tttggctacc ctggcggcgc cattctgccc 6600  
 gtttttgatg ccatttttga gagtgcgcg cttcaagttc attctcgtc gccacgagca 6660  
 gggcggcggc cacatggcgg agggctaccg gcgcgccacg ggcaagcccg gcgttgtcct 6720  
 cgtcacctcg ggccctggag ccaccaaacac catcaccocg atcatggatg cttacatgga 6780  
 cggtacgccg ctgctcgtgt tcaccggcca ggtgcagacc tctgctgtcg gcacggacgc 6840  
 tttccaggag tgtgacattg ttggcatcag ccgcgcgtgc accaagtgga acgtcatggt 6900  
 caaggacgtg aaggagctcc cgcgcgcgat caatgaggcc tttgagattg ccatgagcgg 6960  
 ccgcccgggt cccgtgctcg tcgatcttcc taaggatgtg accgccgttg agctcaagga 7020  
 aatgcccgac agctcccccc aggttgctgt gcgccagaag caaaaggtcg agcttttcca 7080  
 caaggagcgc attggcgcct ctggcacggc cgacttcaag ctcatcgccg agatgatcaa 7140  
 ccgtgcggag cgaccctca tctatgctgg ccagggtgtc atgcagagcc cgttgaatgg 7200  
 cccgctgtg ctcaaggagt tcgcggagaa ggccaacatt cccgtgacca ccaccatgca 7260  
 gggctcggc ggctttgacg agcgtagtc cctctccctc aagatgctcg gcatgcacgg 7320  
 ctctgcctac gccaaactact cgatgcagaa cgccgatctt atcctggcgc tcggtgcccg 7380  
 ctttgatgat cgtgtgacgg gccgcgttga cgcctttgct ccggaggctc gccgtgccga 7440

ES 2 701 403 T3

gcgcgagggc cgcggtggca tcgttcactt tgagatttcc cccaagaacc tccacaaggt 7500  
cgtccagccc accgtcgcgg tcctcggcga cgtggtcgag aacctcgcca acgtcacgcc 7560  
ccacgtgcag cgccaggagc gcgagccgtg gtttgcgcag atcgccgatt ggaaggagaa 7620  
gcaccctttt ctgctcgagt ctgttgattc ggaogacaag gttctcaagc cgcagcaggt 7680  
cctcacggag cttacaagc agattctcga gattcaggag aaggacgccg accaggaggt 7740  
ctacatcacc acgggcgtcg gaagccacca gatgcaggca gcgcagttcc ttacctggac 7800  
caagccgcgc cagtggatct cctcgggtgg cgcggcact atgggctacg gccttccctc 7860  
ggccattggc gccaaagatt ccaagcccga tgctattggt attgacatcg atgggtgatgc 7920  
ttcttattcg atgaccggtg tggattgat cacagcagcc gaattcaagg ttggcgtgaa 7980  
gattcttctt ttgcagaaca actttcaggg catggtcaag aacgttcagg atctctttta 8040  
cgacaagcgc tactcgggcc accgccatgt tcaaccgcg cttcgacaag gtcgccgatg 8100  
cgatcgtgac caagggtctc tactgcgcga aacagtcgga gctcaaggac aagatcaagg 8160  
agtttctcga gtacgatgag ggtcccgccc tcctcgaggt tttcgtggac aaggacacgc 8220  
tcgtcttgcc catggtcccc gctggctttc cgtccacga gatggtcctc gagcctccta 8280  
agcccaagga cgcctaagtt cttttttcca tggcgggcca gcgagcgcgc gcgcgagcgc 8340  
gcaagtgcgc aagcgccttg ccttgctttg cttcgcttcg ctttgctttg cttcacacaa 8400  
cctaagtatg aattcaagtt ttcttgcttg tcggcgatgc ctgcctgcc accagccagc 8460  
catccggccg gccgtccttg acgccttcgc ttccggcgcg gccatcgatt caattcacc 8520  
atccgatacg ttccgcccc tcacgtccgt ctgcgcacga cccctgcag accacgccc 8580  
ggccaacgcg ccgctcagct cagcttgctg acgagtcgca cgtcacatat ctgagatgca 8640  
tttgactgt gagtgttatt atgccactag cacgcaacga tcttcggggc cctcgctcat 8700  
tgcacccgtt cgggccctgc aggcgtggac gcgagtcgcc gccgagacgc tgcagcaggc 8760  
cgctccgacg cgagggtctg agctcgcgc gcccgcgca tgtctgcctg gcgcccactg 8820  
atctctggag cgcaaggaag acacggcgac gcgaggagga ccgaagagag acgctggggt 8880  
atgcaggata taccggggc gggacattcg ttccgcatac actccccat tcgagcttgc 8940  
tcgtccttgg cagagccgag cgcgaacggc tccgaacgcg gcaaggattt tggctctggt 9000  
gggtggaactc cgatcgaggc gcaggttctc cgcaggttct cgcaggccgg cagtggctgt 9060  
tagaaatagg gagtgcggga gtcttgacgc gccttagctc actctccgcc cacgcgcgca 9120  
tcgccgccat gccgccgtcc cgtctgtcgc tgcgtggcc gcgaccggt gcgccagagt 9180  
acgacagtgg gacagagctc gaggcgacgc gaatcgctcg ggttgtaagg gtttcaagg 9240  
tcgggcgtcg tcgctgcca aagtgaaaat agtagggggg ggggggggta c 9291

<210> 6  
<211> 6175  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

ES 2 701 403 T3

<220>  
<223> pCL0121

<400> 6

5

```

ctttatctg cctogcgccg ttgaccgccc cttgactott ggcgcttgcc gctogcatcc      60
tgcctcgctc ggcgagggcg gggggcgagt ggggtgggtcc gcagccttcc gcgctcgccc      120
gctagctcgc tcgcgccgtg ctgcagccag cagggcagca ccgcacggca ggcaggtccc      180
ggcgcggatc gatcgatcca tcgatccatc gatccatoga tcgtgcggtc aaaaagaaag      240
gaagaagaaa ggaaaaagaa aggcgtgcgc acccgagtgc gcgctgagcg cccgctcgcg      300
gtcccgggga gcctccgctg tagtccccgc cccgcgcccgc gcagtccccg gggagggcatc      360
gcgcacctct cgccgccccg tcgcgccctg ccgattcccc gcctcccctt ttccgcttct      420
tcgcccgcctc cgctcgcgcc cgcgctcgccc ggcgcccgcct ccctatctgc tcccagggg      480
ggcactccgc accttttgcg cccgctgccc ccgcccgggc cgcgccgccc ccttggtttc      540
ccccgcgagc gcgcccgcgt cgccgcgcaa agactcgccc cgtgccgccc cgagcaacgg      600
gtggcgggcg gcgcccggcg gggggggcgc gggcgcgcggt aggcggggct aggcgcccgc      660
taggcgaaac gccgcccccg gggcccggcg ccgcccgcctc cagagcagtc gcccgcccag      720
accgccaacg cagagaccga gaaccgagta cgtcgcgccc gagcacgccc cgacgcccgg      780
cagggacgag gagcacgacg ccgcccggcg ccgcccgggg ggggggaggg agaggcagga      840
cgcgggagcg agcgtgcatg tttccgcccg agacgacgcc gcgcccgcctg gagaggagat      900
aaggcgcttg gatcgcgaga gggccagcca ggctggaggc gaaaatgggt ggagaggata      960
gtatcttgcg tgcttgagcg aggagactga cgaggaggac ggatacgtcg atgatgatgt      1020
gcacagagaa gaagcagttc gaaagcgaact actagcaagc aagggatcca tgaagttcgc      1080
gacctcggtc gcaatthtgc ttgtggccaa catagccacc gccctcgccc agagcgatgg      1140
ctgcaccccc accgaccaga cgatggtgag caaggcgag gagctgttca ccggggtggt      1200
gcccatcctg gtcgagctgg acggcgacgt aaacggccac aagttcagcg tgtccggcga      1260
ggcgaggggc gatgccacct acggcaagct gacctgaag ttcatctgca ccaccggcaa      1320
gctgccgctg ccctggccca ccctcgtgac caccctgacc tacggcgtgc agtgcttcag      1380
ccgtacccc gaccacatga agcagcacga cttcttcaag tccgccatgc ccgaaggcta      1440
cgtccaggag gcaccatct tcttcaagga cgacggcaac tacaagacc gcgcccaggt      1500
gaagttcgag ggcgacacc tggtgaaccg catcgagctg aagggcacg acttcaagga      1560
ggacggcaac atcctgggac acaagctgga gtacaactac aacagccaca acgtctatat      1620

```

ES 2 701 403 T3

catggccgac aagcagaaga acggcatcaa ggtgaacttc aagatccgcc acaacatcga 1680  
ggacggcagc gtgcagctcg ccgaccacta ccagcagaac acccccatcg gcgacggccc 1740  
cgtgctgctg ccgacaacc actacctgag caccagtc ccocctgagca aagaccccaa 1800  
cgagaagcgc gatcacatgg tcctgctgga gttcgtgacc gccgccggga tcaactctcg 1860  
catggacgag ctgtacaagc accaccatca ccaccactaa catatgagtt atgagatccg 1920  
aaagtgaacc ttgtcctaac ccgacagcga atggcgggag ggggcgggct aaaagatcgt 1980  
attacatagt atttttcccc tactctttgt gtttgtcttt tttttttttt tgaacgcatt 2040  
caagccactt gtctgggttt acttgtttgt ttgcttgctt gcttgcttgc ttgcctgctt 2100  
cttggtcaga cggcccaaaa aagggaaaaa attcattcat ggcacagata agaaaaagaa 2160  
aaagtttgtc gaccaccgtc atcagaaagc aagagaagag aaacactcgc gctcacattc 2220  
tcgctcgcgt aagaatctta gccacgcata cgaagtaatt tgtccatctg gcgaatcttt 2280  
acatgagcgt tttcaagctg gagcgtgaga tcataccttt cttgatcgtat atgttccaac 2340  
cttgcatagg cctcgttgcg atccgctagc aatgcgtcgt actcccgttg caactgcgcc 2400  
atcgcctcat tgtgacgtga gttcagattc ttctcgagac cttcgagcgc tgctaatttc 2460  
gcctgacgct ccttcttttg tgcttccatg acacgcgcgt tcaccgtcgc ttccacttct 2520  
tcctcagaca tgcccttgcc tgccctgacc tgctcggtaa aacgggcccc agcacgtgct 2580  
acgagatttc gattccaccg ccgccttcta tgaaggttg ggcttcggaa tcgttttccg 2640  
ggacgccggc tggatgatcc tccagcgcgg ggatctcatg ctggagttct tcgccacccc 2700  
caacttgttt attgcagctt ataatggtta caataaagc aatagcatca caaatctcac 2760  
aaataaagca tttttttcac tgcattctag ttgtggtttg tccaaactca tcaatgtatc 2820  
ttatcataca tggcgcacct gcaggaacct gcattaatga atcggccaac gcgcggggag 2880  
aggcggtttg cgtattgggc gctcttccgc ttctcgcctc actgactcgc tgcgctcggt 2940  
cgttcggctg cggcgcgcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggg tatccacaga 3000  
atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg 3060  
taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc ccccctgacg agcatcacia 3120  
aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcggt 3180  
tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta ccggatacct 3240  
gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct 3300  
cagttcggtg taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc 3360  
cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtc ccacccggtaa gacacgactt 3420  
atcgcactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcggtgc 3480  
tacagagttc ttgaagtggg ggcctaacta cggctacact agaagaacag tatttggtat 3540

ES 2 701 403 T3

ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa 3600  
 acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa 3660  
 aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaacga 3720  
 aaactcacgt taagggattt tggatcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct 3780  
 tttaaattaa aaatgaagtt ttaaataaat ctaaagtata tatgagtaaa cttgggtctga 3840  
 cagttaccaa tgcttaatca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttcgttcac 3900  
 catagttgcc tgactccccg tctgttagat aactacgata cgggagggct taccatctgg 3960  
 cccagtgct gcaatgatac cgcgagaccc acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat 4020  
 aaaccagcca gccggaagg cgcgagcag aagtggctct gcaactttat ccgcctccat 4080  
 ccagtcctatt aattggtgcc gggagctag agtaagtagt tgcgagttta atagtttgcg 4140  
 caacgttgtt gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc tctgtctttg gtatggcttc 4200  
 attcagctcc ggttccccac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt tgtgcaaaaa 4260  
 agcggttagc tcttcggtc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg cagtgttctc 4320  
 actcatggtt atggcagcac tgcataattc tcttactgtc atgccatccg taagatgctt 4380  
 ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag 4440  
 ttgctcttgc ccggcgtcaa tacgggataa taccgogcca catagcagaa ctttaaaagt 4500  
 gctcatcatt ggaaaacgtt cttcggggcg aaaactctca aggatcttac cgtctgtgag 4560  
 atccagttcg atgtaaccca ctctgtcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac 4620  
 cagcgtttct gggtgagcaa aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaagg gaataagggc 4680  
 gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt cctttttcaa tattattgaa gcatttatca 4740  
 gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata acaaatagg 4800  
 ggttccgctc acatttcccc gaaaagtgcc acctgacgct taagaaacca ttattatcat 4860  
 gacattaacc tataaaaata ggcgtatcac gaggcctttt cgtctcgcgc gtttcgggtga 4920  
 tgacgggtgaa aacctctgac acatgcagct cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc 4980  
 ggatgccggg agcagacaag cccgtcaggg cgcgtcagcg ggtgttggcg ggtgtcgggg 5040  
 ctggcttaac tatgcccgat cagagcagat tgtactgaga gtgcaccaag cttccaattt 5100  
 taggcccccc actgaccgag gtctgtcgat aatccacttt tccattgatt ttccaggttt 5160  
 cgttaactca tgccactgag caaaactctg gtctttccta acaaaagctc tcctcacaaa 5220  
 gcatggcgcg gcaacggacg tgtcctcata ctccactgcc acacaaggct gataaactaa 5280  
 gtcctcaca aatagaggag aattccactg acaactgaaa acaatgtatg agagacgatc 5340  
 accactggag cggcgcggcg gttgggcgcg gaggtcggca gcaaaaacaa gcgactcgcc 5400

