

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 713 526**

51 Int. Cl.:

**C12P 7/64** (2006.01)

**C12N 1/21** (2006.01)

**C12N 15/55** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.07.2010 PCT/KR2010/004701**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.01.2011 WO11008058**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.07.2010 E 10800069 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2018 EP 2455484**

54 Título: **Procedimiento de producción de ésteres alquílicos de ácidos grasos usando microorganismos que tienen capacidad de producir aceite**

30 Prioridad:

**17.07.2009 KR 20090065490**

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

**22.05.2019**

73 Titular/es:

**KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE  
AND TECHNOLOGY (100.0%)  
373-1 Guseong-dong Yuseong-gu  
Daejeon-si 305-701 , KR**

72 Inventor/es:

**LEE, SANG YUP y  
CHOI, YONG JUN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 713 526 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

Procedimiento de producción de ésteres alquílicos de ácidos grasos usando microorganismos que tienen capacidad de producir aceite

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de producción de un éster alquílico de ácido graso usando *Rhodococcus opacus* que tiene la capacidad de producir aceite, y más particularmente a un procedimiento de producción de un éster alquílico de ácido graso, comprendiendo el cultivo de *Rhodococcus opacus* que tiene la capacidad para producir aceite, acumulando así una gran cantidad de aceite en los microorganismos, induciendo la autólisis del aceite producido en *Rhodococcus opacus* para producir un ácido graso libre, y  
10 convirtiendo el ácido graso libre en un éster alquílico.

**Antecedentes de la invención**

Recientemente, debido a los altos precios del petróleo y las preocupaciones medioambientales, la producción microbiana de biocombustibles ha recibido una gran atención. Además, el biodiesel ha sido sustituido por un aceite liviano, o una mezcla de biodiesel con aceite liviano ha surgido como un combustible alternativo que se puede usar  
15 en motores diésel, y por lo tanto el tamaño de mercado del biodiesel ha aumentado rápidamente. En la Unión Europea (UE) en 2008, se produjeron 6,6 millones de toneladas de biodiesel, lo que representa un tamaño de mercado de 5,5 mil millones de euros (Biodiesel Market, Frost & Sullivan). Además, en Estados Unidos. En 2006, se produjeron 3 mil millones de galones de biodiesel (Biodiesel Market, Global Industry Analysts Inc, 2006. 5).

El biodiesel es ventajoso porque tiene una alta tasa de combustión y, por lo tanto, una baja emisión de gases venenosos, un valor de calentamiento aproximadamente 10 % más bajo que el del petróleo ligero y un punto de ignición más alto que el del petróleo ligero, lo que indica que es más estable durante almacenamiento y transporte. El biodiesel se ha producido principalmente al procesar los componentes grasos de los animales y las plantas para que tengan propiedades similares a las de los aceites ligeros o para permitir que los aceites y grasas vegetales (salvado de arroz, aceite de cocina de desecho, aceite de soja, aceite de colza, etc.) reaccionen con alcohol. Sin  
20 embargo, en este caso, hay un inconveniente en que es difícil producir biodiesel en grandes cantidades. Por lo tanto, si el biodiesel adecuado como combustible alternativo para el aceite liviano se produce en grandes cantidades usando microorganismos, la importación de petróleo crudo disminuirá y la emisión de gases de efecto invernadero disminuirá, lo que provocará efectos ambientales.

Mientras tanto, el aceite es un portador de energía que se sintetiza y se acumula en las células microbianas cuando los microorganismos son ricos en fuentes de carbono, pero carecen de otros factores de crecimiento (nitrógeno, fósforo, oxígeno, azufre, etc.). Cuando el entorno de crecimiento microbiano cambia de modo que los otros factores de crecimiento se suministran a los microorganismos, el aceite acumulado se degradará y se usará como fuente de energía.

Se sabe que el aceite puede consistir en más de 100 tipos de monómeros, dependiendo del tipo de microorganismo productor de aceite, el tipo de material químico suministrado, los cambios en las condiciones de cultivo, etc.

Recientemente, se desarrolló la tecnología de producción de éster alquílico de ácido graso mediante la adición de alcohol a ácido graso vegetal tal como caña de azúcar, y el éster alquílico de ácido graso producido se está usando actualmente como combustible biodiesel. Además, los procedimientos para esterificar ácidos grasos libres se describen en la Publicación de Patente Europea No. 127104A, en la Publicación de Patente Europea No. 184740A y en la Patente Estadounidense No. 4,164,506. De acuerdo con las descripciones de estas patentes, se lleva a cabo una reacción de esterificación calentando una mezcla de ácidos grasos y triglicéridos de ácidos graso junto con metanol. Además, la Publicación de Patente Europea No. 708813A describe un procedimiento de producción de éster alquílico de ácidos grasos a partir de aceites y grasas en un mayor rendimiento, en el cual el ácido graso libre se separa de una glicerina resultante del intercambio de éster y luego se esterifica.

45 El documento WO 2008/151149 describe un procedimiento de producción de diésel renovable que comprende:

(a) cultivar una población de microorganismos en presencia de una fuente de carbono fija, en donde:

(i) los microorganismos acumulan al menos el 10 % de su peso celular seco como lípidos; y

(ii) la fuente de carbono fija se selecciona del grupo que consiste en glicerol, material celulósico despolimerizado, sacarosa, melaza, glucosa, arabinosa, galactosa, xilosa, fructosa, arabinosa, manosa, acetato y cualquier combinación de los anteriores;

50

(b) aislar componentes lipídicos de los microorganismos cultivados; y

(c) someter los componentes lipídicos aislados a una o más reacciones químicas para generar alcanos de cadena lineal, mediante lo cual se produce diésel renovable.

El documento WO 2009/035551 describe un procedimiento de producción de un aceite biológico que comprende cultivar un microorganismo del reino Stramenopile mediante fermentación heterotrófica usando materia prima que contiene celulosa como fuente de carbono, en donde aproximadamente del 11 % a aproximadamente el 99 % de los ácidos grasos insaturados en dicho aceite biológico son ácidos grasos poliinsaturados.

5 Sin embargo, en este procedimiento, es difícil obtener grandes cantidades de ácidos grasos o ácidos grasos libres. Además, es difícil aumentar la acumulación y la producción de ácidos grasos vegetales que se usan actualmente con mayor frecuencia, debido a que el período de crecimiento de las plantas es largo y un enfoque de ingeniería metabólica para producir los ácidos grasos vegetales es algo difícil.

10 Por consiguiente, los presentes inventores han realizado grandes esfuerzos para desarrollar un nuevo procedimiento capaz de producir un éster alquílico de ácido graso, que se puede usar como biodiesel, con alta eficiencia y productividad usando una metodología de ingeniería metabólica, y como resultado, han encontrado que el éster alquílico de ácido graso se puede producir con alta eficiencia al maximizar la producción de aceite en microorganismos productores de aceite usando un procedimiento de ingeniería metabólica, y luego inducir la autólisis del aceite en los microorganismos para producir un ácido graso libre que luego es convertido en un éster de alquilo, completando así la presente invención.

### Divulgación de la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar un nuevo procedimiento capaz de producir grandes cantidades de un éster alquílico de ácidos grasos, que se puede usar como biodiesel, con alta eficiencia y productividad usando una metodología de ingeniería metabólica.

20 Para lograr el objeto anterior, la presente invención proporciona un procedimiento de producción de un éster alquílico de ácido graso usando *Rhodococcus opacus*, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

(a) cultivar *Rhodococcus opacus* que tiene la capacidad de producir aceite y transformarse con un primer gen que codifica una triacilglicerol lipasa y un segundo gen que codifica una monoacil glicerol lipasa, produciendo así aceite;

25 (b) inducir la autólisis del aceite producido en *Rhodococcus opacus* para producir un ácido graso libre, en donde la autólisis es llevada a cabo en *Rhodococcus opacus* mediante triacil glicerol lipasa y monoacil glicerol lipasa; y

(c) agregar un alcohol al ácido graso libre producido y hacer reaccionar el alcohol con el ácido graso libre para producir un éster alquílico de ácido graso,

30 en donde el primer gen comprende la SEQ ID NO: 19, y el segundo gen comprende el gen de la lipasa MAG de *M. smegmatis* producido por amplificación por PCR de ADN genómico de *M. smegmatis* con los cebadores de la SEQ ID NO: 13 y la SEQ ID NO: 14 de acuerdo con el Ejemplo 2.

Otras características y realizaciones de la presente invención serán más evidentes a partir de las siguientes descripciones detalladas y las reivindicaciones adjuntas.

### 35 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra un proceso de producción de un éster metílico de ácido graso con alta eficiencia a partir del aceite típico de triacilglicerol (TAG) usando *Rhodococcus opacus* PD630.

La figura 2 muestra mapas genéticos de los vectores recombinantes rpROUC18 (a) y rpROUC18\_KM (b).

40 La figura 3 muestra un mapa genético del vector recombinante pRUCSdpMag que contiene los genes sdp1 y MSMEG\_0220.

La figura 4 muestra los tipos y la información de plásmidos hechos en base a la información que se muestra en la Tabla 1.

La figura 5 muestra los resultados del análisis por cromatografía de gases de ácidos grasos libres.

45 Las figuras 6 y 7 muestran los resultados del análisis por cromatografía de gases del éster metílico de ácidos grasos.

### Mejor modo para llevar a cabo la invención

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece la invención. En general, la nomenclatura usada en el presente documento y los procedimientos experimentales son aquellos bien conocidos y comúnmente empleados en la técnica.

La definición de los términos principales usados en la descripción detallada de la invención es la siguiente.

Como se usa en este documento, el término "aceite" se refiere a un portador de energía que se sintetiza y se acumula en las células de los microorganismos cuando los microorganismos son ricos en fuentes de carbono, pero carecen de otros factores de crecimiento (nitrógeno, fósforo, oxígeno, azufre, etc.). Es un precursor de ácidos grasos libres que se hidroliza en ácidos grasos libres y glicerol.

Como se usa en el presente documento, el término "ácidos grasos" se refiere a un tipo de cadena de ácidos monocarboxílicos saturados o insaturados. Estos ácidos grasos se clasifican de acuerdo con la longitud de la cadena de carbono y la saturación, y los ácidos grasos resultantes de la hidrólisis del aceite (es decir, la grasa) se denominan "ácidos grasos libres".

En un aspecto, la presente invención está dirigida a un procedimiento de producción de un éster alquílico de ácido graso usando *Rhodococcus opacus*, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

(a) cultivar *Rhodococcus opacus* que tiene la capacidad de producir aceite y transformarse con un primer gen que codifica una triacilglicerol lipasa y un segundo gen que codifica una monoacil glicerol lipasa, produciendo así aceite;

(b) inducir la autólisis del aceite producido en *Rhodococcus opacus* para producir un ácido graso libre, en donde la es llevada a cabo en *Rhodococcus opacus* mediante triacil glicerol lipasa y monoacil glicerol lipasa; y

(c) agregar un alcohol al ácido graso libre producido y hacer reaccionar el alcohol con el ácido graso libre para producir un éster alquílico de ácido graso,

en donde el primer gen comprende la SEQ ID NO: 19, y el segundo gen comprende el gen de la lipasa MAG de *M. smegmatis* producido por amplificación por PCR de ADN genómico de *M. smegmatis* con los cebadores de la SEQ ID NO: 13 y la SEQ ID NO: 14 de acuerdo con el Ejemplo 2.

