

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 746 074**

51 Int. Cl.:

**C11B 1/02** (2006.01)

**C12P 7/64** (2006.01)

**H01B 3/22** (2006.01)

**H01F 27/12** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.11.2011 PCT/US2011/059224**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2012 WO12061647**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.11.2011 E 11785851 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 2635663**

54 Título: **Aceites microbianos con puntos de fluidez reducidos, fluidos dieléctricos producidos a partir de estos y métodos relacionados**

30 Prioridad:

**13.10.2011 US 201161546932 P**

**10.08.2011 US 201161522231 P**

**02.02.2011 US 201161438966 P**

**03.11.2010 US 409902 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**04.03.2020**

73 Titular/es:

**CORBION BIOTECH, INC. (100.0%)**

**One Tower Place, 600**

**South San Francisco, CA 94080, US**

72 Inventor/es:

**FRANKLIN, SCOTT;**

**LU, WENHUA;**

**RAKITSKY, WALTER;**

**RODRIGUEZ, FELIPE ARANA;**

**RUDENKO, GEORGE;**

**WEE, JANICE y**

**ZHAO, XINHUA**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 746 074 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

Aceites microbianos con puntos de fluidez reducidos, fluidos dieléctricos producidos a partir de estos y métodos relacionados

5

Campo de la invención

**[0001]** La presente invención se refiere a un fluido dieléctrico que comprende aceite microbiano y a un componente eléctrico que comprende el fluido dieléctrico.

10

Antecedentes

**[0002]** "Combustible fósil" es una expresión general para referirse a yacimientos geológicos de materiales orgánicos combustibles enterrados, formados a partir de animales y plantas en estado de descomposición que se han convertido en petróleo bruto, carbón, gas natural o aceites densos por exposición a calor y presión en la corteza terrestre durante cientos de millones de años. Los combustibles fósiles son una fuente no renovable finita

15

**[0003]** Muchas industrias, incluidos los fabricantes de plásticos y productos químicos, dependen en gran medida de la disponibilidad de hidrocarburos como materia prima para sus procesos de fabricación.

20

**[0004]** La publicación de PCT n.o 2008/151149 describe métodos y materiales para cultivar microalgas con el fin de producir de aceite, extraer aceite microbiano y producir alimentos, aceite alimentario, combustibles y otros productos oleoquímicos a partir de aceite producido por microbios oleaginosos.

25

**[0005]** Una aplicación oleoquímica importante es la producción de fluidos dieléctricos industriales, que se emplean para el aislamiento eléctrico y el enfriamiento o la disipación de calor en transformadores y otros dispositivos eléctricos. Estos dispositivos eléctricos incluyen transformadores de potencia y distribución, disyuntores, condensadores, conmutadores, máquinas de rayos X y cables aislantes.

30

**[0006]** Desde la década de 1990 se han empleado los aceites de origen biológico, particularmente el aceite de soja con un alto contenido de ácido oleico, en transformadores sellados (remítase a Srivastava (2009) Int'l J Computer Electrical Eng, v. 1(2) pp. 212-216). Los fluidos dieléctricos de origen biológico actuales son triacilgliceroles (TAG) con un alto contenido de ácido oleico purificados y con aditivos incorporados (remítase a la patente de EE. UU. N.o 6.274.067 y las solicitudes de patente de EE. UU. con N.os 20100243969 y 20080283803). Por ejemplo, las principales ventajas del fluido dieléctrico derivado de aceite de soja con un alto contenido de ácido oleico frente al fluido dieléctrico derivado de aceite mineral son (i) un punto de combustión mayor (2x), (ii) una vida útil del transformador mayor (4-8x), y (iii) unos costos menores asociados con el saneamiento de fugas debido a la elevada biodegradabilidad de los aceites de origen biológico (>3x) y a su menor toxicidad (remítase a Schneider (2006) J Sci Food Agric, v. 86 págs. 1769-1780).