ES 2 701 403 T3

gagcaaacc gaatcagcct tcagacggtc gtgcetaaca acacgccgtt ctaccccgcc 5460  
 ttcttcgctc cccttcgctt ccaagcatcc ttcaagttta tctctctagt tcaacttcaa 5520  
 gaagaacaac accaccaaca ccatggccaa gttgaccagt gccgttcggt tgctcaccgc 5580  
 gcgcgacgtc gccggagcgg tcgagttctg gaccgaccgg ctccgggttct cccgggactt 5640  
 cgtggaggac gacttcgccc gtgtgggtccg ggacgacgtg accctgttca tcagcgcggt 5700  
 ccaggaccag gtggtgcccg acaacaccct ggcctgggtg tgggtgcgcg gcctggacga 5760  
 gctgtacgcc gagtgggtcg aggtcgtgtc cacgaacttc cgggacgcct cggggccggc 5820  
 catgaccgag atcggcgagc agccgtgggg gcgggagttc gccctgcgcg acccggccgg 5880  
 caactgcgtg cacttcgtgg ccgaggagca ggactgacac gtgctacgag atttcgattc 5940  
 caccgcccgc ttctatgaaa ggttgggctt cggaaatcgtt ttccgggacg ccggctggat 6000  
 gatcctccag cgcggggatc tcatgctgga gttcttcgcc caccccaact tgtttattgc 6060  
 agcttataat ggttacaat aaagcaatag catcacaat ttcacaaata aagcattttt 6120  
 ttcactgcat tctagttgtg gtttgtccaa actcatcaat gtatcttacc ggtac 6175

5 <210> 7  
 <211> 7174  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> pCL0125  
 <400> 7

ctcttatctg cctcgcgccc ttgaccgccc ctgactctt ggcgcttgc gctcgcaccc 60  
 tgccctcgtc gcgcaggcgg gcgggcgagt ggggtgggtcc gcagccttcc gcgctcgcgc 120  
 gctagctcgc tcgcccgtg ctgcagccag cagggcagca ccgcacggca ggcaggtccc 180  
 ggcgoggatc gatcgatcca tcgatccatc gatccatcga tcgtgcggtc aaaaagaaag 240  
 gaagaagaaa ggaaaaagaa aggcgtgcgc acccgagtgc gcgctgagcg cccgctcgcg 300  
 gtcccgcgga gcctccgct tagtcccgc cccgcgcgc gcagtcccc gggaggcacc 360  
 gcgcacctct cgcgccccc tcgcgcctcg ccgattcccc gcctcccctt ttccgcttct 420  
 tcgcgcctc cgctcgcggc cgcgtcgcgc gcgcccgcct ccctatctgc tccccagggg 480  
 ggcaactcgc accttttgcg cccgctgcgc ccgcccgggc cgcgccgccc ccctggtttc 540  
 ccccgcgagc gcggccgcgt cgcgcgcaa agactcgcgc cgtgccgccc cgagcaaccg 600  
 gtggcggcgg cgcggcggcg ggcggggcgc ggcggcgcgt aggcggggct aggcgcgggc 660  
 taggggaaac gccgccccg ggcgcgcgc ccgcgcgctc cagagcagtc gccgcgcag 720  
 accgccaacg cagagaccga gaccgaggta cgtcgcgccc gagcacgccc cgacgcgccc 780  
 cagggacgag gagcacgacg ccgcgcgcgc ccgcgcgggg ggggggaggg agaggcagga 840

ES 2 701 403 T3

cgcgggagcg agcgtgcatg tttccgcgcg agacgacgcc gcgcgcgctg gagaggagat 900  
 aaggcgcttg gatcgcgaga gggccagcca ggctggaggc gaaaatgggt ggagaggata 960  
 gtatcttgcg tgcttgacg aggagactga cgaggaggac ggatacgtcg atgatgatgt 1020  
 gcacagagaa gaagcagttc gaaagcgact actagcaagc aagggatcca tgaagaacat 1080  
 catctcgctc gtctccaaga agaaggccgc ttccaagaac gaggacaaga acatctcgga 1140  
 gtgcgtccgc gacatcgtca accagcagga ggtgtttaac actgaggact ttgaggaggg 1200  
 aaagaaggat tccgcttttg agcttgatca cctcgagttt accaccaact cggcccagct 1260  
 cggtgatagc gacgaggaca acgagaacgt catcaacgag atgaacgcga cggacgatgc 1320  
 taacgaggct aacagcgagg agaagtccat gaccctcaag caggccctcc ttaagtacc 1380  
 gaaggccgc ctttggtcca tccttgtttc caccactctt gtcattggagg gttacgacac 1440  
 cgcccttctc agcgcctctc acgctctccc tgtttttcag cgcaagttg gcaccctcaa 1500  
 cggagagggc tcctacgaga tcacctcca gtggcagatc ggtcttaaca tgtcgtgct 1560  
 ctgcggtgag atgatcggtc tccagatcac cacctacatg gttgagttta tgggtaaccg 1620  
 ctacactatg attaccgctc tcggcctcct cagggcgtac atctttatcc tctactactg 1680  
 caagtccctt gccatgattg ccgtcggta gattctcagc gccattccct ggggttgctt 1740  
 ccagtccctc gcggtcacct acgcctccga ggtctgcccc ctgcgccctc gttactacat 1800  
 gacctcctac agcaacattt gctggctggt tggacagatt ttgcttccg gcatcatgaa 1860  
 gaactcccag gagaacctcg gcaacagcga tctcggttac aagctccctc tcgcgctcca 1920  
 gtggatttg cggccccccc tcatgatcgg cattttcttt gcccccgaga gccctggtg 1980  
 gctcgtcgt aaggatcgtg tcgccgaggc ccgcaagtcg ctctccgta ttctctccgg 2040  
 caagggcgcc gagaaggaca ttcaggtcga cctcacctc aagcagattg agcttaccat 2100  
 tgagaaggag cgctcctcg cgtccaagtc gggctccttt tttaactgct ttaaggaggt 2160  
 caacggccgc cgtaccgctc ttgcctgctt gacctgggtt gcccagaact cgtcggggc 2220  
 cgtgctcctc ggctactcca cctacttttt tgagaagaag caggatcatg ccaccgacaa 2280  
 ggctttcact ttctcgctta tccagtaactg cctcggcctt gccggtactc tctgcagctg 2340  
 ggtcatctcg ggccgcgtgg gccgctggac catcctcaag tacggcctcg cttttcagat 2400  
 ggtttgcctc tttattatcg gtggcatggg atttggttcg ggctcctccg ctccaacgg 2460  
 cgcgggcggc ctecttctcg ctctcagctt tttttacaac gccggaattg gtgcgctcgt 2520  
 ctactgcatt gttgccgaga tcctctggc cgagctccgc acgaagacca tcgtccttgc 2580  
 ccgcatctgc tacaacctca tggccgtcat caacgccatc ctacccccct acatgctcaa 2640  
 cgtgctggac tggaaactgg gcgccaaagac gggactttac tggggtggct ttaccgctgt 2700

ES 2 701 403 T3

gacccttgcc tgggttatta tcgacctccc cgagaccacc ggccgtacct tctccgagat 2760  
caacgagctc ttaaccagg gtgtccccgc ccgtaagttt gcctcgacgg tcgtcgaccc 2820  
ttttgaaaag ggcaagacgc agcacgactc cctcgccgac gagtocattt cgcagtccag 2880  
ctcgatcaag cagcgtgagc ttaacgccgc cgacaagtgc taacatatga gttatgagat 2940  
ccgaaagtga accttgcct aacccgacag cgaatggcgg gagggggcgg gctaaaagat 3000  
cgtattacat agtatttttc ccctactcct tgtgtttgtc tttttttttt ttttgaacgc 3060  
attcaagcca cttgtctggg tttacttggt tgtttgcttg cttgcttgct tgcttgctg 3120  
cttcttggtc agacggccca aaaaagggaa aaaattcatt catggcacag ataagaaaaa 3180  
gaaaaagttt gtcgaccacc gtcacagaa agcaagagaa gagaaacact cgcgctcaca 3240  
ttctcgctcg cgtaagaatc ttagccacgc atacgaagta atttgtccat ctggcgaatc 3300  
ttacatgag cgttttcaag ctggagcgtg agatcatacc tttcttgatc gtaatgttcc 3360  
aaccttgcac aggcctcgtt gcgatccgct agcaatgcgt cgtactcccg ttgcaactgc 3420  
gccatcgctc cattgtgacg tgagttcaga ttcttctcga gaccttcgag cgctgctaac 3480  
ttcgctgac gctccttctt ttgtgcttcc atgacacgcc gcttcaccgt gcgttccact 3540  
tcttctcag acatgccctt ggetgcctcg acctgctcgg taaaacgggc cccagcacgt 3600  
gctacgagat ttcgattcca ccgccgctt ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt 3660  
ccgggacgcc ggctggatga tcctccagcg cggggatctc atgctggagt tcttcgcca 3720  
ccccaacttg tttattgcag cttataatgg ttacaaataa agcaatagca tcacaaattt 3780  
cacaaataaa gcattttttt cactgcattc tagttgtggt ttgtccaaac tcatcaatgt 3840  
atcttatcat acatggtcga cctgcaggaa cctgcattaa tgaatcggcc aacgcgcggg 3900  
gagaggcggg ttgcgtattg ggcgctcttc cgcttctcgc ctcaactgact cgctgcgctc 3960  
ggcgttcgg ctgcggcgag cggtatcagc tcaactcaaag gcggtataac ggttatccac 4020  
agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa 4080  
ccgtaaaaag gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc cgccccctg acgagcatca 4140  
caaaaatcga cgctcaagtc agaggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc 4200  
gtttccccct ggaagetccc tcgtgcgctc tctgttccg accctgccgc ttaccggata 4260  
cctgtccgcc tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac gctgtaggta 4320  
tctcagttcg gtgtaggctg ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac cccccgttca 4380  
gccccaccgc tgcgccttat ccgtaacta tcgtcttgag tccaaccgg taagacacga 4440  
cttatcgcca ctggcagcag ccaactggtaa caggattagc agagcgaggc atgtaggcgg 4500  
tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagaa cagtatttgg 4560  
tatctcgctc ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg 4620