En la presente invención, el aceite puede ser cualquier aceite producido en microorganismos, y sus ejemplos incluyen, pero no se limitan a, triacilglicerol (TAG), diacilglicerol (DAG), monoacilglicerol (MAG), fosfolípido, lípido de esterol, esfingolípido, sacarolípido, lípidos de prenol y policétido.

En este documento, el ácido graso libre que se produce por la descomposición del aceite puede ser un ácido graso saturado o insaturado, en el que el ácido graso insaturado se refiere a un ácido graso que tiene uno o más enlaces dobles en la cadena de carbono, y sus ejemplos incluyen ácido oleico, ácido linoleico, ácido linoléico, ácido palmítico, ácido ricinoleico, ácido vaccénico, ácido gadoleico, ácido araquidónico, EPA (ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico), ácido erúcido, DHA (ácido 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico), etc. Además, el ácido graso saturado se refiere a un ácido graso que no tiene doble enlace en la cadena de carbono, y sus ejemplos incluyen ácido butírico, ácido caproico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido araquídico, ácido behénico, ácido lignocérico, etc. El ácido graso que se usa en la presente invención puede sustituirse con un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en, pero no limitado a, un grupo de anillos aromáticos, un grupo epoxi, un grupo ciano y un grupo halógeno.

En la presente invención, el aceite que es un precursor de ácido graso libre es producido por *Rhodococcus opacus* que tiene la capacidad de producir aceite.

*Aplanochytrium* sp., *Aspergillus* sp., *Amoebobacter* sp., *Aphanocapsa* sp., *Aphanothece* sp., *Aquaspirillum autotrophicum*, *Azorhizobium caulinodans*, *Azospirillum* sp., *Azospirillum* sp., *Azotobacter* sp., *Bacillus* sp., *Beggiatoa* sp., *Beijerinckia* sp., *Beneckea* sp., *Blakeslea* sp., *Bordetella pertussis*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Caryophanon latum*, *Caulobacter* sp., *Chlorogloea* sp., *Chromatium* sp., *Chromobacterium* sp., *Clostridium* sp., *Comamonas* sp., *Corynebacterium* sp., *Cryptocodium* sp., *Cyanobacteria* sp., *Dexia* sp., *Desulfonema* sp., *Desulfosarcina variabilis*, *Desulfovibrio sapovorans*, *Ectothiorhodospira* sp., *Elina* sp., *Entomophthora* sp., *Ferrobacillus ferroxidans*, *Flavobacterium* sp., *Haemophilus influenzae*, *Halobacterium* sp., *Haloferax mediterranei*, *Hydroclathratus clathratus*, *Hydrogenomonas facilis*, *Hydrogenophaga* sp., *Hyphomicrobium* sp., *Ilyobacter delafieldii*, *Japonoichytrium* sp., *Labrys monachus*, *Lamprocystis roseopersicina*, *Lampropedia hyalina*, *Legionella* sp., *Leptothrix discophorus*, *Methylobacterium* sp., *Methylosinus* sp., *Micrococcus* sp., *Mortierella* sp., *Mycobacterium* sp., *Nitrobacter* sp., *Nocardia* sp., *Paracoccus dentrificans*, *Oscillatoria limosa*, *Penicillium cyclopium*, *Photobacterium* sp., *Physarum ploycephalum*, *Phycomyces* sp., *Pseudomonas* sp., *Pythium* sp., *Ralstonia* sp., *Rhizobium* sp., *Rhodobacillus* sp., *Rhodobacter* sp., *Rhodococcus* sp., *Rhodocyclus* sp., *Rhodomicrobium vanniellii*, *Rhodopseudomonas*.

En la presente invención, el cultivo en la etapa (a) puede comprender un cultivo de primer paso para el crecimiento de células microbianas y un cultivo de segundo paso para la producción de aceite, en el cual el cultivo para la producción de aceite se lleva a cabo preferiblemente en un medio que contiene una fuente de nitrógeno limitada con el fin de aumentar la producción de petróleo.

El aceite producido por *Rhodococcus opacus* se somete a autólisis en el microorganismo, y la autólisis en la etapa (b) se puede llevar a cabo mediante la triacilglicerol lipasa (EC: 3,1,1.34, 3,1,1,13) y la monoacilglicerol lipasa (EC: 3,1,1,23).

5 Preferiblemente, un gen que codifica lipasa puede introducirse o amplificarse en los microorganismos que tienen la capacidad de producir aceite. Más preferiblemente, un gen de lipasa que puede activarse por reacción con un sustrato puede introducirse en los microorganismos. En un ejemplo de la presente invención, para la autólisis de aceite en microorganismos, se usó una cepa microbiana introducida con genes de lipasa de SEQ ID NO: 5 y 8. En otro ejemplo de la presente invención, se usó una cepa microbiana introducida con los genes de la triacilglicerol lipasa de SEQ ID NOS: 17, 18 y 19 solos o un gen de la monoacilglicerol lipasa de SEQ ID NO: 20 solo o una combinación de los mismos.

En la presente invención, el alcohol que se añade en la etapa (c) puede ser un alcohol primario, un alcohol secundario o un alcohol terciario. Preferiblemente, se puede usar un alcohol que tiene de 1 a 8 átomos de carbono o una mezcla de dos o más de alcoholes que tienen de 1 a 8 átomos de carbono. Más preferiblemente, se puede usar metanol.

15 Además, la reacción en la etapa (c) se puede llevar a cabo a 80-120 °C durante 1-24 horas. Además, la reacción en la etapa (c) se puede llevar a cabo en presencia de un disolvente orgánico, preferiblemente cloroformo.

En un ejemplo de la presente invención, se usó *Rhodococcus opacus* PD630 como una cepa microbiana que tiene la capacidad de producir aceite, y se realizó un proceso de cultivo de dos etapas que consiste en un cultivo de primera etapa para el crecimiento de células microbianas y un cultivo de segunda etapa para la producción de petróleo. En el cultivo de la segunda etapa para la producción de petróleo, se usó un medio con una fuente limitada de nitrógeno para inducir la producción de petróleo. Para la autólisis del aceite producido, se introdujo un gen de lipasa que se activa con acetamida en la cepa microbiana, y la lipasa activada agregando acetamida a los microorganismos se usó para producir aproximadamente 0,27 g/L de ácido graso libre *in vivo*.

25 Además, la solución de ácido graso libre obtenida se liofilizó para eliminar el agua, después se le agregaron cloroformo y metanol que contenía H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se dejó reaccionar a 100 °C durante 12 horas. Luego, se añadió agua y se separó la capa de disolvente orgánico, obteniendo así el éster metílico de ácidos grasos libres. La concentración del éster metílico de ácidos grasos libres producido fue de 0,2 g/L, lo que sugiere que se logró la conversión del ácido graso libre en el éster metílico de ácidos grasos libres (Figura 1). Esto demostró que el uso del procedimiento de acuerdo con la presente invención permite que se produzca un éster metílico de ácidos grasos con alta eficiencia en un procedimiento más fácil y respetuoso con el medio ambiente, lo que indica que el procedimiento de la presente invención es muy útil para la producción de biodiesel como un sustituto del aceite liviano o similar.

30 En otro ejemplo de la presente invención, se usó una cepa microbiana introducida con un gen de la triacilglicerol lipasa solo o un gen de la monoacilglicerol lipasa solo o una combinación de los mismos, y luego se vio que, cuando el gen de la triacilglicerol lipasa y el gen de la monoacilglicerol lipasa se introdujeron juntos en la cepa microbiana, se produjo una mayor cantidad de ácido graso libre a partir de la misma cantidad de glucosa en comparación a cuando se introdujo el gen de la triacilglicerol lipasa o el gen de la monoacilglicerol lipasa, y se produjo un éster metílico de ácido graso con mayor eficiencia cuando el gen de la triacilglicerol lipasa y el gen de la monoacilglicerol lipasa se introdujeron juntos. Por lo tanto, en la presente invención, el gen de la triacilglicerol lipasa y el gen de la monoacilglicerol lipasa se introducen juntos en una cepa microbiana.

40 Mientras tanto, los siguientes ejemplos de la presente invención ilustran solo medios específicos y procedimientos de cultivo, será obvio para los expertos en la materia usar una solución glicolítica como suero o CSL (licor de maíz) y otros medios, y usar diversos procedimientos de cultivo, como el cultivo discontinuo o el cultivo continuo, como se informa en la literatura (Lee et al., Bioprocess Biosyst. Eng., 26: 63, 2003; Lee et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 58: 663, 2002; Lee et al., Biotechnol. Lett., 25: 111, 2003; Lee et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 54: 23, 2000; Lee et al., Biotechnol. Bioeng., 72: 41, 2001).

### Ejemplos

En lo que sigue, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a ejemplos.

Además, aunque los siguientes ejemplos ilustran que se usa metanol como alcohol en un proceso de esterificación de un ácido graso libre, será obvio para una persona experta en la técnica que se pueden usar otros alcoholes para esterificar ácidos grasos libres, produciendo así diversos tipos de ésteres alquílicos de ácidos grasos.

#### **Ejemplo 1: Preparación (1) de la cepa recombinante *Rhodococcus opacus* PD630 con introducción de genes que inducen la autólisis del aceite**

1-1. Construcción del plásmido pRUCSdp

Un vector recombinante de rpROUC18 (SEQ ID NO: 1) y un vector recombinante de rpROUC18\_KM (SEQ ID NO: 2), que tienen los mapas genéticos mostrados en la Figura 2, se prepararon a partir de un plásmido pUC18 (Pharmacia, Biotech, Uppsala, Suecia) y luego se introdujeron fragmentos de genes de la siguiente manera.

5 En primer lugar, se realizó PCR usando el ADN genómico de *Arabidopsis thaliana col.* como plantilla con cebadores sintetizados de SEQ ID NOS: 3 y 4, construyendo así un fragmento del gen sdp1 que codifica la triacilglicerol lipasa.

SEQ ID NO: 3: 5'-TATAGGCGCCATGGATATAAGTAATGAGGC-3'

SEQ ID NO: 4: 5'-TGTCCTGCAGCTAAGCATCTATAAACTAC-3'

10 Luego, el fragmento sdp1 preparado (SEQ ID NO: 5) se trató con enzimas de restricción (NarI y PstI) y luego se ligó en un plásmido rpROUC18 (Pharmacia, Biotech, Uppsala, Suecia) mediante ADN ligasa T4, construyendo así el plásmido recombinante pRUCSdp.

#### 1-2. Construcción del plásmido pRUCSdpMag

Se realizó PCR usando el ADN genómico de *Mycobacterium smegmatis* (KCTC 9108) como plantilla con cebadores sintetizados de SEQ ID NOS: 6 y 7, construyendo así un fragmento del gen MSMEG-0220 que codifica la monoacilglicerol lipasa.

15 SEQ ID NO: 6:

5`-`

TATACTAGAACCAACGGGGAGGACAACCGAATGGTGAGCAGCACCCGCAGTGAACAC-3`

SEQ ID NO: 7: 5'-TATATCTAGATCACAGATGACTCACGATCCATGAG-3'

20 Luego, el fragmento MSMEG\_0220 preparado (SEQ ID NO: 8) se trató con una enzima de restricción (XbaI) y luego se ligó en un plásmido pRUCSdp mediante la ADN-ligasa T4, construyendo así el plásmido recombinante pRUCSdpMag que se muestra en la Figura 3. Luego, el plásmido recombinante preparado pRUCSdpMag se introdujo en una cepa *Rhodococcus opacus* PD630 DSM 44193 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Alemania), construyendo así una cepa recombinante introducida con un gen de lipasa que se activa con acetamida.

### 25 **Ejemplo 2: Preparación (2) de cepas recombinantes de *Rhodococcus opacus* PD630 con introducción de genes que inducen la autólisis del aceite**

#### 2-1. Construcción de plásmidos.

30 Usando los cebadores, las condiciones y las plantillas de genes mostrados en la Tabla 1 a continuación, se construyeron diversos plásmidos como se muestra en la Figura 4 introduciendo triacilglicerol lipasa y monoacilglicerol lipasa en el plásmido rpROUC18 y un plásmido rpROUC18\_KM del Ejemplo 1-1. Además, la triacilglicerol lipasa y la monoacilglicerol lipasa también se introdujeron juntos en los plásmidos. La tabla 1 a continuación indica los tipos de enzimas de restricción y los orígenes de los genes, y, además, se pueden introducir diversos tipos de genes.

35 Como se describe en el Ejemplo 1, se usó un promotor inducido por la acetamida en el plásmido rpROUC18 de manera que el gen introducido podría operarse en el momento deseado, en el que la acetamida se usó a una concentración del 0,5 % (p/p).

Cebador ARAT\_f (SEQ ID NO: 9)

5'-TATATTCCATGGGGAGGACAACATATAAGTAATGAGGCTAGT-3'

Cebador ARAT-r (SEQ ID NO: 10)

5'-CCGCCTGCAGCTAAGCATCTATAAACTAC-3'

40 Cebador ATAG7\_f (SEQ ID NO: 11)

5'-TATTGACGTGACAACGGGGAGGACAACCGAATGGAACGCGGATCCACTTG-3'

Cebador ATAG7-r (SEQ ID NO: 12)

5'-CTTGTACTAAGTCCCGGGTTAGTGGACGACCTCGAAGC-3'

Cebador Mlip2\_f (SEQ ID NO: 13)

ES 2 713 526 T3

5'-TATTGGCGCCGACAACGGGGAGGACAACCGAATGGTGAGCAGCACCCGCAGTGAA-3'

Cebador Mlip2\_r (SEQ ID NO: 14)

5'-CCACGATGGACACGTTGTACTAAGTCTGCAGTCACAGATGACTCACGATCC-3'

Cebador PAO\_f (SEQ ID NO: 15) 5'-TATAGACGTCATGAAGAAGAAGTCTCTGCTCCCC-3'

5

Cebador PAO\_r (SEQ ID NO: 16)

5'-TCGAaagcttCTACAGGCTGGCGTTCTTCA-3'

[Tabla 1]

Gen	Cebador	Sitio enzimático de restricción contenido en el cebador.	Condición de reacción
TAG lipasa de <i>Arabidopsis thaliana</i>	ARAT_f	NcoI	Ciclo I: 94 °C, 5 min
	ARAT_r	PstI	Ciclo II: (30 ciclos) 94 °C, 40 s
TAG lipasa de <i>Aspergillus fumigatus</i>	ATAG7-f	AatII	56 °C, 30 s
	ATAG7-r	XmaI	72 °C, 1 min Ciclo III: 72 °C, 5 min
TAG lipasa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAO_f	AatII	Ciclo IV: 4 °C, almacenar
	PAO_r	HindIII	
MAG lipasa de <i>Mycobacterium smegmatis</i>	Mlip2_f	NarI	Ciclo I: 94 °C, 5 min
	Mlip2_r	PstI	Ciclo II: (30 Ciclos) 94 °C, 40 s 56 °C, 30 s 72 °C, 2 min Ciclo III: 72 °C, 5 min Ciclo IV: 4 °C, almacenamiento

10 En la Figura 4, el fragmento del gen de la TAG lipasa de *Arabidopsis thaliana* introducido en el plásmido rpROUC18KM\_Ara y en el plásmido rpROUC18KM\_Ara\_MAG, tiene una secuencia de SEQ ID NO: 17, y el fragmento del gen de la TAG 7G lipasa de *Aspergillus fumigatus* introducido en el plásmido rpROUC18KM\_Af7G y en el plásmido rpROUC18KM\_Af7G\_MAG tiene una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 18. También, el fragmento del gen de la TAG lipasa de *Pseudomonas aeruginosa* introducido en el plásmido rpROUC18KM\_PAO y el plásmido rpROUC18KM\_PAO\_MAG tiene una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 19, y el fragmento del gen de la lipasa MAG de *M. smegmatis* introducido en el plásmido rpROUC18KM\_MAG y en el plásmido rpROUC18KM\_Ara\_MAG, el plásmido rpROUC18KM\_Af7G\_MAG y el plásmido rpROUC18KM\_PAO\_MAG tiene una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 20.

**Ejemplo 3: Producción de éster metílico de ácidos grasos usando la cepa recombinante de *Rhodococcus opacus* PD630**

3-1: Producción (1) de ácido graso libre usando la cepa recombinante de *Rhodococcus opacus* PD630 del Ejemplo 1

5 Con el fin de cultivar la cepa recombinante de *Rhodococcus opacus* PD630 del Ejemplo 1, introducida con el gen de la lipasa que se activa con acetamida, se realizó un cultivo de dos etapas en un medio que tiene una fuente de nitrógeno limitada para producir aceite.

En primer lugar, en el cultivo de la primera etapa, la cepa recombinante del Ejemplo 1 se cultivó en un matraz de 250 ml que contenía 100 ml de NB (caldo nutritivo) a 30 °C y 250 rpm durante 24 horas.

10 El caldo de cultivo se centrifugó a 6000 rpm durante 10 minutos para recolectar las células microbianas que luego se lavaron con medio MSM (que se usa en el cultivo de segunda etapa) para eliminar el componente NB. Luego, la solución celular se centrifugó a 6000 rpm durante 10 minutos para recolectar las células microbianas que luego se suspendieron en 100 ml de medio MSM. La composición del medio MSM (pH 7,0) fue la siguiente: por litro de agua destilada, 0,8 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5,58 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,1g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,12 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 mg de  $\text{FeSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 1,54 mg de  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 2,86 mg de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0,039 mg de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0,041 mg de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,021 mg de  $\text{ZnCl}_2$ , 0,025 mg de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , y 11,6 mg de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

15 Se añadieron 20 g/l de glucosa como fuente de carbono a las células microbianas suspendidas en 100 ml del medio MSM, después de lo cual las células microbianas se cultivaron a 30°C y 250 rpm durante 24 horas. Luego, se verificó la acumulación de aceite en la cepa microbiana en tiempo real mediante monitorización microscópica. Luego, para activar la lipasa para producir ácido graso libre, se agregó 0,5 % (p/v) de acetamida a las células microbianas que luego se cultivaron a 30 °C durante 48 horas.

20 Una vez completado el cultivo, el caldo de cultivo se centrifugó a 6000 rpm durante 10 minutos para recolectar las células. Las células recolectadas se lavaron una vez con agua destilada y luego se secaron en un secador a 100 °C durante 24 horas.

25 Las células secas se analizaron mediante cromatografía de gases usando un sistema de cromatografía de gases de la serie Agilent 6890N (ChiralDEX G-TA de Astec, Estados Unidos) equipado con una columna capilar, midiendo así el contenido de ácido graso libre sintetizado en las células. Los resultados del cultivo en matraz de dos etapas indicaron que el ácido graso libre se produjo a una concentración de 0,27 g/l.

3-2: Producción (2) de ácido graso libre usando la cepa recombinante de *Rhodococcus opacus* PD630 del Ejemplo 2

30 Para cultivar las cepas recombinantes de *Rhodococcus opacus* PD630 del Ejemplo 2, introducidas con el gen de la lipasa que se activa con acetamida, se realizó un cultivo de dos etapas en un medio que tiene una fuente limitada de nitrógeno para producir aceite.

En primer lugar, en el cultivo de la primera etapa, cada una de las cepas recombinantes del Ejemplo 2 se cultivó en un matraz de 250 ml que contenía 200 ml de TSB (caldo de soja tréptico) a 30 °C y 200 rpm durante 16 horas.

35 El caldo de cultivo se centrifugó a 3000 rpm durante 30 minutos para recolectar las células microbianas que luego se lavaron con medio MSM para eliminar el componente TSB. Luego, la solución de células se centrifugó a 3000 rpm durante 30 minutos para recolectar las células microbianas que luego se suspendieron en 200 ml de medio MSM. La composición del medio MSM (pH 7,0) fue la siguiente: por litro de agua destilada, 0,8 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 5,58 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,1 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,12 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,0 mg de  $\text{FeSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 3,08 mg de  $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 5,72 mg de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0,078 mg de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0,082 mg de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,042 mg de  $\text{ZnCl}_2$ , 0,050 mg de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y 23,2 mg de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .

40 Se añadieron 20 g/l de glucosa como fuente de carbono a las células microbianas suspendidas en 200 ml del medio MSM, después de lo cual las células microbianas se cultivaron a 30°C y 200 rpm durante 48 horas. Luego, se verificó la acumulación de aceite en la cepa microbiana en tiempo real mediante monitorización microscópica. Luego, para activar la lipasa para producir ácido graso libre, se agregó 0,5 % (p/v) de acetamida a las células microbianas que luego se cultivaron a 30 °C durante 24 horas.

45 Una vez completado el cultivo, el caldo de cultivo se centrifugó a 3,000 rpm durante 30 minutos para recolectar las células. El sobrenadante se liofilizó a -45 °C y 1,33 kPa durante 48 horas. Las células recolectadas se lavaron una vez con agua destilada y luego se secaron en un secador a 80 °C durante 24 horas. Se tomaron y trataron 0,1 g de cada uno de los materiales resultantes usando un sistema de identificación microbiana (Microbial ID, Inc., Network, Del., Estados Unidos) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, preparando así las muestras de cromatografía de gases.

50 Cada una de las muestras preparadas se analizó mediante cromatografía de gases usando un sistema de cromatografía de gases de la serie Agilent 6890N (ChiralDEX G-TA de Astec, Estados Unidos) equipado con una columna capilar, midiendo así el contenido de ácido graso libre sintetizado en las células.



Los resultados del cultivo en matraz de 2 etapas como se describió anteriormente indicaron que el contenido de ácido graso libre en el sobrenadante fue significativamente mayor que el contenido de ácido graso libre en las células, lo que sugiere que el ácido graso libre se secretó extracelularmente. La Figura 5 muestra los resultados de la medición del ácido graso libre en el sobrenadante liofilizado. Como puede verse en la Figura 5, el ácido graso libre se produjo como una mezcla de ácidos grasos libres que tienen diversas longitudes. Además, se pudo ver que, cuando la triacilglicerol lipasa se introdujo junto con la monoacilglicerol lipasa, se produjo una mayor cantidad de ácido graso libre a partir de la misma cantidad de glucosa en comparación con la introducción de la triacilglicerol lipasa sola.