ES 2 701 403 T3

caaaciaaacc accgctggta gcggtggttt ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag 4680  
 aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggctctgacg ctcagtggaa 4740  
 cgaaaaactca cgtaagggga ttttggatcat gagattatca aaaaggatct tcacctagat 4800  
 ccttttaaat taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc 4860  
 tgacagttac caatgcttaa tcagtgaggc acctatctca gcgatctgtc tatttcggtc 4920  
 atccatagtt gcctgactcc ccgtcgtgta gataactacg atacgggagg gcttaccatc 4980  
 tggccccagt gctgcaatga taccgcgaga cccacgctca ccggctccag atttatcagc 5040  
 aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg cagaagtggc cctgcaactt tatccgcctc 5100  
 catccagtct attaattggt gccgggaagc tagagtaagt agttcgccag ttaatagttt 5160  
 gcgcaacggt gttgccattg ctacaggcat cgtggtgtca cgctcgtcgt ttggtatggc 5220  
 ttcattcagc tccggttccc aacgatcaag gcgagttaca tgatccccca tgttgtgcaa 5280  
 aaaagcgggt agctccttcg gtcctccgat cgttgtcaga agtaagttgg ccgcagtgtt 5340  
 atcactcatg gttatggcag cactgcataa ttctcttact gtcattgcat ccgtaagatg 5400  
 cttttctgtg actggtgagt actcaaccaa gtcattctga gaatagtgtg tgccggcgacc 5460  
 gagttgctct tgccccgcgt caatacggga taataccggc ccacatagca gaactttaa 5520  
 agtgctcacc attgaaaaac gttcttcggg gcgaaaaactc tcaaggatct taccgctgtt 5580  
 gagatccagt tcgatgtaac ccactcgtgc acccaactga tcttcagcat cttttacttt 5640  
 caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaat gccgcaaaa aggaataag 5700  
 gggacacagc aaatggtgaa tactcatact cttccttttt caatattatt gaagcattta 5760  
 tcagggttat tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat 5820  
 aggggttccg cgcacatttc cccgaaaagt gccacctgac gtctaagaaa ccattattat 5880  
 catgacatta acctataaaa ataggcgtat cacgaggccc tttcgtctcg cgcgtttcgg 5940  
 tgatgacggt gaaaacctct gacacatgca gctcccggag acggtcacag cttgtctgta 6000  
 agcggatgcc gggagcagac aagcccgtca gggcgcgtca gcgggtggtg gcgggtgtcg 6060  
 gggctggctt aactatgcgg catcagagca gattgtactg agagtgcacc aagcttgagg 6120  
 tctgtcgata atccactttt ccattgattt tccaggtttc gtttaactcat gccactgagc 6180  
 aaaacttcgg tctttcctaa caaaagctct cctcaciaaag catggcgcgg caacggacgt 6240  
 gtcctcatac tccactgcca cacaaggtcg ataaactaag ctctcaciaa atagaggaga 6300  
 attccactga caactgaaaa caatgtatga gagacgatca ccactggagc ggcgcggcgg 6360  
 ttgggcgcgg aggtcggcag caaaaacaag cgactcgcgg agcaaacccg aatcagcctt 6420  
 cagacggtcg tgcttaacaa cacgccgttc taccocgcct tcttcgogcc ccttcgcgtc 6480

ES 2 701 403 T3

caagcatcct tcaagtttat ctctctagtt caacttcaag aagaacaaca ccaccaaacac 6540  
 catggccaag ttgaccagtg ccgttcoggt gctcaccgcg cgcgacgtcg ccggagcggc 6600  
 cgagttctgg accgaccggc tcgggttctc ccgggacttc gtggaggacg acttcgcggg 6660  
 tgtggtccgg gacgacgtga ccctgttcat cagcgcggtc caggaccagg tggcgccgga 6720  
 caacaccctg gcctgggtgt gggcgccgcg cctggacgag ctgtacgccg agtggtcgga 6780  
 ggtcgtgtcc acgaacttcc gggacgcctc cgggcccggc atgaccgaga tcggcgagca 6840  
 gccgtggggg cgggagttcg ccctgcgcga cccggccggc aactgcgtgc acttcgtggc 6900  
 cgaggagcag gactgacacg tgctacgaga ttctgattcc accgccgcct tctatgaaag 6960  
 gttgggcttc ggaatcgttt tcggggacgc cggctggatg atcctccagc gcggggatct 7020  
 catgctggag ttcttcgccc accccaactt gtttattgca gcttataatg gttacaaata 7080  
 aagcaatagc atcacaatc tcacaaataa agcatttttt tcaactgcatt ctagtgtggg 7140  
 tttgtccaaa ctcatcaatg tatcttatog gtac 7174

5

<210> 8  
 <211> 6871  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10

<220>  
 <223> pCL0126  
 <400> 8

ctcttatctg cctcgcgcg ttgaccgcg cttgactctt ggcgcttgcc gctcgcaccc 60  
 tgcctcgtc gcgcagggcg gcgggcgagt gggcggtcc gcagccttc gcgctcggcc 120  
 gctagctcgc tcgcgcctg ctgcagccag cagggcagca ccgcacggca ggcaggtccc 180  
 ggcgcggatc gatcgatcca tcgatccatc gatccatcga tcgtgcggtc aaaaagaaag 240  
 gaagaagaaa ggaaaaagaa aggcgtgccc acccgagtgc gcgctgagcg cccgctcgcg 300  
 gtcccgcgga gcctccggt tagtccccgc cccgcgcgc gcagtccccc gggaggcatc 360  
 gcgcacctct cgcgcctcgc tcgcgcctcg ccgattcccc gcctcccctt ttccgcttct 420  
 tcgcgcctc cgcctcggcg cgcgtcggcc gcgcccgcct ccctatctgc tcccagggg 480  
 ggcactccgc accttttgcg ccgctgccc ccgcccggcg cgcgcccgcg ccctggtttc 540  
 ccccgcgagc gcggccggt cgcgcgcgaa agactcggcg cgtgccgccc cgagcaaagg 600  
 gtggcgcgcg cgcggcgcg ggcggggcg ggcggcgct aggcggggct aggcgcggc 660  
 taggcgaaac gccgcccccg ggcgcgcgc ccgcccgcct cagagcagtc gccgcgccag 720  
 accgccaacg cagagaccga gaccgaggtc cgtcgcgccc gagcacgccg cgacgcggcg 780  
 cagggacgag gagcacgag ccgcgcggcg ccgcgcgggg ggggggaggg agaggcagga 840  
 cgcgggagcg agcgtgcatg ttccgcgcg agacgacgcc gcgcgcgctg gagaggagat 900

ES 2 701 403 T3

aaggcgcttg gatcgcgaga gggccagcca ggctggaggg gaaaatgggt ggagaggata 960  
gtatcttgcg tgcttggacg aggagactga cgaggaggac ggatacgtcg atgatgatgt 1020  
gcacagagaa gaagcagttc gaaagcgact actagcaagc aagggatcca tggagaacgg 1080  
cactaagcgt gagggccttg gaaagctcac tgtcagctcc tcctccagg tcgagcagcc 1140  
cctcgcccc agcaagctct ggaagattat tgtcgtcgtc tcgatcgccg cgggtgtcca 1200  
gtttggctgg gcccttcagc tctcgtcctt tactccctac gttcagcttc tcggtattcc 1260  
tcacaagttc gcgtccttta tttggctctg cggaccgatt tcgggtatga tcgtgcagcc 1320  
ggtcgtcggg tactactcgg ataactgctc gtcgcgtttt ggccgtcggc gtccttttat 1380  
cgccgctggg gccgctctcg ttatgattgc cgttttcctt atcggttttg ccgctgacct 1440  
cggccacgcc tcgggtgaca ccctcggtaa gggtttcaag cctcgggcca ttgccgtctt 1500  
cgtcgtcggc ttctggattc tcgacgtcgc taacaacatg cttcagggac cctgccgcgc 1560  
cctcctcgtc gacctctcgg gcggaaagtc cggccgcgat cgcaccgcta acgccttctt 1620  
cagcttcttc atggccgtcg gcaacatcct cggctacgcc gccggctcct acagccacct 1680  
ctttaaggtc tttccctttt ccaagacgaa ggcctgcgat atgtactgcg ctaacctcaa 1740  
gtcctgcttt tttatcgcca tcttctctt tctctcgtc acgaccattg ccctgacctt 1800  
cgtccgcgag aacgagctcc ctgagaagga cgagcaggag atcgacgaga agctcgtctg 1860  
cgccggcaag tccaaggctc cgttcttcgg cgagatcttt ggcgccctca aggagcttcc 1920  
ccgcccgatg tggattctcc tccttgttac ttgcctcaac tggattgcct ggtttccctt 1980  
tttctctac gacactgact ggatggctaa ggaggttttt ggtggccagg tcggtgatgc 2040  
ccgcctctac gatctcggcg tccgcgctgg tgcgatgggc cttctccttc agagcgtcgt 2100  
cctcggcttt atgtccctcg gagttgagtt tctcgttaag aagatcggcg gagccaagcg 2160  
cctttggggc atcctcaact ttgtgctcgc catctgcctg gctatgacca tccttgtgac 2220  
taagatggct gagaagtccc gccagcatga tcctgccggc acgcttatgg gtcogacccc 2280  
cggcgtcaag atcggcgtc tttctctctt tgctgccctc ggtattcccc tcgcgccac 2340  
tttttcgatt cccttcgtc tcgcctcgat tttctcctcc aaccgtggtt cgggtcaggg 2400  
tctcagcctc ggtgtgctca accttgccat tgtggtcccc cagatgcttg tctcgttgt 2460  
cggcggaccc tgggatgatc ttttcggcgg aggaaacctt ccgggcttcg ttgttggcgc 2520  
tgtcgcgcc gccggcctcg ctgtcctcgc cctcaccatg ctcccttcgc ctcccgccga 2580  
tgccaagcct gccgttgcca tgggccttag cattaagtaa catatgagtt atgagatccg 2640  
aaagtgaacc ttgtcctaac ccgacagcga atggcgggag ggggcgggct aaaagatcgt 2700  
attacatagt atttttcccc tactctttgt gtttgtcttt ttttttttt tgaacgcatt 2760

ES 2 701 403 T3

caagccactt gtctggggtt acttgtttgt ttgcttgctt gcttgcttgc ttgcttgctt 2820  
 cttggtcaga cggcccaaaa aagggaaaaa attcattcat ggcacagata agaaaaagaa 2880  
 aaagtttgtc gaccaccgtc atcagaaagc aagagaagag aaacactcgc gctcacattc 2940  
 tcgctcgcgt aagaatctta gccacgcata cgaagtaatt tgtccatctg gcgaatcttt 3000  
 acatgagcgt tttcaagctg gagcgtgaga tcataccttt cttgatcgtc atgttccaac 3060  
 cttgcatagc cctcgttgcg atccgctagc aatgcgtcgt actcccgttg caactcgcgc 3120  
 atcgcctcat tgtgacgtga gttcagattc ttctcgagac cttcgagcgc tgctaatttc 3180  
 gcctgacgct ccttcttttg tgcttccatg acacgccgct tcaccgtcgc ttccacttct 3240  
 tcctcagaca tgcccttggc tgctcagacc tgctcggtaa aacgggcccc agcacgtgct 3300  
 acgagatttc gattccaccg ccgccttcta tgaaagggtg ggcttcggaa tcgttttccg 3360  
 ggacgccggc tggatgatcc tccagcgcgg ggatctcatg ctggagtctc tcgcccacc 3420  
 caacttgttt attgcagctt ataatggta caaataaagc aatagcatca caaatctcac 3480  
 aaataaagca tttttttcac tgcattctag ttgtgggttg tccaaactca tcaatgtatc 3540  
 ttatcataca tggctgacct gcaggaacct gcattaatga atcggccaac gcgcggggag 3600  
 aggcgggttg cgtattgggc gctcttcgc ttctcgtc actgactcgc tgcgctcggc 3660  
 cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggc tatccacaga 3720  
 atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg 3780  
 taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc ccccctgacg agcatcacia 3840  
 aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaac cccgacagga ctataaagat accaggcgtt 3900  
 tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta ccgataacct 3960  
 gtccgccttt ctccctcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct 4020  
 cagttcggtg taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc 4080  
 cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aaccggtaa gacacgactt 4140  
 atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg tagggcgtgc 4200  
 tacagagttc ttgaagtggc ggccctaact cggctacact agaagaacag tatttggat 4260  
 ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa 4320  
 acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa 4380  
 aaaaggatct caagaagate ctttgatctt ttctacgggg totgacgctc agtggaacga 4440  
 aaactcacgt taagggattt tggcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct 4500  
 tttaaattaa aatgaagtt ttaaatcaat ctaaagtata tatgagtaa cttggtctga 4560  
 cagttaccaa tgcttaatca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttcgttcatc 4620  
 catagttgcc tgactccccg tcgtgtagat aactacgata cgggaggcgt taccatctg 4680