3-3: Conversión de ácido graso libre en éster metílico de ácido graso

10 A la cepa microbiana seca obtenida en el Ejemplo 3-1, se agregaron 2 ml de cloroformo y se agregó 1 ml de metanol que contenía 3 % (v/v) de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La mezcla se dejó reaccionar a 100°C durante 12 horas.

Una vez completada la reacción, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente y se añadió 1 ml de agua destilada a la mezcla, que luego se agitó intensamente durante 5 minutos, con lo cual la mezcla se separó en una capa de disolvente orgánico (cloroformo) y una capa de agua (solución acuosa). El material resultante se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 minutos, y solo la capa de disolvente orgánico se recogió y analizó por cromatografía de gases usando un sistema de cromatografía de gases de la serie Agilent 6890N (ChiralDEX G-TA de Astec, Estados Unidos) equipado con una columna capilar, midiendo así la concentración de éster metílico de ácido graso producido en la capa de disolvente orgánico.

20 Como resultado, como se muestra en la Figura 6, se encontró que se produjo un éster metílico de ácido graso C13 a una concentración de 0,2 g/l. Esto sugiere que el ácido graso libre se convirtió en el éster metílico del ácido graso.

Además, se añadió el mismo metanol descrito anteriormente y se hizo reaccionar con el sobrenadante obtenido en el Ejemplo 3-2, y luego se midió la concentración del éster metílico graso producido en la solución de reacción.

25 Como resultado, como puede verse en la Figura 7, el ácido graso libre se convirtió en éster metílico de ácido graso. En particular, se pudo observar que, cuando se introdujeron triacilglicerol lipasa (TAG lipasa) y monoacilglicerol lipasa (lipasa MAG), se produjo una cantidad significativamente mayor de metil éster de ácido graso en comparación con la introducción de triacilglicerol lipasa (TAG lipasa) o monoacilglicerol lipasa (MAG lipasa) sola. Como se describió anteriormente, el procedimiento de producción de éster alquílico de ácido graso usando microorganismos de acuerdo con la presente invención muestra una alta eficiencia de producción, de manera que se puede usar inmediatamente para la producción de biocombustible. Además, se pudo observar que la eficiencia de producción del éster metílico de ácidos grasos de la presente invención fue significativamente mayor que la de un procedimiento existente conocido en la técnica.

35 En otras palabras, se demostró que el uso del procedimiento de acuerdo con la presente invención permite que se produzca un éster metílico de ácido graso con una alta eficiencia en un procedimiento más fácil y respetuoso con el medio ambiente, lo que indica que el procedimiento de la presente invención es muy útil para la producción de biodiesel como sustituto del aceite liviano o similar.

### Aplicabilidad industrial

40 Como se describió anteriormente, de acuerdo con el procedimiento de la presente invención, el aceite acumulado en microorganismos, como el triacilglicerol que es un aceite típico producido por microorganismos, se puede convertir en un éster alquílico de ácido graso con alta eficiencia usando una metodología de ingeniería metabólica. Por lo tanto, el procedimiento de la presente invención es útil para la producción industrial de un éster alquílico de ácido graso del cual recientemente se ha encontrado que es efectivo como biodiesel.

<110> Korea Advanced Institute of Science and Technology

<120> Procedimiento de preparación de ésteres alquílicos de ácidos grasos usando microorganismos capaces de producir aceite

45 <130> PP-B0941

<150> KR10-2009-0065490

<151> 2009-07-17

<160> 20

<170> KopatentIn 1.71

50 <210> 1

<211> 3181

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> rpROUC18

5 <400> 1

ES 2 713 526 T3

gatctaccgg	ttccacgagg	cgctcaacgt	gtacgggcct	gcgctcaagg	aactcatcca	60
cgaagagttc	ggtgacggca	tcatgagcgc	catcaacttc	aaggtggaca	tccagcgtcg	120
tcccgatcca	gacggggacc	gggtggtggt	gaccttcgac	gggaagttcc	tcgactaccg	180
ctggtagtcc	gacgcgtgcg	tcaattctgg	ctgatgtcaa	cggttctgaa	cgcaaccgca	240
acgtcgtcgc	aacatggcgt	ggtagcttc	gggccctcg	acaacgggga	ggacaaccga	300
ggcgccctgc	aggtcgactc	tagacggcat	cttgcccaga	tttttcccag	gtaagagcgc	360
gtctcattgc	caaagatttg	cgactgtgcc	gaatgagact	gtcgggcgtc	tcattcccc	420
acgtcgggcc	gtctogaaag	tcagtcgcat	tagaccggt	catttgttgc	tcaatgcgcc	480
gacttatgag	actgttgagt	catgacagac	accgcgaaca	tccccgcccc	gaccggacgc	540
acattcggat	acgcccgcgt	ctcgacttcc	cggcagaacc	ttgaccgcca	gatggacacg	600
ctccgcaaga	tgggcgtgga	cggcgaccgg	atctatgccg	ataaggtgac	cggccgcacg	660
atggaccgcc	ccgcgtggca	ggtctgcaac	tcgcatctgg	atgccggcga	cacgctcgtg	720
gtggacgcac	tcgaccgttt	gggacgctcc	acgttgagg	tcatcgacac	aatccacgac	780
ctgaccgaac	gcggcgtcat	catcgtggac	cgcacgtacc	gccgcctaga	tgccagtgac	840
gcggtcggga	aggcgttggt	gcagatcatg	gcggtcatgg	ccgagatgga	agtcaacttg	900
aaagccgagc	gtgccgccgc	tgctcgtgag	tccgccgccg	cccgtggaaa	gcacaccgga	960
cgcccccgca	agctcgccaa	ccacgacgtt	gctcgtgccc	gtgagctcga	attcgtaatc	1020
atggtcatag	ctgtttcctg	tgtgaaattg	ttatccgctc	acaattccac	acaacatacg	1080
agccggaagc	ataaagtgta	aagcctgggg	tgcctaata	gtgagctaac	tcacattaat	1140
tgcgttgccg	tcactgcccg	ctttccagtc	gggaaacctg	tcgtgccagc	tgcattaatg	1200

ES 2 713 526 T3

aatcggccaa	cgcgcgggga	gaggcggttt	gcgtattggg	cgctcttccg	cttcctcgct	1260
cactgactcg	ctgcgctcgg	tcgttcggct	gcggcgagcg	gtatcagctc	actcaaaggc	1320
ggtaatacgg	ttatccacag	aatcagggga	taacgcagga	aagaacatgt	gagcaaaagg	1380
ccagcaaaag	gccaggaacc	gtaaaaaggc	cgcgttgctg	gcgtttttcc	ataggctccg	1440
ccccctgac	gagcatcaca	aaaatcgacg	ctcaagtcag	aggtggcgaa	acccgacagg	1500
actataaaga	taccagggct	ttccccctgg	aagctccctc	gtgcgctctc	ctgttccgac	1560
cctgccgctt	accggatacc	tgtccgcctt	tctcccttcg	ggaagcgtgg	cgctttctca	1620
tagctcacgc	tgtaggtatc	tcagttcggg	gtaggtcggt	cgctccaagc	tgggctgtgt	1680
gcacgaacct	cccgttcagc	ccgaccgctg	cgcttatcc	ggtaactatc	gtcttgagtc	1740
caaccggta	agacacgact	tatcgccact	ggcagcagcc	actggtaaca	ggattagcag	1800
agcgaggtat	gtagggcgtg	ctacagagtt	cttgaagtgg	tggcctaact	acggctacac	1860
tagaaggaca	gtatttggta	tctgcgctct	gctgaagcca	gttaccttcg	gaaaaagagt	1920
tggtagctct	tgatccggca	aacaaaccac	cgctggtagc	gggggttttt	ttgtttgcaa	1980
gcagcagatt	acgcgcagaa	aaaaaggatc	tcaagaagat	cctttgatct	tttctacggg	2040
gtctgacgct	cagtggaaacg	aaaactcacg	ttaagggtat	ttggatcatga	gattatcaaa	2100
aaggatcttc	acctagatcc	ttttaaatta	aaaatgaagt	tttaaataca	tctaaagtat	2160
atatgagtaa	acttggtctg	acagttacca	atgcttaatc	agtgaggcac	ctatctcagc	2220
gatctgtcta	tttcggtcat	ccatagttgc	ctgactcccc	gtcgtgtaga	taactacgat	2280
acgggagggc	ttaccatctg	gccccagtgc	tgcaatgata	ccgcgagacc	cacgctcacc	2340
ggctccagat	ttatcagcaa	taaaccagcc	agccggaagg	gccgagcgca	gaagtggacc	2400
tgcaacttta	tccgctcca	tccagtctat	taattgttgc	ggggaagcta	gagtaagtag	2460
ttcgccagtt	aatagtttgc	gcaacgttgt	tgccattgct	acaggcatcg	tggtgtcacg	2520
ctcgtcgttt	ggatggctt	cattcagctc	cggttcccaa	cgatcaaggc	gagttacatg	2580
atccccatg	ttgtgcaaaa	aagcggttag	ctccttcggg	cctccgatcg	ttgtcagaag	2640
taagttggcc	gcagtgttat	cactcatggt	tatggcagca	ctgcataatt	ctcttactgt	2700
catgccatcc	gtaagatgct	tttctgtgac	tggtgagtac	tcaaccaagt	cattctgaga	2760
atagtgtatg	cgcgaccga	gttgcctttg	cccggcgctca	atacgggata	ataccgcgcc	2820
acatagcaga	actttaaaag	tgctcatcat	tggaaacgt	tcttcggggc	gaaaactctc	2880
aaggatctta	ccgctgttga	gatccagttc	gatgtaacct	actcgtgcac	ccaactgatc	2940
ttcagcatct	tttactttca	ccagcgtttc	tgggtgagca	aaaacaggaa	ggcaaaatgc	3000
cgcaaaaaag	ggaataaggg	cgacacggaa	atgttgaata	ctcatactct	tcttttttca	3060
atattattga	agcattttatc	agggttattg	tctcatgagc	ggatacatat	ttgaatgtat	3120
ttagaaaaat	aaacaaatag	gggttccgcg	cacatttccc	cgaaaagtgc	cacctgacgt	3180
c						3181

<210> 2

<211> 6625

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> rpROUC18\_KM

<400> 2

ES 2 713 526 T3

cgcaccgatc gcccttccca acagttgogg gggggggggg aaagccacgt tgtgtctcaa	60
aatctctgat gttacattgc acaagataaa aatataatcat catgaacaat aaaactgtct	120
gcttacataa acagtaatac aaggggtggt atgagccata ttcaacggga aacgtcttgc	180
tcgaggccgc gattaaattc caacatggat gctgatttat atgggtataa atgggctcgc	240
gataatgtcg ggcaatcagg tgcgacaatc tatcgattgt atgggaagcc cgatgcgcca	300
gagttgtttc tgaaacatgg caaaggtagc gttgccaatg atgttacaga tgagatggtc	360
agactaaact ggctgacgga atttatgcct cttccgacca tcaagcattt tatccgtact	420
cctgatgatg catggttact caccactgog atccccggga aaacagcatt ccaggtatta	480
gaagaatata ctgattcagg tgaaaatatt gttgatgcgc tggcagtgtt cctgcgcccg	540
ttgcattcga ttctgtttg taattgtcct tttaacagcg atcgcgtatt tcgtctcgtc	600
caggcgcaat cacgaatgaa taacggtttg gttgatgcga gtgattttga tgacgagcgt	660
aatggctggc ctgttgaaca agtctggaaa gaaatgcata agcttttgcc attctcaccg	720
gattcagtcg tcaactcatgg tgatttctca cttgataacc ttatttttga cgaggggaaa	780
ttaatagggt gtattgatgt tggacgagtc ggaatcgag accgatacca ggatcttgcc	840
atcctatgga actgcctcgg tgagttttct cttcattac agaaacggct ttttcaaaaa	900
tatggtattg ataactctga tatgaataaa ttgcagtttc atttgatgct cgatgagttt	960
ttctaagatc taccggttcc acgagggcgt caacgtgtac gggcctgcgc tcaaggaact	1020
catccacgaa gagttcgggt acggcatcat gagcgccatc aacttcaagg tggacatcca	1080
gcgtcgtccc gatccagacg gggaccgggt ggtggtgacc ttcgacggga agttcctcga	1140
ctaccgctgg tagtccgacg cgtgcgtcaa ttctggctga tgtcaacggg ttcgaacgca	1200
accgcaacgt cgtcgcaaca tggcgtgggt agcttcgggc ccgtcgaaa cggggaggac	1260
aaccgaggcg ccatggatat aagtaatgag gctagtgtcg atcccctttc gattggacca	1320
tcatctatca tgggtcgaac cattgctttc agagtcttgt tctgtagatc aatgtcacag	1380

ES 2 713 526 T3

cttaggcgtg atctctttcg gttcttggtg cattggtttc ttagatttaa gctgaccggt 1440  
 tcaccgtttg tgcctggtt tcacctcgg aaccctcaag ggattttagc ggtggttaca 1500  
 atcattgcct ttgtggtgaa acgatacacg aatgtgaaaa taaaggcggg aatggcttac 1560  
 cggaggaagt tttggaggaa tatgatgogg acggctttga cttatgagga atgggctcat 1620  
 gctgctaaga tgtagagaa gaaacacca aagatgaatg aatctgatct ttatgatgaa 1680  
 gagttggtta agaacaagct tcaggagctt cgtcatcgtc gccagaagg ctcaactaga 1740  
 gacattatgt tttgtatgag agctgatttg gtgaggaatc tcggtaatat gtgtaattcg 1800  
 gagcttcata aaggtagact tcaggttcct agacatatca aagagtacat tgatgaggtg 1860  
 tctactcagt tgagaatggt ttgtaactct gattcagagg agctttcttt agaagagaag 1920  
 ctttctttta tgcataaac acggcatgcc tttggtagaa cggctttgct tttgagtgg 1980  
 ggggcttctc ttggtgcgtt tcatggtggt gtggttagga ctttgggtga gcataagctt 2040  
 ttacctcgaa taattgctgg ttctagtgtt ggatccatca tttgtgctgt tgtggcctca 2100  
 aggtcttggc cagaactaca gatttcttt gagaattctt tgcattcttt acagttcttt 2160  
 gatcagctcg gaggcgtggt ctcaatagtg aaacgggtaa tgacacaagg ggctctacac 2220  
 gatatcagac agttgcaatg tatgcttaga aacctcaca gcaatctcac attccaagaa 2280  
 gcttatgaca tgacaggaag gattctoggg atcaccgttt gctccccaag aaagcatgaa 2340  
 cctcctcggg gtcttaacta ttgacttctg cctcatgtgg ttatatggag cgcagtgact 2400  
 gcttcttgtg cttttcctgg tctcttgaa gctcaagagc taatggctaa agatcgaagt 2460  
 ggagagatcg taccgtatca tccaccttc aatttggatc cagaagtagg cactaaatca 2520  
 tcatctggac gccggtggag agatggtagt ttggaggttg atttaccaat gatgcagctt 2580  
 aaagaactgt tcaatgtcaa tcatcttatt gtgagccaag ccaatcctca cattgctcca 2640  
 ttactgcgtc taaaggattt agttcgagct tatggtggtg gattcgcagc taagctcgcg 2700  
 catctagtgg agatggaggt caaacataga tgcaaccagg tattagagct cggttttcct 2760  
 ctgggtggac tcgcaaagct ttttgcctag gagggggaa gtgatgttac agttgtaatg 2820  
 cctgctactc ttgctcagta ctggaagatt atacaaaatc cgactcatgt cgagcttcag 2880  
 aaagcggcta accaaggaag aagatgcact tgggagaagc tctcagccat aaaatcaaac 2940  
 tgcgggatcg agcttgcgct tgatgattct gtagctatc ttaaccatat gcggaggctc 3000  
 aagaaaagtg cggagagagc cgccactgcc acgtcttctg ctcatcacgg attggcttca 3060  
 accaccagat tcaatgcttc aagaagaatc ccatcttga acgtccttgc cagagagaac 3120  
 tcaacaggct cactggatga tctagtact gacaataacc tccacgcttc ttggggcagg 3180  
 aatttaagcg acagtgaaac agagagcgtg gaggttgatt cttggacaag aactggtgga 3240  
 cctttaatga gaacagcttc tgctaataag ttcatgatt ttgttcagag tcttgatctc 3300

ES 2 713 526 T3

gacattgcat tggtcagagg atttagtagc agtcccaatt ctccagcagt tcctcctggt 3360  
ggctcgttta ctccaagccc gagatccata gcggctcatt cggatatcga atcaaacagc 3420  
aatagcaaca atcttggaac aagcacttca agcataacag ttactgaagg tgatcttcta 3480  
cagcctgaga gaacgagtaa cggatttgtg ttaaactcgc ttaaaagaga gaacttggga 3540  
atgccatcga ttgggaacca aaatacagag ttaccagaga gtgtacagct cgatataccg 3600  
gagaaggaga tggattgtag ctctgtatca gaacacgaag aagatgataa cgacaatgaa 3660  
gaagaacata acggctcgag tctggttact gtttcttcag aagattccgg tttacaagaa 3720  
ccggtgtctg gtagtgttat agatgcttag ctgcaggtcg actctagacg gcatcttgcc 3780  
cagatthttc ccaggtaaga gcgcgtctca ttgccaaaga tttgcgactg tgccgaatga 3840  
gactgtcggg cgtctcattc ccccacgtcg ggccgtctcg aaagtcagtc gcattagacc 3900  
ggctcatttg ttgctcaatg cggcgaacta tgagactggt gagtcatgac agacaccgcg 3960  
aacatccccg ccccgaccgg acgcacattc ggatacgcgc gcgtctcgac ttcccggcag 4020  
aaccttgacc gccagatgga cacgctccgc aagatgggcg tggacggcga ccggatctat 4080  
gccgataagg tgaccggccg cacgatggac cgcgccgctg ggcaggtctg caactcgcat 4140  
ctggatgccg gcgacacgct cgtggtggac gcactcgacc gtttgggacg ctccacgttg 4200  
gaggtcatcg acacaatcca cgacctgacc gaacgcggcg tcatcatcgt ggaccgcacg 4260  
taccgccgcc tagatgccag tgacgcggtc gggaaaggct tgggtgcagat catggcggtc 4320  
atggccgaga tggaaagtaa cttgaaagcc gagcgtgccg ccgctgctcg tgagtccgcc 4380  
gccgcccgtg gaaagcacac cggacgcccc cgcaagctcg ccaaccacga cgttgctcgt 4440  
gcccgtagac tccaattcgt aatcatggtc atagctgttt cctgtgtgaa attgttatcc 4500  
gctcacaatt ccacacaaca tacgagccgg aagcataaag tgtaaagcct ggggtgccta 4560  
atgagtgagc taactcacat taattgcgtt gcgctcactg cccgctttcc agtcgggaaa 4620  
cctgtcgtgc cagctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg gggagaggcg gtttgcgtat 4680  
tgggcgctct tccgcttccg cgtcactga ctgctgcgc tgggtcgttc ggctgcccgc 4740  
agcggtatca gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc acagaatcag gggataacgc 4800  
aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagc aaccgtaaaa aggcgcgctt 4860  
gctggcgttt ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat cacaaaaatc gacgctcaag 4920  
tcagaggtgg cgaaaccgca caggactata aagataccag gcgtttcccc ctggaagctc 4980  
cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc gcttaccgga tacctgtccg cctttctccc 5040  
ttcgggaagc gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg tatctcagtt cgggtgtaggt 5100  
cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcacga accccccgtt cagcccagacc gctgcgcctt 5160



ES 2 713 526 T3

atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac gacttatcgc cactggcagc 5220  
 agccactggg aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc ggtgctacag agttcttgaa 5280  
 gtgggtggcct aactacggct aactagaag gacagtatth ggtatctgcg ctctgctgaa 5340  
 gccagttacc ttcggaaaaa gaggtagtag ctcttgatcc ggcaaaaaaa ccaccgctgg 5400  
 tagcggtagg ttttttggth gcaagcagca gattacgcgc agaaaaaaag gatctcaaga 5460  
 agatcctttg atcttttcta cggggtctga cgctcagtgg aacgaaaact cacgttaagg 5520  
 gattttggth atgagattat caaaaaggat cttcacctag atccttttaa attaaaaatg 5580  
 aagttttaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaaactgg tctgacagtt accaatgctt 5640  
 aatcagtggg gcacctatct cagcgatctg tctatttctg tcatccatag ttgcctgact 5700  
 ccccgctcgt tagataacta cgatacggga gggcttacca tctggcccca gtgctgcaat 5760  
 gataccgca gaccacgct caccggctcc agatttatca gcaataaacc agccagccgg 5820  
 aagggccgag cgcagaagtg gtctgcaac tttatccgcc tccatccagt ctattaattg 5880  
 ttgccgggaa gctagagtaa gtagttcgcc agttaatagt ttgcaaacg ttggtgcat 5940  
 tgctacaggc atcgtgggtg cacgctcgtc gtttggtagt gcttcattca gctccggctc 6000  
 ccaacgatca aggcagagta catgatcccc catgttgtgc aaaaagcgg ttagctcctt 6060  
 cggctctccg atcgttgtca gaagtaagt ggccgcagt ttatcactca tggttatggc 6120  
 agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga tgcttttctg tgactgggta 6180  
 gtactcaacc aagtcattct gagaatagt tatgcccga cagagttgct cttgccggc 6240  
 gtcaatacgg gataatacgg cccacatag cagaactta aaagtgtca tcattggaaa 6300  
 acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg ttgagatcca gttogatgta 6360  
 acccactcgt gcacccaact gatcttcagc atcttttact ttcaccagcg tttctgggtg 6420  
 agcaaaaaca ggaaggcaaa atgccgcaaa aaaggaata agggcgacac ggaaatggtg 6480  
 aatactcata ctcttccttt ttcaatatta ttgaagcatt tatcagggtt attgtctcat 6540  
 gagcggatc atatttgaat gtatttagaa aaataaacia ataggggttc cgcgcacatt 6600  
 tccccgaaa gtgccacctg acgtc 6625