ES 2 701 403 T3

cccagtgct gcaatgatac cgcgagaccc acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat 4740  
 aaaccagcca gccggaagg ggcgagcagc aagtggctct gcaactttat cgcctccat 4800  
 ccagtctatt aattgttgcc ggggaagctag agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcc 4860  
 caacgttggt gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc 4920  
 attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt tgtgcaaaaa 4980  
 agcggttagc tccttcggtc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg cagtgttatc 5040  
 actcatgggt atggcagcac tgcataattc tcttactgtc atgccatccg taagatgctt 5100  
 ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag 5160  
 ttgctcttgc ccggcgtcaa tacgggataa taccgcgcc aatagcagaa ctttaaaagt 5220  
 gctcatcatt ggaaaacggt ctccggggcg aaaactctca aggatcttac cgctgttgag 5280  
 atccagttcg atgtaacca ctctgcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac 5340  
 cagcgtttct ggggtgagcaa aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc 5400  
 gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt cctttttcaa tattattgaa gcatttatca 5460  
 gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatag 5520  
 ggttccgcgc acatttccc gaaaagtgcc acctgacgtc taagaaacca ttattatcat 5580  
 gacattaacc tataaaaaata ggcgtatcac gaggccctt cgtctcgcgc gtttcgggtga 5640  
 tgacggtgaa aacctctgac acatgcagct cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc 5700  
 ggatgccggg agcagacaag cccgtcaggg cgcgtcagcg ggtgttggcg ggtgtcgggg 5760  
 ctggcttaac tatgcggcat cagagcagat tgtactgaga gtgcaccaag cttgaggtct 5820  
 gtcgataatc cacttttcca ttgattttcc aggtttcgtt aactcatgcc actgagcaaa 5880  
 acttcggtct ttcttaacaa aagctctct cacaagcat ggcggggcaa cggacgtgtc 5940  
 ctcatactcc actgccacac aaggtcgata aactaagctc ctcaaaaata gaggagaatt 6000  
 ccactgacaa ctgaaaacaa tgtatgagag acgatcacca ctggagcggc gcggcggttg 6060  
 ggcgcggagg tcggcagcaa aaacaagcga ctgcgcagc aaaccggaat cagccttcag 6120  
 acggtcgtgc ctaacaacac gccgttctac cccgccttct tcgcgccct tcgcgtccaa 6180  
 gcaccttca agtttatctc tctagttaa cttcaagaag aacaacacca ccaacacat 6240  
 ggccaagttg accagtgcg ttcgggtgct caccgcgcgc gacgtcgcg gagcggtcga 6300  
 gttctggacc gaccggctcg ggttctccc ggacttcgtg gaggacgact tcgccggtgt 6360  
 ggtccgggac gacgtgaccc tgttcatcag cgcggtccag gaccaggtgg tgccggacaa 6420  
 caccctggcc tgggtgtggg tgcgcggcct ggacgagctg tacgccgagt ggtcggaggt 6480  
 cgtgtccacg aacttccggg acgcctccg gccggccatg accgagatcg gcgagcagcc 6540

ES 2 701 403 T3

gtggggcgag gagttcgccc tgcgogacccc ggccggcaac tgcgtgcact tgcgtggcoga 6600  
 ggagcaggac tgacacgtgc tacgagatth cgattccacc gcgccttct atgaaaggth 6660  
 gggcttcgga atcgthttcc gggacgcccg ctggatgac cccagcgcg gggatctcat 6720  
 gctggagthc ttcgcccacc ccaactgth tattgcagct tataatgtht acaaataaag 6780  
 caatagcacc acaaatttca caaataaagc atthttttca ctgcattcta gthgtgtht 6840  
 gtccaaactc atcaatgtht cttatcgtha c 6871

<210> 9  
 <211> 6611  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> pCL0122

10

<400> 9

ctcttatctg cctogcgcg ttgaccgcg cttgactctt ggcgcttgc gctcgcacc 60  
 tgcctcgcct gcgcaggcgc gcgggcgagth gggthggthc gcagccttcc gcgctcgcct 120  
 gctagctcgc tcgcgccgth ctgcagccag cagggcagca ccgcaccgca ggcaggtccc 180  
 ggcgcgggac gatcgatcca tcgatccacc gatccaccga tcgthgcgthc aaaaagaaa 240  
 gaagaagaaa ggaaaaagaa aggcgthgcgc acccagthgc gcgctgagcgc cccgctcgcg 300  
 gtcccgggga gcctccgctg tagtccccgc cccgcgcgcgc gcagthcccc gggaggtacc 360  
 gcgcacctct gcgcgcccc tcgcgcctcg ccgattcccc gcctcccctt ttcgcttct 420  
 tcgcgcctc cgctcgcgcgc cgcgthgcct gcgcctccgct ccctatctgc tccccagggg 480  
 ggcactccgc acctthtgcg cccgctcgcg ccgcgcgggc gcctccgcgc ccctgthtthc 540  
 ccccgcgagc gcggccgctg cgcgcgcgca agactcgcgc cgtgcgcgcc cgagcaaccg 600  
 gtggggcgag cgcggcggcg ggcggggcgc ggcggcgct aggcggggct aggcgcgcgc 660  
 taggcgaaa cccgccccgc ggcgcgcgcg ccgcctcctc cagagcagth gccgcgccag 720  
 accgccaacc cagagaccga gaccgagtha cgtcgcgcct gagcacgcgc gcacgcgcgcg 780  
 cagggacgag gacacgcgc cgcgcgcgcg ccgcgcgggg ggggggaggg agaggcagga 840  
 cgcgggagcgc agcgtgcatg thtccgcgcg agacgcgcct gcgcgcgctg gagaggagat 900  
 aaggcgcctg gatcgcgaga gggccagcca ggctggaggc gaaaatgtht ggagaggata 960  
 gthcttthgc thctthgagc aggagactga cagaggagc ggatacctg atgatgatgth 1020  
 gcacagagaa gaagcagthc gaaagcgcct actagcaagc aagggatcca tgaagthcgc 1080  
 gacctcgcgc gcaattthgc thgtggccaa catagccacc gcctcgcgc agagcagthg 1140  
 ctgcaccccc accgaccaga cagthgtgag caaggcgag gagctgthca cggggthgth 1200  
 gcccatcctg gthcagctg aggcgcagct aaacggccac aagthcagc thtccggcga 1260

ES 2 701 403 T3

gggcgagggc gatgccacct acggcaagct gaccctgaag ttcattctgca ccaccggcaa 1320  
 gctgcccgctg ccctggccca ccctcgtgac caccctgacc tacggcgtgc agtgcttcag 1380  
 ccgctacccc gaccacatga agcagcacga cttcttcaag tccgccatgc ccgaaggcta 1440  
 cgtccaggag cgcaccatct tcttcaagga cgacggcaac tacaagaacc gcgccgaggt 1500  
 gaagttcgag ggggacaccc tggggaaccg catcgagctg aagggcatcg acttcaagga 1560  
 ggacggcaac atcctgggac acaagctgga gtacaactac aacagccaca acgtctatat 1620  
 catggccgac aagcagaaga acggcatcaa ggtgaacttc aagatccgcc acaacatcga 1680  
 ggacggcagc gtgcagctcg ccgaccacta ccagcagaac acccccatcg gcgacggccc 1740  
 cgtgctgctg ccgacaacc actacctgag caccagctcc gccctgagca aagaccccaa 1800  
 cgagaagcgc gatcacatgg tcctgctgga gttcgtgacc gccgccggga tcaactctcg 1860  
 catggacgag ctgtacaagc accaccatca ccaccactaa catatgagtt atgagatccg 1920  
 aaagtgaacc ttgtcctaac ccgacagcga atggcgggag gggcgggct aaaagatcgt 1980  
 attacatagt atttttcccc tactctttgt gtttgtcttt tttttttttt tgaacgcatt 2040  
 caagccactt gtctgggttt acttgtttgt ttgcttgcct gcttgcctgc ttgcctgctt 2100  
 cttggtcaga cggcccaaaa aagggaaaaa attcattcat ggacagata agaaaaagaa 2160  
 aaagtttgcg gaccaccgtc atcagaaagc aagagaagag aaacactcgc gctcacattc 2220  
 tcgctcgcgt aagaatctta gccacgcata cgaagtaatt tgtccatctg gcgaatcttt 2280  
 acatgagcgt tttcaagctg gagcgtgaga tcataccttt cttgatcgtg atgttccaac 2340  
 cttgcatagc cctcgttgcg atccgctagc aatgcgtcgt actcccgttg caactgcgcc 2400  
 atgcctcat tgtgacgtga gttcagattc ttctcgagac cttcgagcgc tgctaatttc 2460  
 gcctgacgct ccttcttttg tgcttccatg acacgccgct tcaccgtcgc ttccacttct 2520  
 tcctcagaca tgcccttggc tgcctcgacc tgctcggtaa aacgggcccc agcacgtgct 2580  
 acgagatttc gattccaccg ccgccttcta tgaaaggttg ggcttcggaa tcgttttccg 2640  
 ggacgccggc tggatgatcc tccagcgcgg ggatctcatg ctggagttct tcgcccacc 2700  
 caacttgttt attgcagctt ataatggtta caaataaagc aatagcatca caaatttcac 2760  
 aaataaagca tttttttcac tgcattctag ttgtggtttg tccaaactca tcaatgtatc 2820  
 ttatcataca tggctgacct gcaggaacct gcattaatga atcggccaac gcgcggggag 2880  
 aggcgggttg cgtattgggc gctcttccgc ttctcgtctc actgactcgc tgcgctcgg 2940  
 cgttcggcgt cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggg tatccacaga 3000  
 atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg 3060  
 taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc cccctgacg agcatcacia 3120

ES 2 701 403 T3

aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accagggcgtt 3180  
 tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgcccgtta cgggatacct 3240  
 gtcgcgcttt ctoccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctoacgct gtaggtatct 3300  
 cagttcgggtg taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc cggttcagcc 3360  
 cgaccgctgc gcottatccg gtaactatcg tcttgagtcc aaccggtaa gacacgactt 3420  
 atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcgggtgc 3480  
 tacagagttc ttgaagtgtt ggcctaacta cggctacact agaagaacag tatttggat 3540  
 ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt gtagctctt gatccggcaa 3600  
 acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa 3660  
 aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaacga 3720  
 aaactcacgt taagggattt tggatcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct 3780  
 tttaaattaa aaatgaagtt ttaaatcaat ctaaagtata tatgagtaaa cttgggtctga 3840  
 cagttaccaa tgcttaatca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttogttcatc 3900  
 catagttgcc tgactccccg tctgttagat aactacgata cgggagggct taccatctgg 3960  
 cccagtgct gcaatgatac cgcgagaccc acgctcaccc gctccagatt tatcagcaat 4020  
 aaaccagcca gccggaaggc cggagcgcag aagtggctct gcaactttat ccgcctccat 4080  
 ccagttctatt aattgttgcc ggggaagctag agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcc 4140  
 caacgttggt gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc tctctgtttg gtatggcttc 4200  
 attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga tccccatgt tgtgcaaaaa 4260  
 agcggttagc tcttcggtc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg cagtgttatc 4320  
 actcatgggt atggcagcac tgcataatto tcttactgtc atgccatccg taagatgctt 4380  
 ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag 4440  
 ttgctcttgc cgggcgtcaa tacgggataa taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt 4500  
 gctcatcatt ggaaaacgtt ctccggggcg aaaactctca aggatcttac cgctgttgag 4560  
 atccagttcg atgtaaccca ctctgtcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac 4620  
 cagcgtttct gggtgagcaa aaacaggaag gcaaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc 4680  
 gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt ctttttcaa tattattgaa gcatttatca 4740  
 gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg 4800  
 ggttccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc acctgacgtc taagaaacca ttattatcat 4860  
 gacattaacc tataaaaaata ggcgtatcac gaggcccttt cgtctcgcgc gtttcgggtga 4920  
 tgacggtgaa aacctctgac acatgcagct cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc 4980  
 ggatgccggg agcagacaag cccgtcaggg cgcgtcagcg ggtgttggcg ggtgtcgggg 5040

ES 2 701 403 T3

ctggcctaac tatgcgcat cagagcagat tgtactgaga gtgcaccaag cttccaattt 5100  
taggcccccc actgaccgag gtctgtcgat aatccacttt tccattgatt ttccaggttt 5160  
cgtaactca tgccactgag caaaacttcg gtctttccta acaaaagctc toctcaciaa 5220  
gcatggcgcg gcaacggacg tgcctcata ctccactgcc acacaaggtc gataaactaa 5280  
gctcctcaca aatagaggag aattccactg acaactgaaa acaatgtatg agagacgatc 5340  
accactggag cggcgcgcg gttggcgcg gaggtcggca gcaaaaacaa gcgactcgcc 5400  
gagcaaacc cgaatcagcct tcagacggtc gtgcctaaca acacgcogtt ctaccccgcc 5460  
ttcttcgagc ccttcgagc ccaagcatcc ttcaagtta tctctctagt tcaacttcaa 5520  
gaagaacaac accaccaaca ccatgattga acaagatgga ttgcacgcag gttctccggc 5580  
cgcttggtg gagaggctat tcggctatga ctgggcacaa cagacaatcg gctgctctga 5640  
tgccgccgtg ttccggctgt cagcgcaggg gcgcccgggt cttttgtca agaccgacct 5700  
gtccggtgcc ctgaatgaac tgcaggacga ggcagcgcg ctatcgtggc tggccacgac 5760  
ggcggttcct tgcgcagctg tgctcgacgt tgcactgaa gcgggaaggg actggctgct 5820  
attggcgaa gtgcccgggc aggatctcct gtcatctcac cttgctcctg ccgagaaagt 5880  
atccatcatg gctgatgcaa tgcggcggt gcatacgtt gatccggcta cctgccatt 5940  
cgaccaccaa gcaaacatc gcatcgagcg agcagctact cggatggaag ccggtctgt 6000  
cgatcaggat gatctggacg aagagcatca gggctcggc ccagccgaac tgttcgccag 6060  
gctcaaggcg cgcattgccg acggcgatga tctcgtcgtg acccatggcg atgcctgctt 6120  
gccgaatac atggtgaaa atggcgcgtt ttctggattc atcgactgtg gccggctggg 6180  
tgtggcgac cgctatcagg acatagcgtt ggctaccogt gatattgctg aagagcttgg 6240  
cggcgaatgg gctgaccgct tcctcgtgct ttacggatc gccgctccg attcgcagcg 6300  
catgccttc tatgccttc ttgacgagtt attctgacac gtgctacgag atttcgatc 6360  
caccgcgcc ttctatgaaa gtttgggctt cggaatcgtt ttccgggacg ccggtggat 6420  
gatcctccag cgcggggatc tcatgctgga gttcttcgcc caccccaact tgtttattgc 6480  
agcttataat ggttacaaat aaagcaatag catcacaat ttcaacaata aagcattttt 6540  
ttcactgcat tctagttgtg gtttgcctaa actcatcaat gtatcttacc atgtctgaat 6600  
tcccgggta c 6611