<210> 3

<211> 30

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador de PCR para el fragmento del gen sdpl

<400> 3

tataggcgc atggatataa gtaatgaggc 30

10 <210> 4

<211> 30

## ES 2 713 526 T3

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador de PCR para el fragmento del gen sdpl

5 <400> 4

tgtcctgcag ctaagcatct ataacactac 30

<210> 5

<211> 2478

<212> ADN

10 <213> Fragmento del gen sdpl de *Arabidopsis thaliana col.*

<400> 5

ES 2 713 526 T3

atggatataa gtaatgaggc tagtgtogat cccttttcga ttggaccatc atctatcatg	60
ggtcgaacca ttgctttcag agtcttgttc tgtagatcaa tgtcacagct taggcgtgat	120
ctctttcggc tcttgttgca ttggtttctt agatttaagc tgaccgtttc accgtttgctg	180
tcgtggtttc atcctcggaa ccctcaaggg attttagcgg tggttacaat cattgccttt	240
gtggtgaaac gatacacgaa tgtgaaaata aaggcggaaa tggcttaccg gaggaagttt	300
tggaggaata tgatgoggac ggctttgact tatgaggaat gggctcatgc tgctaagatg	360
ttagagaagg aaacaccaaa gatgaatgaa tctgatcttt atgatgaaga gttggttaag	420
aacaagcttc aggagcttcg tcatcgtcgc caagaaggct cacttagaga cattatgttt	480
tgtatgagag ctgatttggt gaggaatctc ggtaatatgt gtaattcggg gcttcataaa	540
ggtagacttc aggttcctag acatatcaaa gagtacattg atgagggtgc tactcagttg	600
agaatggttt gtaactctga ttcagaggag ctttctttag aagagaagct ttcttttatg	660
catgaaacac ggcattgcctt tggtagaacg gctttgcttt tgagtgggtg ggcttctctt	720
ggtgcgtttc atggttggtg ggttaggact ttggttgagc ataagctttt acctogaata	780
attgctgggt ctagtgttg atccatcatt tgtgctgttg tggcctcaag gtcttggcca	840
gaactacaga gtttctttga gaattctttg cattctttac agttctttga tcagctcgga	900
ggcgtgttct caatagtgaa acgggtaatg acacaagggg ctctacacga tatcagacag	960
ttgcaatgta tgcttagaaa cctcacaagc aatctcacat tccaagaagc ttatgacatg	1020
acaggaagga ttctcgggat caccgtttgc tcccgaagaa agcatgaacc tcctcgggtg	1080
cttaactatt tgacttcgcc tcatgtggtt atatggagcg cagtgactgc ttcttgtgct	1140
tttctggtc tctttgaagc tcaagagcta atggctaaag atcgaagtgg agagatcgta	1200
ccgtatcatc cacctttcaa tttggatcca gaagtaggca ctaaatac atctggacgc	1260
cgggtggagag atggtagttt ggaggttgat ttaccaatga tgcagcttaa agaactgttc	1320

ES 2 713 526 T3

aatgtcaatc attttattgt gagccaagcc aatcctcaca ttgctccatt actgcgtcta 1380  
aaggatttag ttcgagctta tgggtgtaga ttcgcagcta agctcgcgca tctagtggag 1440  
atggagggtca aacatagatg caaccaggta ttagagctcg gttttcctct cggaggactc 1500  
gcaaagcttt ttgctcagga gtgggaaggt gatgttacag ttgtaatgcc tgctactctt 1560  
gctcagtact cgaagattat acaaaatccg actcatgtcg agcttcagaa agcggctaac 1620  
caaggaagaa gatgcacttg ggagaagctc tcagccataa aatcaaactg cgggatcgag 1680  
cttgcgcttg atgattctgt agctattctt aaccatatgc ggaggctcaa gaaaagtgcg 1740  
gagagagccg ccaactgccac gtcttcgtct catcacggat tggcttcaac caccagattc 1800  
aatgcttcaa gaagaatccc atcttggaaac gtccttgcca gagagaactc aacagggtca 1860  
ctggatgatc tagtcaactga caataacctc cacgcttctt cgggcaggaa tttaatgagc 1920  
agtgaacag agagcgtgga gttgagttct tggacaagaa ctgggtggacc tttaatgaga 1980  
acagcttctg ctaataagtt cattgatttt gttcagagtc ttgatatcga cattgcattg 2040  
gtcagaggat ttagtagcag tccaattct ccagcagttc ctcttgggtg ctcgtttact 2100  
ccaagcccga gatccatagc ggctcattcg gatatcgaat caaacagcaa tagcaacaat 2160  
cttgaacaa gcaactcaag cataacagtt actgaaggtg atcttctaca gcctgagaga 2220  
acgagtaacg gatttgtggt aaacgtcgtt aaaagagaga acttgggaat gccatcgatt 2280  
gggaaccaa atacagagtt accagagagt gtacagctcg atataccgga gaaggagatg 2340  
gattgtagct ctgtatcaga acacgaagaa gatgataacg acaatgaaga agaacataac 2400  
ggctcgagtc tggttactgt ttcttcagaa gattccggtt tacaagaacc ggtgtctggt 2460  
agtgttatag atgcttag 2478

<210> 6

<211> 57

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador de PCR para el fragmento del gen MSMEG\_0220

<400> 6

tatatctaga acaacgggga ggacaaccga atggtagca gcacccgag tgaacac 57

10 <210> 7

<211> 35

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Cebador de PCR para el fragmento del gen MSMEG\_0220

<400> 7

ES 2 713 526 T3

tatatctaga tcacagatga ctcacgatcc atgag 35

<210> 8

<211> 843

<212> ADN

5 <213> Fragmento del gen MSMEG\_0220 de *Mycobacterium smegmatis*

<400> 8

atggtgagca gcacccgcag tgaacacagc tttgccggcg tcggcggcgt ccgcatcgtc	60
tacgacgtgt ggacccccga caccgaccog cgcggggctcg tcgtgctggc gcacggttac	120
gccgaacacg caggccgcta ccaccacgtc gcgcaacggt tcggggccgc gggcctgctc	180
gtgtacgcac tcgaccaccg cggacacggc cgctccggcg gtaagcgcgt tcacctgcgc	240
gacctgtcgg agttcgtcga ggacttcocg aactcgtcgc gcatcgccgc gaacgaccac	300
cccacactgc cgcggatcgt gctcggccac agcatgggcg gcggcatcgt cttcgcctat	360
ggcgctcggg acccgggcca gtactcggcc atggtgctgt ccgggcccgc cgtgaacgca	420
cacgacggcg tatcgcgggt gctggtcgcg gtggccaaag tgctgggcaa actcgcgccc	480
ggcatcccgg tggagaacct ggacgccgac gcggtctcgc gcgaccccga ggtggtcgcg	540
gcctacaagg ccgatccgat ggttcaccac ggcaagctgc ccgcgggcat cgcgcgcgcg	600
ctgatcggcc tgggacagag catgccgcag cgggccgcgc cgctgaccgc gccgctgctg	660
gtggtgcacg gcgacaagga ccgcctcadc ccggtggcgc gcagccggct gctcgtcgac	720
cgcgtggctt ccgaggatgt ccacctgaag gtctaccccg ggctgtacca cgaggtgttc	780
aacgaacccg aacagaaact cgtcctcgac gacgtcacct catggatcgt gagtcactcg	840
tga	843

<210> 9

<211> 42

10 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador de ARAT\_f

<400> 9

15 tatattccat ggggaggaca acatataagt aatgaggcta gt 42

<210> 10

<211> 30

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Cebador ARAT-r

ES 2 713 526 T3

<400> 10  
ccgcctgcag ctaagcatct ataacactac 30  
<210> 11  
<211> 51  
5 <212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> cebador ATAG7\_f  
<400> 11  
10 tattgacgtc gacaacgggg aggacaaccg aatggaacgc ggatccactt g 51  
<210> 12  
<211> 38  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
15 <220>  
<223> cebador ATAG7-r  
<400> 12  
ctgtactaa gtcccgggtt agtggacgac ctccaagc 38  
<210> 13  
20 <211> 55  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> cebador Mlip2\_f  
25 <400> 13  
tattggcgcc gacaacgggg aggacaaccg aatggtgagc agcaccgca gtgaa 55  
<210> 14  
<211> 51  
<212> ADN  
30 <213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> cebador Mlip2\_r  
<400> 14  
ccacgatgga cacgtgtac taagtctgca gtcacagatg actcacgatc c 51  
35 <210> 15  
<211> 34  
<212> ADN

## ES 2 713 526 T3

<213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> cebador PAO\_f  
<400> 15  
5   tatagacgtc atgaagaaga agtctctgct cccc       34  
<210> 16  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
10   <220>  
<223> cebador PAO\_r  
<400> 16  
tcgaaagctt ctacaggctg gcgttctca       30  
<210> 17  
15   <211> 2478  
<212> ADN  
<213> Fragmento del gen de la TAG lipasa de *Arabidopsis thaliana*  
<400> 17

ES 2 713 526 T3

atggatataa gtaatgaggc tagtgcgat cccttttcga ttggaccatc atctatcatg	60
ggtcgaacca ttgctttcag agtcttggtc tgtagatcaa tgccacagct taggcgtgat	120
ctctttcggg tcttggtgca ttggtttott agatttaagc tgaccgtttc accgtttggtg	180
tcgtggtttc atcctcggaa cctcaaggg attttagcgg tggttacaat cattgccttt	240
gtgttgaaac gatacacgaa tgtgaaaata aaggcggaaa tggcttaccg gaggaagttt	300
tggaggaata tgatgcggac ggctttgact tatgaggaat gggctcatgc tgctaagatg	360
ttagagaagg aaacaccaa gatgaatgaa tctgatcttt atgatgaaga gttggttaag	420
aacaagcttc aggagcttcg tcatcgtcgc caagaaggct cacttagaga cattatgttt	480
tgtatgagag ctgatttggt gaggaatctc ggtaatatgt gtaattcggg gcttcataaa	540
ggtagacttc aggttcctag acatatcaa gagtacattg atgaggtgtc tactcagttg	600
agaatggttt gtaactctga ttcagaggag ctttctttag aagagaagct ttcttttatg	660
catgaaacac ggcattgcctt tggtagaacg gctttgcttt tgagtgggtg ggcttctctt	720
ggcgcgtttc atggtgggtg ggttaggact ttggttgagc ataagctttt acctogaata	780
attgctggtt ctagtggttg atccatcatt tgtgctgttg tggcctcaag gtcttgcca	840
gaactacaga gtttctttga gaattctttg cattctttac agttctttga tcagctcggg	900
ggcgtgttct caatagtga acgggtaatg acacaagggg ctctacacga tatcagacag	960
ttgcaatgta tgcttagaaa cctcacaagc aatctcacat tccaagaagc ttatgacatg	1020
acaggaagga ttctcgggat caccgtttgc tcccaagaa agcatgaacc tcctcgggtg	1080
ottaactatt tgacttcgcc tcatgtggtt atatggagcg cagtgactgc ttcttggtct	1140