<210> 10  
<211> 7295  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5

<220>  
<223> pCL0127

10

<400> 10

ES 2 701 403 T3

ctcttatctg cctcgcgccc ttgaccgccc cttgactctt ggcgcttgcc gctcgcaccc 60  
tgccctcgctc gcgcagggcg gcgggagagt gggtaggtcc gcagccttcc gcgctcgcgc 120  
gctagctcgc tcgcgccgtg ctgcagccaag caggggcagca ccgcacggca ggcaggtccc 180  
ggcgcggatc gatcgatcca tcgatccatc gatccatcga tcgtgcggtc aaaaagaaag 240  
gaagaagaaa ggaaaaagaa aggcgtgcgc acccgagtgc gcgctgagcg cccgctcgcg 300  
gtcccgcgga gcctccgctg tagtccccgc cccgcgcccgc gcagtcccc gggaggcatc 360  
gcgcacctct cgcgccccc tcgcgcctcg ccgattcccc gcctcccctt ttccgcttct 420  
tcgcgcctc cgtcgcggc cgcgtcgcgc gcgccccgct ccctatctgc tccccagggg 480  
ggcactccgc accttttgcg cccgctgcgc ccgcgcgggc cgcgcccgcg ccttggttcc 540  
ccccgcgagc gcggccgctg cgcgcgcgca agactcgcgc cgtgccgccc cgagcaacgg 600  
gtggcggcgg cgcggcggcg ggcggggcgc ggcggcgcgt aggcggggct aggcgcggc 660  
taggcgaaac gccgccccg ggcgcgcgccc ccgcccgtc cagagcagtc gccgcgccag 720  
accgccaacg cagagaccga gaccgaggtg cgtcgcgccc gagcacgccc cgacgcgcgg 780  
cagggacgag gagcacgacg ccgcgcgcgc ccgcgcgggg ggggggaggg agaggcagga 840  
cgcgggagcg agcgtgcatg tttccgcgcg agacgacgcc gcgcgcgctg gagaggagat 900  
aagcgccttg gatcgcgaga gggccagcca ggctggaggc gaaaatgggt ggagaggata 960  
gtatcttgcg tgcttgagc aggagactga cgaggaggac ggatacgtc atgatgatgt 1020  
gcacagagaa gaagcagttc gaaagcagc actagcaagc aaggatcca tgaccaacga 1080  
gacctcggac cgcctctcg tgcactttac cccaacaag ggttgatga acgatcccaa 1140  
cggcctctgg tacgacgaga aggatgctaa gtggcacctt tactttcagt acaaccctaa 1200  
cgacaccgtc tggggcacc cgcctctctg gggccacgcc acctccgac acctcaccaa 1260  
ctgggaggac cagcccattg ctatcgcccc caagcgcaac gactcgggag ctttttccgg 1320  
ttccatggtt gtggactaca acaacacctc cggttttttt aacgacacca ttgacccccg 1380  
ccagcgcctg gtcgccatct ggacctaca cagccccgag agcgaggagc agtacatcag 1440  
ctacagcctt gatggaggct acacctttac cgagtaccag aagaacctg tcctcgcgc 1500  
caactccacc cagttccgc accctaaggt ttttggtac gagccttccc agaagtggat 1560  
tatgaccgcc gctaagtcgc aggattaca gatcgagatc tacagcagcg acgacctcaa 1620  
gtcctggaag cttgagtcg cctttgcaa cgagggtttt ctcgatacc agtacgagtg 1680  
ccccggtctc atcgaggtcc ccaccgagca ggaccctcc aagtcctact gggtcattgt 1740  
tatttccatc aacctggcg cccctgcccg cggcagcttc aaccagtact tcgtcggctc 1800  
ctttaacggc acgcattttg aggccttcga caaccagtcc cgcgtcgtcg acttcggcaa 1860

ES 2 701 403 T3

ggactactac gccctccaga ccttctttaa caccgacccc acctacggca gcgcctcgg 1920  
 tattgcttgg gccctcaact gggagtactc cgctttcgtc cccactaacc cctggcgag 1980  
 ctcgatgtcc ctcgtccgca agttttcgtc taacaccgag taccaggcca accccgagac 2040  
 cgagcttatt aacctgaagg ccgagcctat tctcaacatc tccaacgctg gccctcgtc 2100  
 ccgctttgct actaacacta ccctcaccaa ggccaactcc tacaacgctg atctctcaa 2160  
 ctccaccggt actcttgagt ttgagctcgt ctacgccgtc aacaccacc agaccatctc 2220  
 caagtccgtc ttccgagacc tctccctcgt gttcaagggc cttgaggacc ccgaggagta 2280  
 cctgcgcatg ggttttgagg tctccgctc ctctctctc ctcgatcgg gtaactccaa 2340  
 ggtaagttt gtcaaggaga acccctactt tactaaccgt atgagcgtca acaaccagcc 2400  
 cttaagtcc gagaacgata ttagctacta caaggtttac ggctcctcgt accagaacat 2460  
 tctcgagctc tactttaacg acggagatgt cgtcagcacc aacacctact ttatgaccac 2520  
 tggaaacgcc ctccgagcg tgaacatgac caccggagtc gacaacctct tttacattga 2580  
 caagtttcag gttccgaggg ttaagtaaca tatgagttat gagatccgaa agtgaacctt 2640  
 gtctaacc ccagagcaat ggcgggaggg ggcgggctaa aagatcgtat tacatagtat 2700  
 ttttcccta ctctttgtgt ttgtctttt ttttttttg aacgcattca agccacttgt 2760  
 ctgggtttac ttgtttgtt gottgcttc ttgcttctt gcctgcttct tggtcagaag 2820  
 gcccaaaaaa gggaaaaaat tcattcatgg cacagataag aaaaagaaa agtttgcga 2880  
 ccaccgtcat cagaaagcaa gagaagagaa aactcgcgc tcacattctc gctcgcgtaa 2940  
 gaatcttagc cacgcatacg aagtaatttg tccatctggc gaatctttac atgagcgttt 3000  
 tcaagctgga gcgtgagatc atacctttct tgatcgtaat gttccaacct tgcataggcc 3060  
 tggttcgat ccactagcaa tgcgtcgtac tcccgttcca gctcgcctat ccctcattg 3120  
 tgacgtgagt tcagattctt ctccgacct tcgagcgtg ctaatttcgc ctgacgctcc 3180  
 ttcttttggt cttccatgac acgccgctc accgtcgtt ccacttctc ctccagacatg 3240  
 cccttgctg cctcgaactg ctccgtaaaa cgggccccag cacgtgctac gagatttcga 3300  
 ttccaccgcc gccttctatg aaagggtggg cttcggaatc gttttccggg acgccggctg 3360  
 gatgatcctc cagcgcgggg atctcatgct ggagttctc gccacccca acttgtttat 3420  
 tgcagcttat aatggttaca aataaagcaa tagcatcaca aatttcacaa ataaagcatt 3480  
 ttttccactg cattctagtt gtggtttgtc caaactcatc aatgtatctt atcatacatg 3540  
 gtcgacctgc aggaacctgc attaataaat cggccaacgc gggggagag gcggtttgcg 3600  
 tattggcgc tcttccgctt cctcgtcac tgactcgtg cgctcggctg ttccgctcgc 3660  
 gcgagcggta tcagctcact caaaggcggg aatacggta tccacagaat caggggataa 3720

ES 2 701 403 T3

cgcaggaaaag aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc 3780  
 gttgctggcg tttttccata ggctccgcc cctgacgag catcacaaaa atcgacgctc 3840  
 aagtcagagg tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac caggcgtttc ccctggaag 3900  
 ctccctcgtg cgctctcctg ttccgaccct gccgcttacc ggatacctgt ccgcctttct 3960  
 cccttcggga agcgtggcgc tttctcatag ctcacgctgt aggtatctca gttcgggtga 4020  
 ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc gttcagccc accgctgcgc 4080  
 cttatccggt aactatcgtc ttgagtcaa cccggaaga cagcacttat cgcactggc 4140  
 agcagccact ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta cagagttctt 4200  
 gaagtgtgg cctaactacg gctacactag aagaacagta tttggtatct gcgctctgct 4260  
 gaagccagtt accttcggaa aaagagtgg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc 4320  
 tggtagcggg ggttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca 4380  
 agaagatcct ttgatcttt ctacggggtc tgacgctcag tggaacgaaa actcacgta 4440  
 agggatttg gtcatgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa 4500  
 atgaagttt aaatcaatct aaagtatata tgagtaaact tggctgaca gttaccaatg 4560  
 cttaatcagt gaggcaccta tctcagcagat ctgtctatct cgttcaccca tagttgcctg 4620  
 actccccgtc gtgtagataa ctacgatacg ggagggctta ccatctggcc ccagtctgc 4680  
 aatgataccg cgagaccac gctcaccgpc tccagattta tcagcaataa accagccagc 4740  
 cgggaaggcc gagcgcagaa gtggctctgc aactttatcc gcctccatcc agtctattaa 4800  
 ttggtgocgg gaagctagag taagtagtcc gccagttaat agtttgcca acgttggtgc 4860  
 cattgctaca ggcatcgtgg tgtcacgctc gtcgtttgg atggcttcat tcagctccgg 4920  
 ttcccaacga tcaaggcgag ttacatgac ccccatgttg tgcaaaaaag cggtagctc 4980  
 cttcggctct ccgacggtg tcagaagtaa gttggccgca gtggtatcac tcatggttat 5040  
 ggcagcactg cataattctc ttactgtcat gccatccgta agatgctttt ctgtgactgg 5100  
 tgagtactca accaagtcac tctgagaata gtgtatgagg cgaccgagtt gctcttgccc 5160  
 ggcgtcaata cgggataata ccgcgccaca tagcagaact ttaaaagtgc tcatcattgg 5220  
 aaaacgttct tcggggcgaa aactctcaag gatcttaccg ctggtgagat ccagttcgat 5280  
 gtaaccact cgtgcaccca actgatcttc agcatctttt actttcacca gcgtttctgg 5340  
 gtgagcaaaa acaggaaggc aaaatgccgc aaaaaaggga ataaggcga cacggaatg 5400  
 ttgaatactc atactcttcc tttttcaata ttattgaagc atttatcagg gttattgtct 5460  
 catgagcggg tacatatttg aatgtattta gaaaaataaa caaatagggg ttccgcgcac 5520  
 atttccccga aaagtccac ctgacgtcta agaaaccatt attatcatga cattaaccta 5580  
 taaaaatagg cgtatcacga ggcctttcg tctcgcgctg ttcgggtgatg acggtgaaaa 5640

ES 2 701 403 T3

cctctgacac atgcagctcc cggagacggt cacagcttgt ctgtaagcgg atgccgggag 5700  
cagacaagcc cgtcagggcg cgtcagcggg tgttgccggg tgtcggggct ggcttaacta 5760  
tgccgcatca gagcagattg tactgagagt gcaccaagct tgaggctctgt cgataatoca 5820  
ctttccatt gatthccag gtttcgtaa ctcatgccac tgagcaaac ttcggtcttt 5880  
cctaacaaaa gctctcctca caaagcatgg cgcggcaacg gacgtgtcct catactccac 5940  
tgccacacaa ggtcgataaa ctaagctcct cacaaataga ggagaattcc actgacaact 6000  
gaaaaaatg tatgagagac gatcaccact ggagcggcgc ggcggttggg cgcggaggtc 6060  
ggcagcaaaa acaagcgact cgcggagcaa acccgaatca gccttcagac ggtcgtgcct 6120  
aacaacacgc cgttctacc cgccttcttc gcgccccttc gcgtccaagc atccttcaag 6180  
tttatctctc tagttcaact tcaagaagaa caacaccacc aacaccatga ttgaacaaga 6240  
tgattgcac gcaggttctc cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc 6300  
acaacagaca atcggctgct ctgatgccgc cgtgttcggg ctgtcagcgc aggggcgccc 6360  
ggttcttttt gtcaagaccg acctgtccgg tgcctgaat gaactgcagg acgagcagc 6420  
cggctatcgc tggctggcca cgcggggcgt tccttgccca gctgtgctcg acgttgcac 6480  
tgaagcggga agggactggc tgctattggg cgaagtgccg gggcaggatc tcctgtcatc 6540  
tcacctgct cctgccgaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac 6600  
gcttgatccg gctacctgcc cattcgacca ccaagcgaaa catcgcacgc agcagcacgc 6660  
tactcggatg gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct 6720  
cgcgccagcc gaactgttcg ccaggctcaa ggcgcgcacg cccgacggcg atgatctcgt 6780  
cgtgaccat gccgatgcct gcttgccgaa tatcatggtg gaaaatggc gcttttctgg 6840  
attcatcgac tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggttac 6900  
ccgtgatatt gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac cgcttcctcg tgctttacgg 6960  
tatcgcgct cccgattcgc agcgcacgc cttctatcgc cttcttgacg agttctctg 7020  
acacgtgcta cgagatttcg attccaccgc cgccttctat gaaaggttgg gcttcggaat 7080  
cgttttcgg gagcgcggct ggatgatcct ccagcgcggg gatctcatgc tggagttctt 7140  
cgcccacccc aacttgttta ttgcagctta taatggttac aaataaagca atagcatcac 7200  
aatthcaca aataaagcat tttttcact gcattctagt tgtggtttgt ccaaactcat 7260  
caatgtatct tatcatgtct gaattcccgg ggtac 7295

**REIVINDICACIONES**

1. Un método de producción de un cultivo de células de traustóquitridos, que comprende:
- 5 (a) transformar una célula de traustóquitridos con una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica una invertasa heteróloga, en la que la invertasa está unida a la membrana plasmática de la célula de traustóquitridos, y  
(b) cultivar la célula de traustóquitridos transformada en un medio de cultivo que comprende sacarosa como fuente de carbono.
- 10 2. Una célula de traustóquitridos que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica una invertasa heteróloga, en la que la invertasa está unida a la membrana plasmática de la célula de traustóquitridos.
- 15 3. La célula de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la invertasa está unida de forma funcional a un péptido señal.
4. La célula de cualquiera de las reivindicaciones 2-3, en la que la secuencia polinucleotídica que codifica la invertasa heteróloga es al menos el 90 % idéntica a la secuencia polinucleotídica de la SEQ ID NO. 1.
- 20 5. La célula de cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en la que la célula comprende adicionalmente una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia polinucleotídica que codifica un transportador de sacarosa heterólogo.
- 25 6. La célula de la reivindicación 5, en la que la secuencia polinucleotídica que codifica el transportador de sacarosa heterólogo es al menos el 90 % idéntica a la secuencia polinucleotídica de N.º de acceso L47346.
7. La célula de cualquiera de las reivindicaciones 2-6, en la que el traustóquitrido es un *Schizochytrium* o un *Thraustochytrium*.
- 30 8. Un cultivo de traustóquitridos que comprende:
- (a) la célula de traustóquitridos de cualquiera de las reivindicaciones 2-7, y  
(b) un medio de cultivo celular que comprende sacarosa como fuente de carbono.
- 35 9. Un método de producción de una biomasa de traustóquitridos, que comprende:
- (a) cultivar la célula de traustóquitridos de cualquiera de las reivindicaciones 2-7 en un medio de cultivo que comprende sacarosa como fuente de carbono, y  
(b) recoger la biomasa a partir del medio de cultivo.
- 40 10. Un método de producción de un aceite microbiano, que comprende:
- (a) cultivar la célula de traustóquitridos de cualquiera de las reivindicaciones 2-7 en un medio de cultivo que comprende sacarosa como fuente de carbono para producir una biomasa, y  
(b) extraer un aceite a partir de la biomasa.
- 45 11. Un método de producción de un producto alimenticio, cosmético, composición industrial o composición farmacéutica para un animal o ser humano, que comprende:
- 50 (a) cultivar la célula de traustóquitridos de cualquiera de las reivindicaciones 2-7 en un medio de cultivo que comprende sacarosa como fuente de carbono,  
(b) recoger una biomasa a partir del medio de cultivo,  
(c) preparar el producto alimenticio, cosmético, composición industrial o composición farmacéutica a partir de la biomasa.
- 55 12. El método de la reivindicación 11, que comprende adicionalmente extraer un aceite de la biomasa y preparar el producto alimenticio, cosmético, composición industrial o composición farmacéutica a partir del aceite.
- 60 13. El método de la reivindicación 11 o reivindicación 12, en el que el producto alimenticio se selecciona de (a) una fórmula infantil, (b) leche, (c) una bebida, (d) una bebida terapéutica, (e) una bebida nutritiva, (f) un aditivo para alimento de animales o seres humanos, (g) un suplemento nutritivo, (h) un pienso para animales y (i) una combinación de (b), (c), (d) y/o (e).
- 65

Tabla de uso de codones de *Schizochytrium*

AmAcid	Codón	Fracción									
Ala	GCC	0,64	End	TAA	0,34	Leu	CTT	0,16	Ser	TCG	0,33
Ala	GCA	0,03	End	TGA	0,33	Leu	TTG	0,02	Ser	TCC	0,31
Ala	GCT	0,18	End	TAG	0,33	Leu	CTG	0,12	Ser	AGT	0,03
Ala	GCG	0,16	Gln	CAA	0,08	Leu	CTC	0,69	Ser	TCA	0
Arg	CGG	0,01	Gln	CAG	0,92	Leu	TTA	0	Ser	TCT	0,09
Arg	AGA	0	Glu	GAA	0,09	Leu	CTA	0	Thr	ACG	0,3
Arg	CGC	0,8	Glu	GAG	0,91	Lys	AAA	0,04	Thr	ACC	0,54
Arg	CGA	0,01	Gly	GGA	0,1	Lys	AAG	0,96	Thr	ACA	0,02
Arg	AGG	0	Gly	GGT	0,2	Met	ATG	1	Thr	ACT	0,14
Arg	CGT	0,17	Gly	GGG	0	Phe	TTT	0,45	Trp	TGG	1
Asn	AAC	0,94	Gly	GGC	0,7	Phe	TTC	0,55	Tyr	TAC	0,94
Asn	AAT	0,06	His	CAC	0,83	Pro	CCT	0,21	Tyr	TAT	0,06
Asp	GAT	0,24	His	CAT	0,17	Pro	CCG	0,34	Val	GTC	0,62
Asp	GAC	0,76	Ile	ATC	0,7	Pro	CCC	0,43	Val	GTA	0
Cys	TGC	0,95	Ile	ATA	0	Pro	CCA	0,02	Val	GTT	0,14
Cys	TGT	0,05	Ile	ATT	0,3	Ser	AGC	0,24	Val	GTG	0,24