ES 2 713 526 T3

tttcctggtc tctttgaagc tcaagagcta atggctaaag atcgaagtgg agagatcgta 1200  
 ccgtatcatc cacctttcaa tttggatcca gaagtaggca ctaaatacctc atctggacgc 1260  
 cgggtggagag atggtagttt ggaggttgat ttaccaatga tgcagcttaa agaactgttc 1320  
 aatgtcaatc attttattgt gagccaagcc aatcctcaca ttgctccatt actgcgctca 1380  
 aaggatttag ttcgagctta tgggtgtaga ttcgcagcta agctcgcgca tctagtggag 1440  
 atggaggtca aacatagatg caaccaggta ttagagctcg gttttcctct cgggtggactc 1500  
 gcaaagcttt ttgctcagga gtggaaggt gatgttacag ttgtaatgcc tgctactctt 1560  
 gctcagtact cgaagattat acaaaatccg actcatgtcg agcttcagaa agcgggctaac 1620  
 caaggaagaa gatgcacttg ggagaagctc tcagccataa aatcaaaactg cgggatcgag 1680  
 cttgcgcttg atgattctgt agctattctt aaccatatgc ggaggctcaa gaaaagtgcg 1740  
 gagagagccg ccaactgccac gtcttcgtct catcacggat tggcttcaac caccagattc 1800  
 aatgcttcaa gaagaatccc atcttggaac gtccttgcca gagagaactc aacaggctca 1860  
 ctggatgatc tagtcaactga caataacctc cacgcttctt cgggcaggaa ttttaagcgac 1920  
 agtgaacag agagcgtgga gttgagttct tggacaagaa ctgggtggacc tttaatgaga 1980  
 acagcttctg ctaataagtt cattgatttt gttcagagtc ttgatatcga cattgcattg 2040  
 gtcagaggat ttagtagcag tcccaattct ccagcagttc ctctgtgtgg ctcgtttact 2100  
 ccaagcccga gatccatagc ggctcattcg gatatcgaat caaacagcaa tagcaacaat 2160  
 cttggaacaa gcacttcaag cataacagtt actgaagtg atcttctaca gcctgagaga 2220  
 acgagtaacg gatttgtggt aaacgtcgtt aaaagagaga acttgggaat gccatogatt 2280  
 gggaaccaa atacagagtt accagagagt gtacagctcg atataccgga gaaggagatg 2340  
 gattgtagct ctgtatcaga acacgaagaa gatgataacg acaatgaaga agaacataac 2400  
 ggctcagatc tggttactgt ttcttcagaa gattccggtt tacaagaacc ggtgtctggt 2460  
 agtgttatag atgcttag 2478

<210> 18

<211> 1047

<212> ADN

5 <213> Fragmento del gen de la TAG 7G lipasa de *Aspergillus fumigatus*

<400> 18

ES 2 713 526 T3

```

atggaacgcg gatccacttg cgtcataagg actgcggtctt ctcgatcaca atggacgact      60
atggtacatg ttggtgcaga attgaatgcg tctgcacaag taaggtttct tcgcagcctg      120
tgtaggtttc gatcatttag ttcttcctat cggagcttcc acgctttgcc gtgcaggagc      180
aatcacata agcatatagg ttccgatgct cttgaccctc gccttgatga tcttggaag      240
gtcttacgag acgaatatgc ggtgatccga gatcattacg aaaccccaaa gtatccagtt      300
gtccttgccg atgggctcct aggttttgat gagttacgcc tcgctggccc tctccttct      360
ggagttcagt actggcgagg aatcaaggaa gctttgacct agaaaggagt gcaagtcac      420
actgcaacag tacctccttc ggggtccatt gagatgctg cgaggagct ggtgaaggat      480
atagatgagg gcgcccaggg gaaagctgta aatattattg cgggccttga tgctcgttac      540
atgataagtc gtctaagacc gaagaagttc aaggtcttgt ctttgacgac aattgogact      600
cctcatcgtg gttctacggt tgcagattat gtccttgagc gaattggtga cgagcggcta      660
cccagttat attacactct cggaaaactc aaggttgaaa ctggagcctt ttcccagttg      720
acgcgcaagt atatggaaga tacgttcaat ccagccacgc ctgacgttga ggatgttcgt      780
tacttcagct acggcgcagc gatgcaacca agcttttggc ctatgttccg cttgtcccat      840
cgcgttcttc aagaggtgga aggatataac gatgggctag tcagcgtcgc tagcagcaaa      900
tggggaaaat acaaaggcac cctggaaggg gccagccacc tggatttgat caactggacc      960
aacaggctga agtggcttgc gggcgagata actggaaca ggcaaaggtt tgtaaaatct     1020
atctctggct tcgaggtcgt ccactaa                                           1047

```

<210> 19

<211> 936

5 <212> ADN

<213> Fragmento del gen de la TAG lipasa de Pseudomonas aeruginosa

<400> 19

ES 2 713 526 T3

atgaagaaga agtctctgct cccctcggc ctggccatcg gtctcgctc tctcgctgcc	60
agccctctga tccaggccag cacctacacc cagaccaaat accccatcgt gctggccac	120
ggcatgctcg gcttcgacaa catcctcggg gtcgactact ggttcggcat tcccagcgcc	180
ttgcgccgtg acggtgcccc ggtctacgtc accgaagtca gccagttgga cacctcggaa	240
gtccgcggcg agcagttgct gcaacaggtg gaggaaatcg tcgccctcag cggccagccc	300
aaggtcaacc tgatcggcca cagccacggc gggccgacca tccgctacgt cgcgcgcta	360
cgtcccgacc tgatcgcttc cgcaccagc gtcggcgccc cgcacaaggg ttcggacacc	420
gccgacttcc tgcgccagat cccaccgggt tcggccggcg aggcagtcct ctccgggctg	480
gtcaacagcc tcggcgcgct gatcagcttc ctttcagcg gcagcaccgg tacgcagaat	540
tcactgggct cgctggagtc gctgaacagc gagggtgccg cgcgcttcaa cgccaagtac	600
ccgcagggca tccccacctc ggcctcggc gaaggcgctt acaaggtcaa cggcgtgagc	660
tattactcct ggagcggttc ctcccgctg accaacttcc tcgatccgag cgacgccttc	720
ctcggcgctt cgctcgtgac cttcaagaac ggcaccgcca acgacggcct ggtcggcacc	780
tgcagttcgc acctgggcat ggtgatccgc gacaactacc ggatgaacca cctggacgag	840
gtgaaccagg tcttcggcct caccagcctg ttcgagacca gcccggtcag cgtctaccgc	900
cagcacgcca accgcctgaa gaacgccagc ctgtag	936

<210> 20

<211> 936

5 <212> ADN

<213> Fragmento del gen de la monoacil glicérido lipasa de *M.smegmatis*

<400> 20

ES 2 713 526 T3

atgaagaaga agtctctgct cccctcggc ctggccatcg gtctcgctc tctcgctgcc	60
agccctctga tccaggccag cacctacacc cagaccaaat accccatcgt gctggcccac	120
ggcatgctcg gcttcgacaa catcctcggg gtcgactact ggttcggcat tcccagcgcc	180
ttgcgccgtg acggtgccca ggtctacgtc accgaagtca gccagttgga cacctcggaa	240
gtccgcgcg agcagttgct gcaacagggt gaggaatcg tcgccctcag cggccagccc	300
aaggtaacc tgatcggcca cagccacggc gggccgacca tccgctacgt cgccgcccga	360
cgtcccgacc tgatcgcttc cggcaccagc gtcggcgccc cgcacaaggg ttccggacacc	420
gccgacttcc tgcgccagat cccaccgggt tcggccggcg aggcagtcct ctccgggctg	480
gtcaacagcc tcggcgcgct gatcagcttc cttccagcg gcagcaccgg tacgcagaat	540
tcactgggct cgctggagtc gctgaacagc gagggtgccg cgcgcttcaa cgccaagtac	600
ccgcagggca tcccacctc ggcctcgggc gaaggcgctt acaagggtcaa cggcgtgagc	660
tattactcct ggagcgggtc ctcccgctg accaacttcc tcgatccgag cgacgccttc	720
ctcggcgctt cgtcgctgac cttcaagaac ggcaccgcca acgacggcct ggtcggcacc	780
tgcagttcgc acctgggcat ggtgatccgc gacaactacc ggatgaacca cctggacgag	840
gtgaaccagg tcttcggcct caccagcctg ttcgagacca gcccggtcag cgtctaccgc	900
cagcacgcca accgcctgaa gaacgccagc ctgtag	936

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de producción de un éster alquílico de ácido graso usando *Rhodococcus opacus*, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
- 5 (a) cultivar *Rhodococcus opacus* que tiene la capacidad de producir aceite y transformado con un primer gen que codifica una triacilglicerol lipasa y un segundo gen que codifica una monoacilglicerol lipasa, produciendo así aceite;
- (b) inducir la autólisis del aceite producido en *Rhodococcus opacus* para producir un ácido graso libre, en el que la autólisis es llevada a cabo en *Rhodococcus opacus* mediante la triacil glicerol lipasa y la monoacil glicerol lipasa; y
- 10 (c) agregar un alcohol al ácido graso libre producido y hacer reaccionar el alcohol con el ácido graso libre para producir un éster alquílico de ácido graso,
- en el que el primer gen comprende la SEQ ID NO: 19, y el segundo gen comprende el gen de la lipasa MAG de *M. smegmatis* producido por amplificación por PCR de ADN genómico de *M. smegmatis* con los cebadores de la SEQ ID NO: 13 y la SEQ ID NO: 14 de acuerdo con el Ejemplo 2.
- 15 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el cultivo en la etapa (a) se lleva a cabo en un medio que contiene una fuente de nitrógeno limitada.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el ácido graso libre es un ácido graso saturado o insaturado.
4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que el ácido graso libre se selecciona del grupo que consiste en ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolénico, ácido palmitoleico, ácido ricinoleico, ácido vaccénico, ácido gadoleico, ácido araquidónico, EPA (ácido 5, 8,11,14,17-eicosapentaenoico), ácido erúcico, DHA (4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico), ácido butírico, ácido caproico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido araquídico, ácido behénico y ácido lignocérico.
- 20 5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el ácido graso libre se sustituye con un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en un grupo de anillo aromático, un grupo epoxi, un grupo ciano y un grupo halógeno.
- 25 6. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la reacción en la etapa (c) se lleva a cabo a 80-120 °C durante 1-24 horas.