FIG. 1

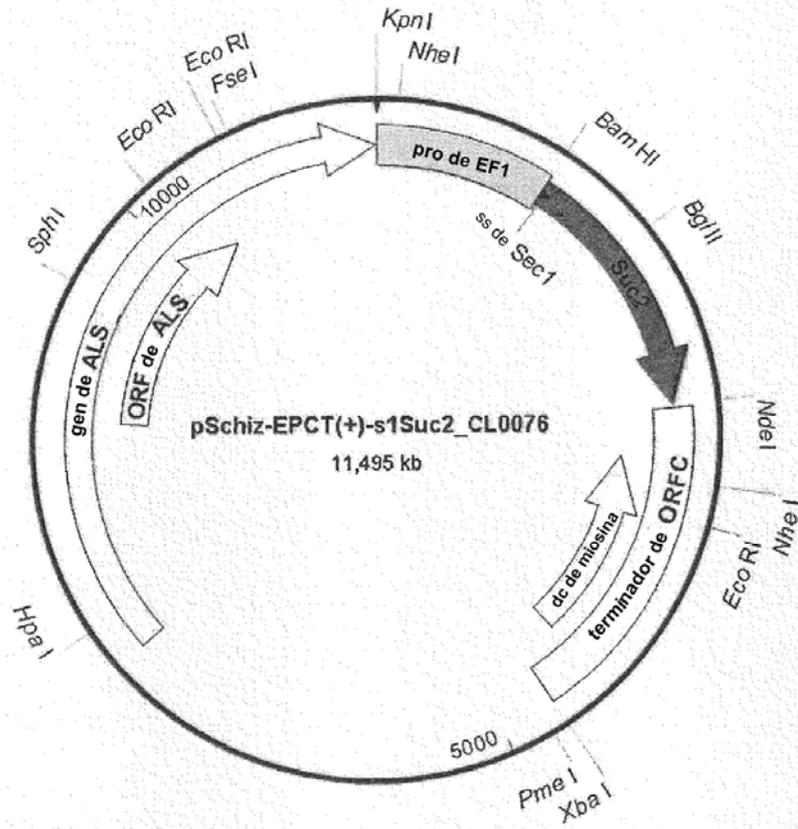


FIG. 2

### PS en SSFM + sacarosa

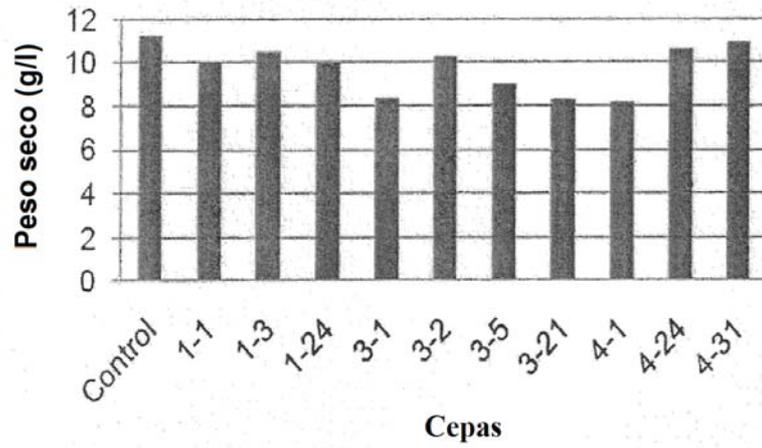


FIG. 3

### % de grasa en SSFM

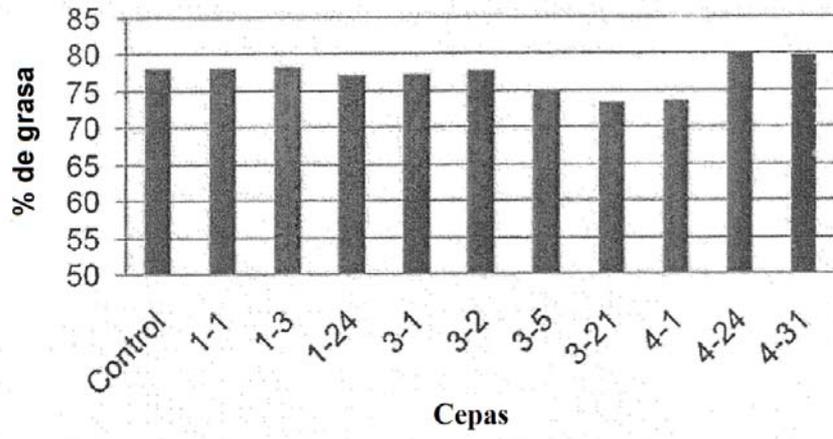


FIG. 4

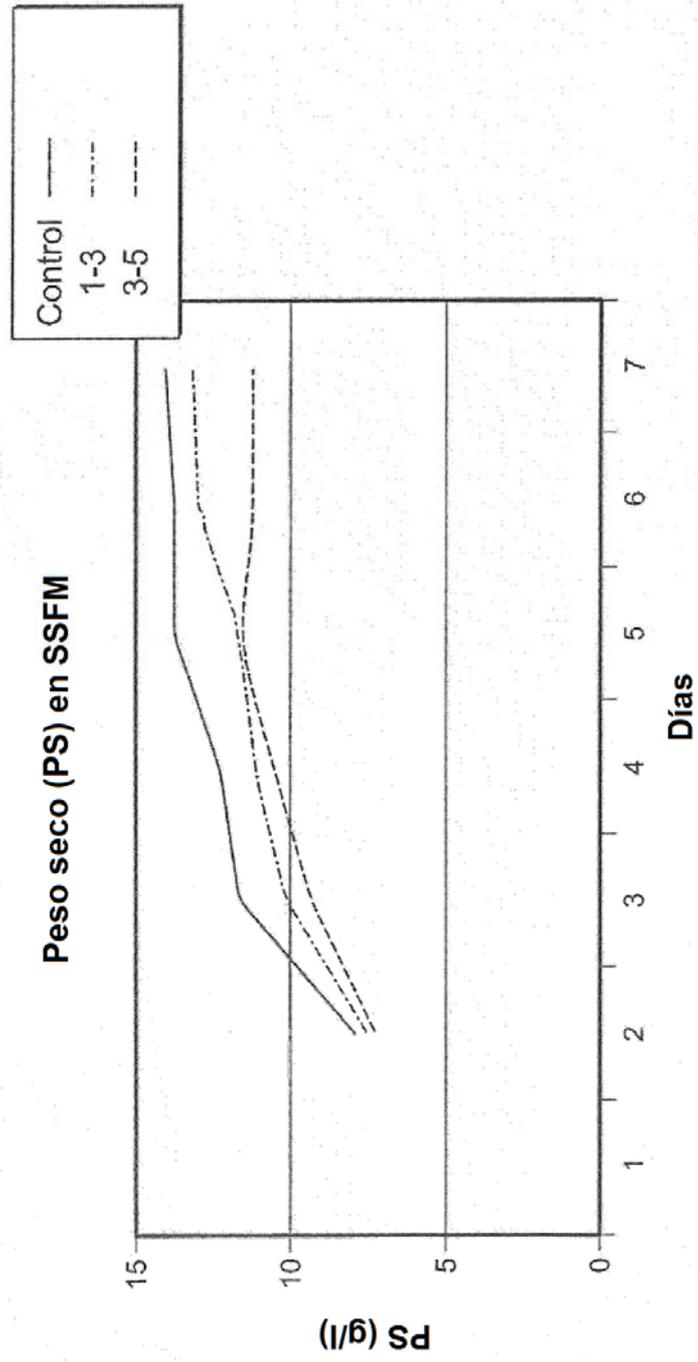


FIG. 5

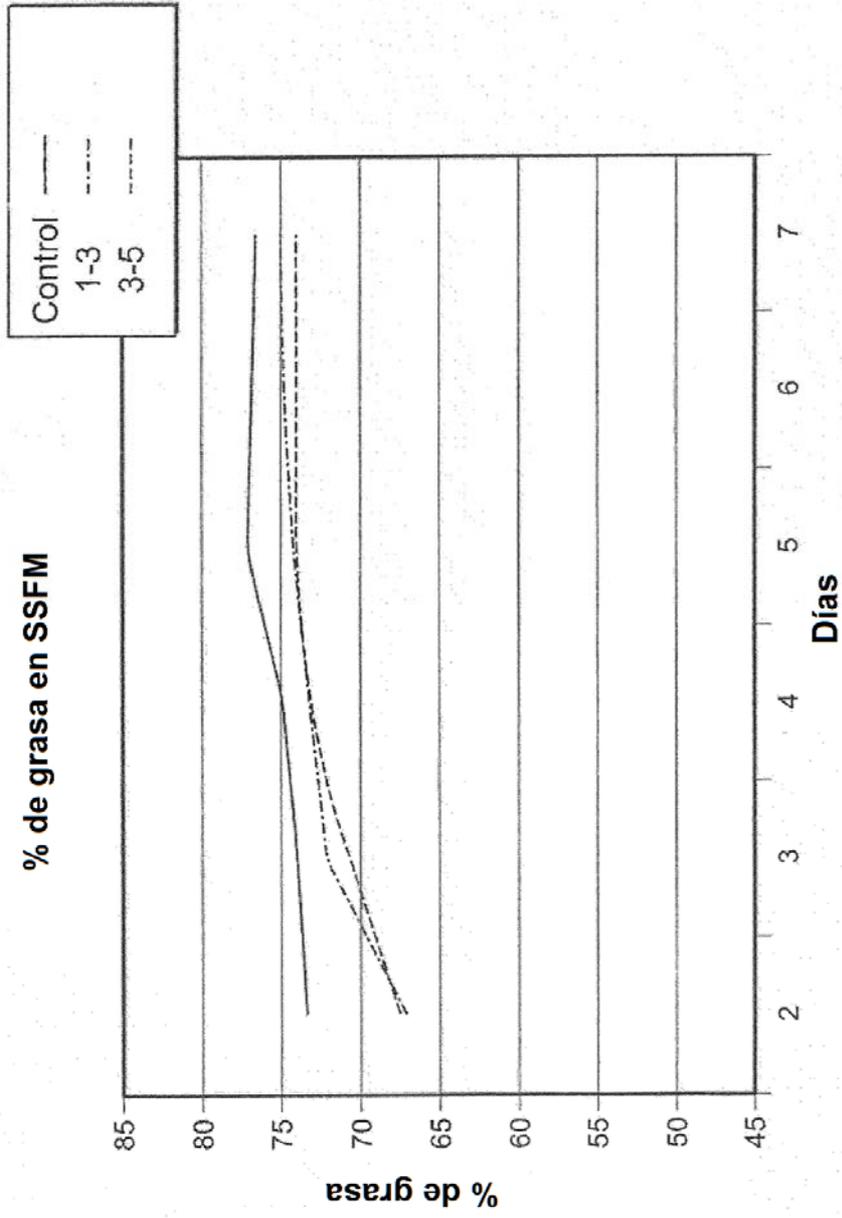


FIG. 6

Transformantes de invertasa de B76-32; cultivo en sacarosa

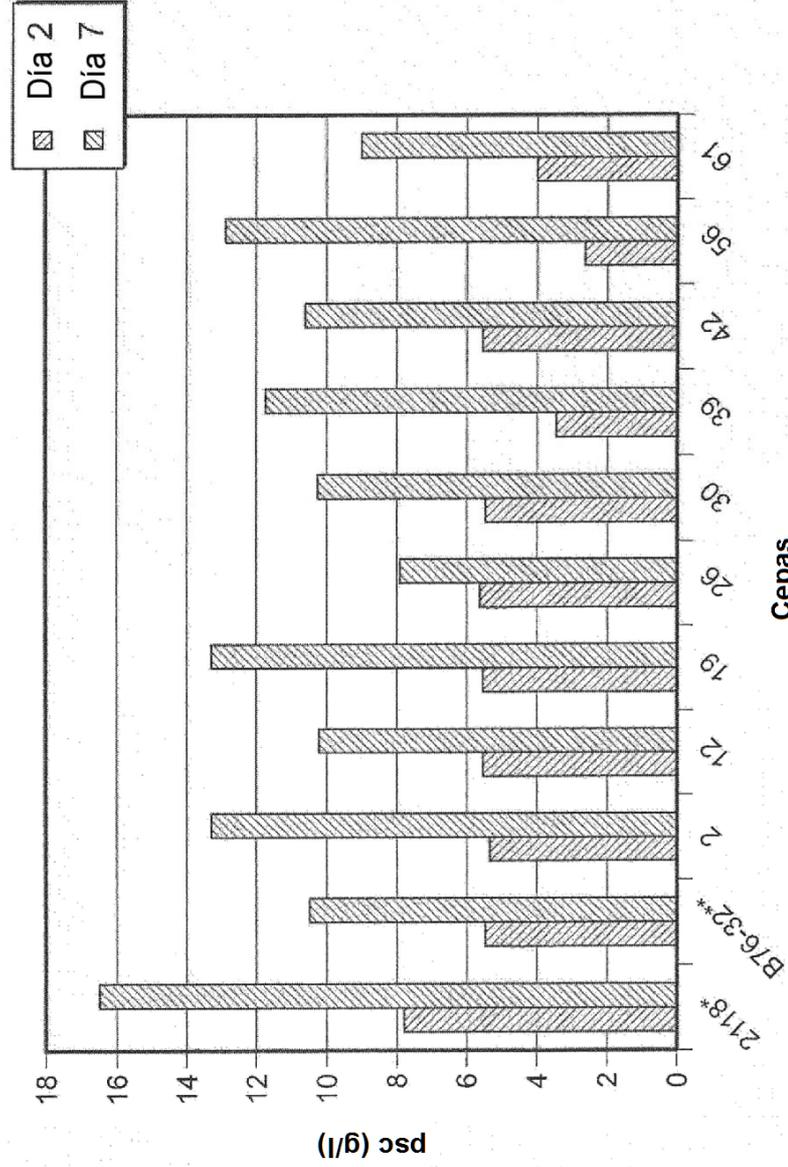


FIG. 7

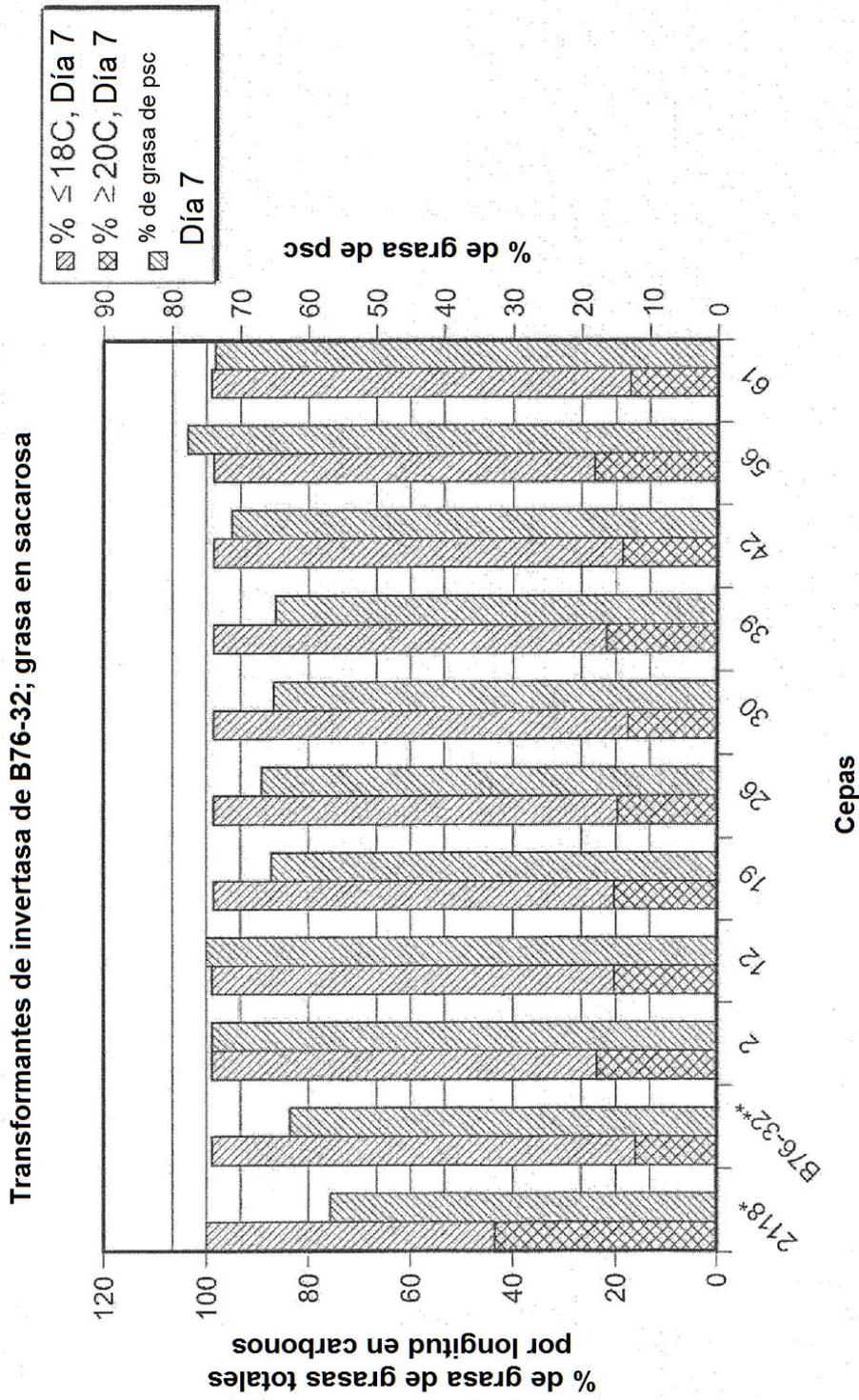


FIG. 8

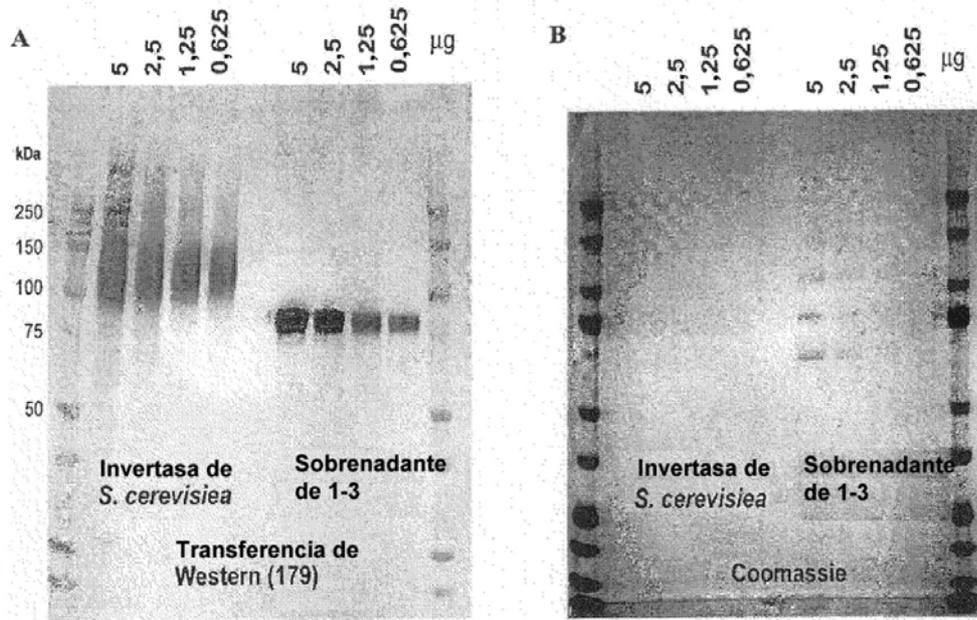
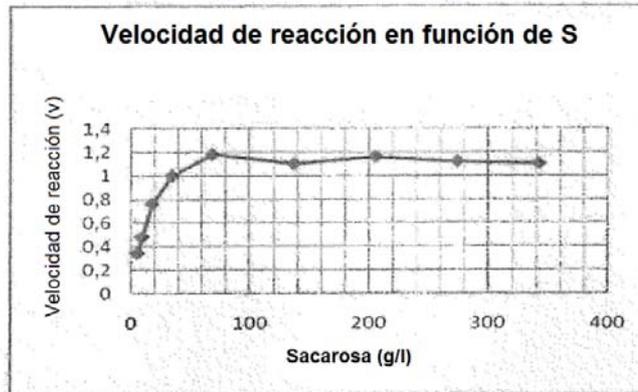
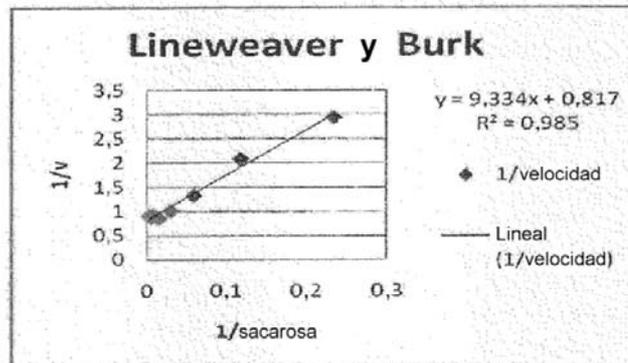


FIG. 9

A



B



V<sub>máx</sub> es glucosa 6,8 mM/min  
 K<sub>m</sub> es 33,4 mM

FIG. 10

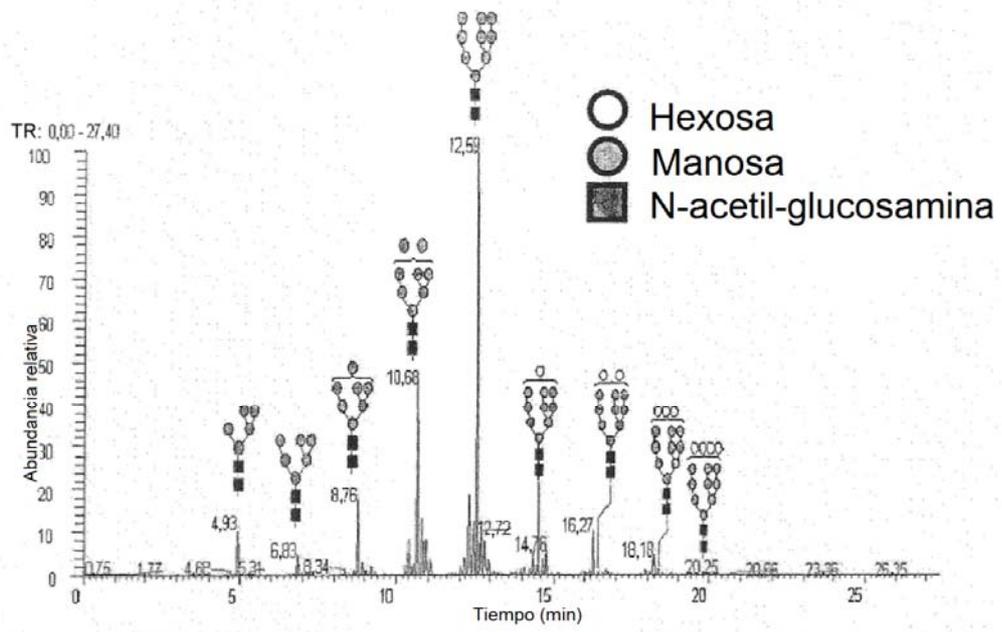


FIG. 11

Estructura propuesta	Masa [M+Na]	Estado de carga [z]	76-3-I1
Hex <sub>5</sub> HexNAc <sub>2</sub>	1579	1	√
	802	2	
Hex <sub>6</sub> HexNAc <sub>2</sub>	1783	1	√
	903	2	
Hex <sub>7</sub> HexNAc <sub>2</sub>	1987	1	√
	1005	2	
Hex <sub>8</sub> HexNAc <sub>2</sub>	1108	2	√
Hex <sub>9</sub> HexNAc <sub>2</sub>	1210	2	√
Hex <sub>10</sub> HexNAc <sub>2</sub>	1312	2	√
Hex <sub>11</sub> HexNAc <sub>2</sub>	1407	2	√
Hex <sub>12</sub> HexNAc <sub>2</sub>	1516	2	√
Hex <sub>13</sub> HexNAc <sub>2</sub>	1618	2	√

√.....Detectado  
n.d.....No detectado

FIG. 12

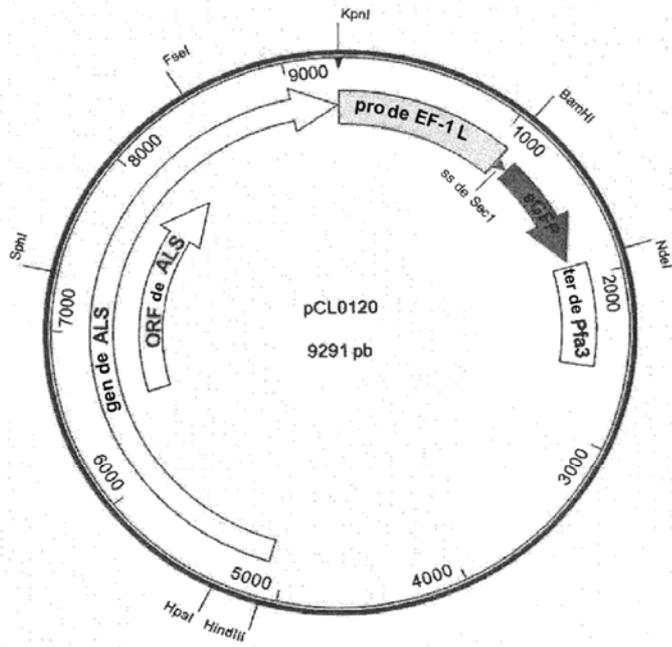


FIG. 13

atgaagttcgcgacctcggcgaatttgcctgtggccaacatagccaccgcccctcgcgGCCTCCCCTCGATGCAGACCCGTGCCTCC  
GTCGTCATTGATTACAACGTCGCTCCTAACCTCTCCACCCTCCCGAACGGCAGCCTCTTTGAGACCTGGCGTCC  
TCGCGCCACGTTCTTCCCCTAACGGTCAGATTGGCGATCCCTGCCTCCACTACACCGATCCCTCGACTGGCCTCT  