FIG. 1

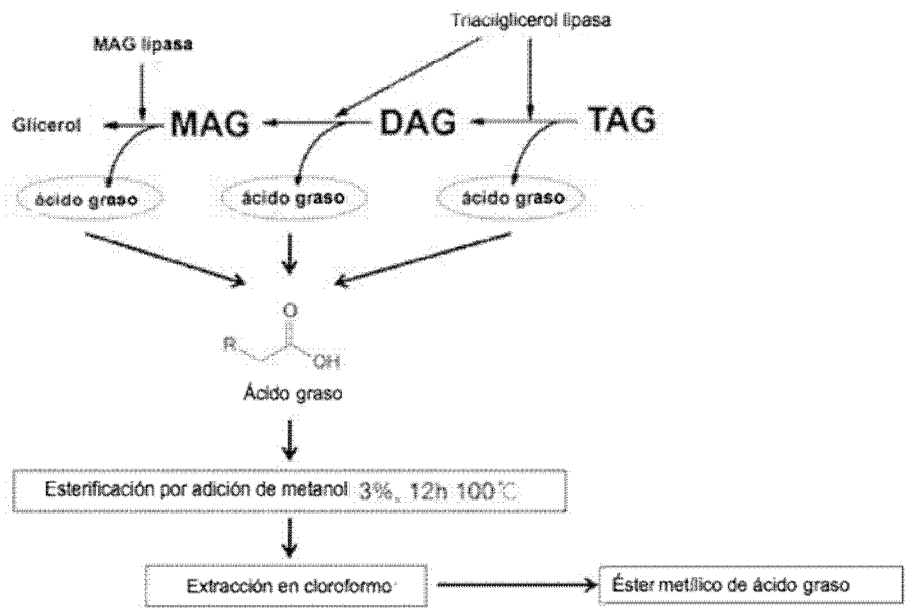


FIG. 2

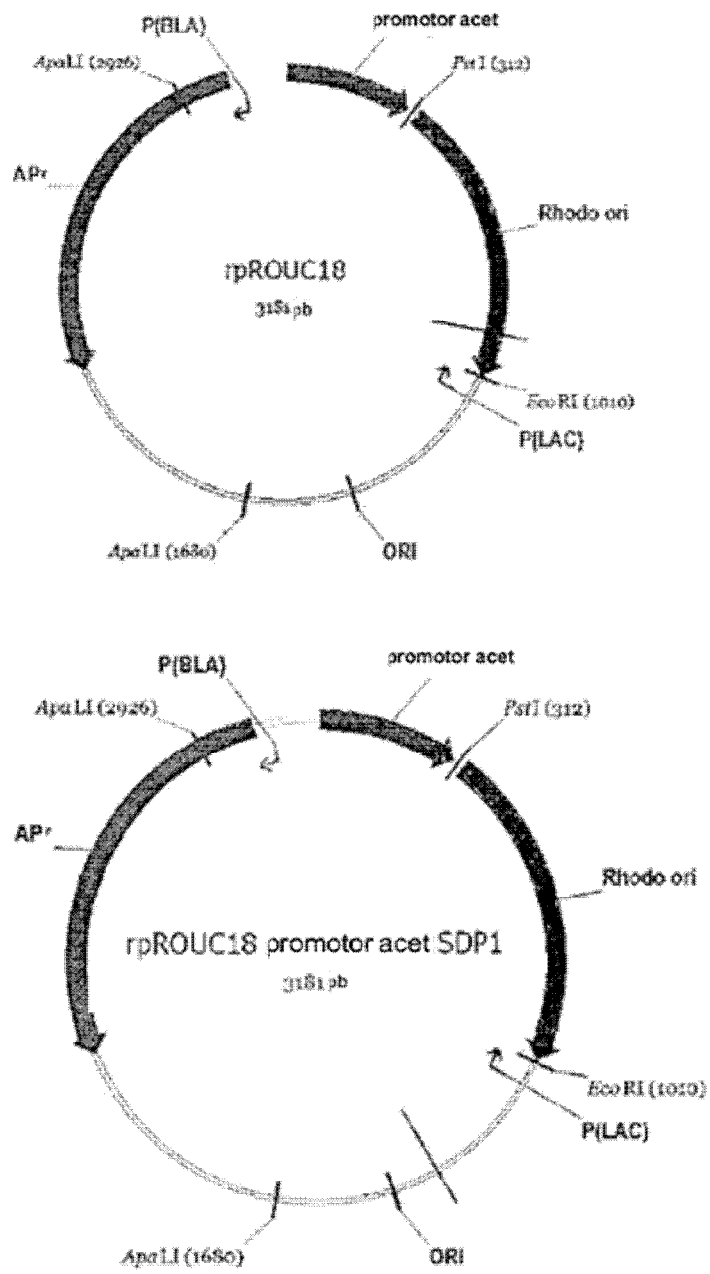


FIG. 3

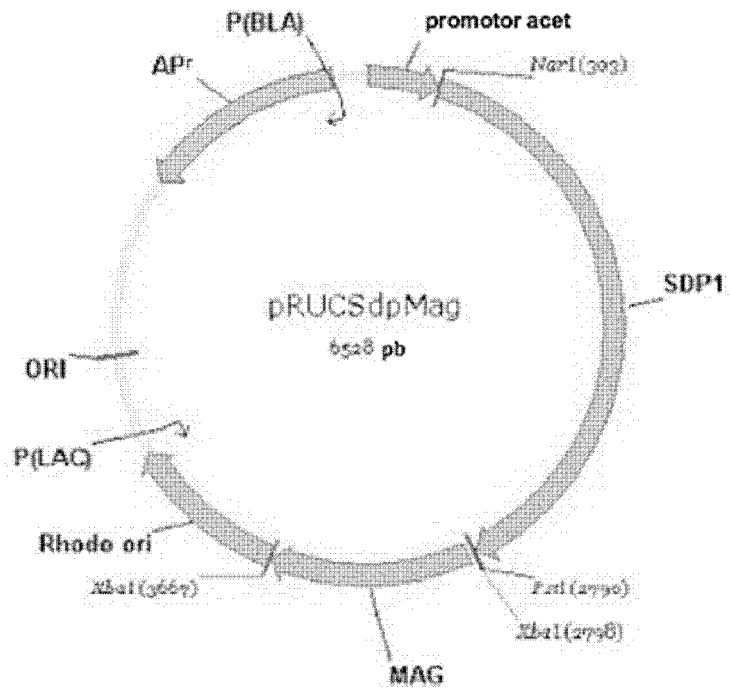




FIG. 4

Cepa o plásmido	Característica(s) relevante(s)
<i>R. opacus</i> cepa PD630	
rpROUC18	Ap <sup>r</sup> ; <i>Rhodococcus rhodochrous</i> origen; <i>Mycobacterium smegmatis</i> promotor inducible por acetamida
rpROUC18KM	Ap <sup>r</sup> ; marcador resistente Km del plásmido; <i>Rhodococcus rhodochrous</i> origen; <i>Mycobacterium smegmatis</i> promotor inducible por acetamida; AatII
rpROUC18KM_Ara	Ap <sup>r</sup> ; <i>Arabidopsis thaliana</i> TAG lipasa; NcoI, PstI
rpROUC18_Af7G	Ap <sup>r</sup> ; <i>Aspergillus fumigatus</i> TAG 7G lipasa; AatII, XmaI
rpROUC18_PAO	Ap <sup>r</sup> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> TAG lipasa; AatII, HindIII
rpROUC18KM_MAG	Ap <sup>r</sup> ; <i>M. smegmatis</i> MAG lipasa; NarI, PstI
rpROUC18KM_Ara_MAG	Ap <sup>r</sup> ; <i>A. thaliana</i> TAG lipasa; NcoI, PstI; <i>M. smegmatis</i> MAG lipasa; NarI, PstI
rpROUC18_Af7G_MAG	Ap <sup>r</sup> ; <i>A. fumigatus</i> TAG 7G lipasa; AatII, XmaI; <i>M. smegmatis</i> MAG lipasa; PCR de superposición; SacI
rpROUC18_PAO_MAG	Ap <sup>r</sup> ; <i>P. aeruginosa</i> TAG lipasa; AatII, HindIII; <i>M. smegmatis</i> MAG lipasa; SacI

FIG. 5

Concentración de ácidos grasos libres en medio de cultivo (g/l)									
Cepas	13:0	14:0	15:0	16:0	17:0	18:0	20:0	22:0	Totales(g/l)
<i>Rhodococcus opacus</i>	-	-	0,0688	-	0,0109	0,0537	-	0,2234	0,3569
cepa PDG30									
<i>R. opacus</i> _RHOUC18M_Ara	-	-	-	-	-	0,6719	0,0331	-	0,708
<i>R. opacus</i> _RHOUC18_Ara	-	0,138	-	0,114	-	0,335	-	-	0,587
<i>R. opacus</i> _RHOUC18_PAO	-	-	0,347	-	-	0,3324	-	-	0,680
<i>R. opacus</i> _RHOUC18M_MAG	-	-	-	-	-	0,353	0,156	-	0,509
<i>R. opacus</i> _RHOUC18M_Ara_MAG	-	-	0,219	-	-	0,738	0,160	-	1,116
<i>R. opacus</i> _RHOUC18_Ara_MAG	-	-	0,297	-	-	0,669	-	-	0,966
<i>R. opacus</i> _RHOUC18_PAO_MAG	-	-	-	0,676	0,423	-	-	-	1,099

FIG. 6

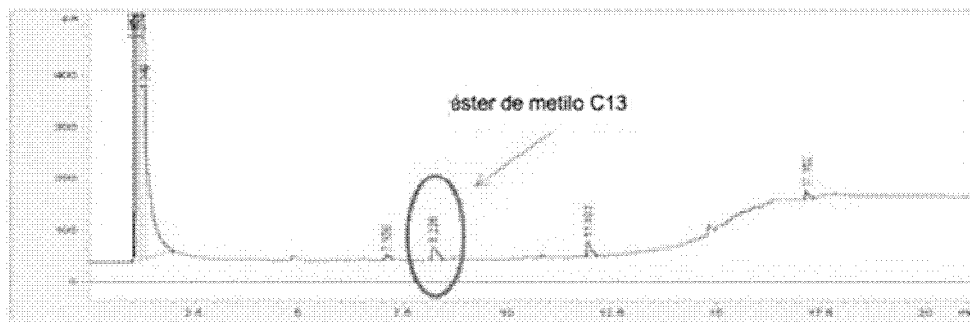


FIG. 7

Concentraciones de FAME producida de ácidos grasos libres en medio de cultivo (g/l)									
Cepas	13:0	14:0	15:0	16:0	17:0	18:0	20:0	22:0	Total(g/L.)
<i>Rhodococcus opacus</i> cepa PD630	-	-	-	-	0,171	-	-	-	0,171
<i>R. opacus</i> _rpROUC18KM _Ara	-	0,153	-	0,214	-	-	-	-	0,367
<i>R. opacus</i> _rpROUC18 _AF7G	-	-	-	0,066	0,053	-	-	-	0,119
<i>R. opacus</i> _rpROUC18 _PAO	-	-	0,173	-	-	-	0,052	-	0,225
<i>R. opacus</i> _rpROUC18KM _MAG	-	-	-	-	-	-	0,210	-	0,210
<i>R. opacus</i> _rpROUC18KM _Ara_MAG	0,204	0,327	-	-	-	-	-	-	0,525
<i>R. opacus</i> _rpROUC18 _AF7G_MAG	-	0,236	-	0,195	-	-	-	-	0,431
<i>R. opacus</i> _rpROUC18 _PAO_MAG	-	0,098	0,081	0,126	0,055	0,180	-	-	0,539