TTCACGTGGCTTTCTCCACGATGGCTCCGGCATTTCCTCCGCCACTACTGACGACCTCGTACCTACAAGGATCTC  
AACAGGGCAACCAGGTATCGTCCCGGGCGGTATCAACGACCCTGTCGCTGTTTTGACGGCTCCGTCATTCTT  
CCGGCATTAAACGGCCTCCCTACCCTCCTCTACACCTCCGTCAGCTACCTCCCCATTCACTGGTCCATCCCCTACACCC  
GCGGTTCCGAGACGCAGAGCCTGGCTGTCTCCAGCGATGGTGGCTCCAACCTTACTAAGCTCGACACGGGCCCCG  
TTATTCTGGCCCCCTTTGCCTACAACGTCACCGCTTCCGCGACCCCTACGTCTTTCAGAACCCACCCCTCGACT  
CCCTCCTCACTCCAAGAACAACACCTGGTACACCGTCATTTCCGGTGGCCTCCACGGCAAGGGCCCCGCCAGTT  
TCTTTACCAGTACGACCCCGACTTTCAGTACTGGGAGTTCTCGGCCAGTGGTGGCAGGACCTACCAACTCC  
ACCTGGGGCAACGGCACCTGGGGCCGGCGCTGGGCCTTCAACTCGAGACCGCAACGCTTTTTGCTTGACGAG  
TACGGCTACAACCCCGACGGCCAGATCTTCTCCACCATTTGGCACCGAGGGCTCCGACCAGCCGTTGCCCCAGC  
TCACCTCCATCCACGATATGCTTTGGGTCTCCGGTAACGTTTCGCGCAACGATCGGTTTCTTCACTCCCAACATG  
GCCGGCTTCTCGACTGGGGTTTCTCGTCTACGCGCGCGGGTAAGGTTCTTCTTCCACGTCGCTCCCTCCAC  
CAAGTCCGGTCCCCGATCGCTTCAATTCGTACGTTTGGCTCTCCGGCGACCTCTTTGAGCAGGCTGAGGGCTTTC  
CTACCAACCAGCAGAACTGGACCGGCACCTCCTCCTCCCGTGAGCTCCGCGTCTTTACATCCCCAACGTGGTT  
GATAACGCCCTTGGCGCGAGTCCGGCGCTTCTGGCAGGTCGTCTCCTCCGATAGCTCGGCCGGTACTGTGGAG  
CTCCAGACCTCGGCATTTCATCGCCCGCGAGACCAAGGCCGCCCTCCTGTCCGGCACCTCGTTCAGTGGTCCG  
ACCGCACTTTAACTCCTCCGGCGTCTTCCCTTAAAGCGTTCCCTCCGAGAAAGTTTTTCGCTCTCCGCCAGC  
TCTCCTTCCCCGCTCCGCCCGGGCTCGGGCCTCAAGTCCGGCTTCCAGATTTCTTCTCCGAGCTCGAGTCCACC  
ACGGTCTACTACCAGTTTAGCAACGAGTCCATCATCGTCGACCGCAGCAACACCAGCGCCCGCCGCTACTACCG  
ACGGTATCGACTCCTCCGCCGAGGCCGGAAGCTCCGCTCTTTGACGTCCTCAACGGCGGGCAGCAGGCTATTG  
AGACCTCGACCTTACCCTCGTCTGATAACTCCGTGCTCGAGATTTACGCCAACGGTCTGTTTCGCGCTTCCACC  
TGGGTTTCGCTAA

(SEQ ID NO: 4)

FIG. 14

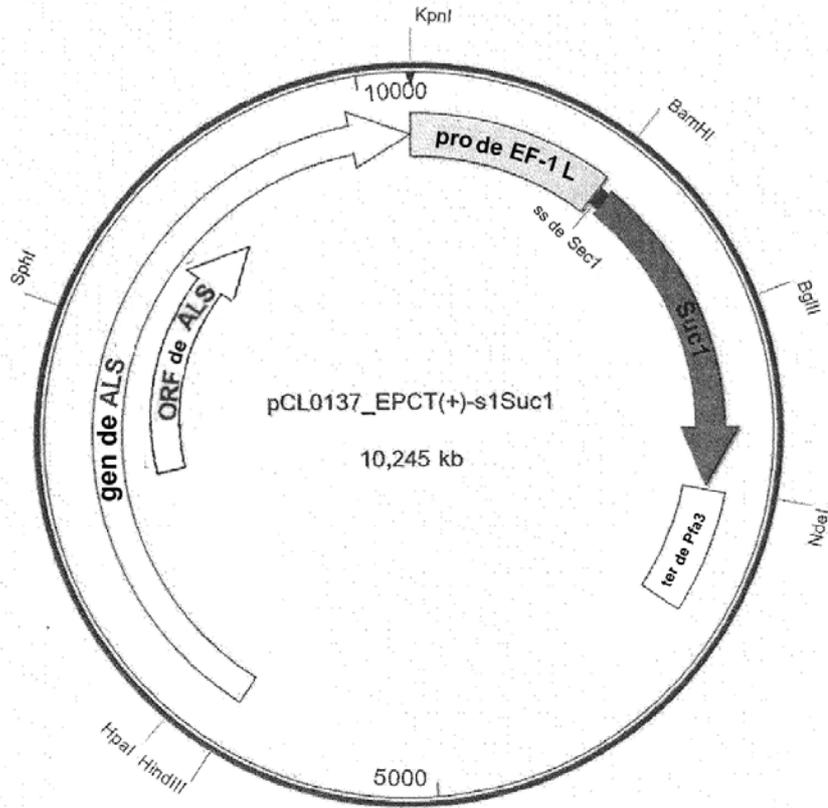


FIG. 15