35

**[0007]** Los principales inconvenientes de los aceites de origen biológico frente a los aceites de origen mineral son la inestabilidad oxidativa de los aceites de origen biológico, unos costos mayores asociados con la adquisición de aceites de origen biológico y la transición del equipo de aceites de origen mineral a aceites de origen biológico, remítase a Schneider (2006), supra). Aunque los fluidos dieléctricos de origen biológico ocupen una porción significativa del mercado de fluidos dieléctricos, en la actualidad los fluidos dieléctricos derivados de aceite mineral dominan el mercado. Otros inconvenientes importantes son los costos de producción de estos aceites derivados de la soja y su desvío de una fuente importante de alimentos a aplicaciones no alimentarias.

45

50 RESUMEN

**[0008]** En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona aceites microbianos con un punto de fluidez mejorado, métodos para preparar tales aceites y productos derivados de estos. El punto de fluidez es una función de las concentraciones relativas de ácidos grasos saturados respecto a insaturados del aceite triglicérido y la longitud de la cadena de los ácidos grasos. En realizaciones de los métodos de la invención, el punto de fluidez inicial del aceite microbiano se reduce reduciendo la proporción relativa de la fracción saturada, incluidos los triglicéridos palmíticos y estearícos conocidos como la fracción estearínica. De acuerdo con estos métodos, el aceite se fracciona para reducir la concentración de triglicéridos saturados del aceite. Esto se puede conseguir de acuerdo con realizaciones de la invención mediante el fraccionamiento en seco, un proceso ilustrativo para llevar a cabo la "winterización". En una realización de este método, el aceite microbiano (p. ej., algáceo) primero se refina, se decolora, se desodoriza o desgoma opcionalmente para producir "aceite RBD" que se caracteriza por un punto de fluidez inicial. Posteriormente se reduce la temperatura del aceite RBD de una forma controlada hasta que se forman núcleos cristalinos y a continuación se mantiene a dicha primera temperatura de cristalización (es decir, durante varias horas) para producir cristales. Los cristales se retiran posteriormente mediante filtración para producir dos fracciones: una fase sólida que contiene parte o gran parte de la fracción estearínica y una fase líquida que contiene la mayor parte de la fracción

60

65

oleínica. Esta fase líquida se caracteriza por un segundo punto de fluidez que es menor que el punto de fluidez inicial, p. ej., el segundo punto de fluidez puede estar comprendido entre aproximadamente -10 °C y aproximadamente -40 °C, y la composición de ácidos grasos de la fase líquida puede ser de al menos un 50% de C18:1 y menos de un 10% de C18:2. La fase líquida se puede someter nuevamente a fraccionamiento hasta una segunda temperatura de cristalización menor para conseguir eliminar más estearina. En realizaciones ilustrativas, la primera temperatura de cristalización está comprendida entre más de 15 °C y aproximadamente 50 °C, y la segunda temperatura de cristalización está comprendida entre aproximadamente -15 °C y aproximadamente 15 °C.

**[0009]** En cualquier caso, la fracción líquida purificada resultante, que es equivalente o muy similar a un aceite conocido habitualmente en la industria del aceite vegetal como superoleína, tiene unas propiedades térmicas mejores que las del aceite algáceo natural. En algunas realizaciones, las propiedades se mejoran además añadiendo un depresor del punto de fluidez químico que reduce el punto de fluidez aún más, como puede que se desee para aplicaciones específicas. El aceite microbiano proporcionado mediante este método no se puede emplear únicamente en aplicaciones alimentarias, sino también en aplicaciones industriales, tales como la producción de lubricantes, fluidos hidráulicos, aceites industriales y fluidos dieléctricos. Para las aplicaciones industriales (p. ej., fluidos dieléctricos), uno o más aditivos que se pueden añadir al aceite microbiano (además de un depresor del punto de fluidez o en vez de este) incluyen: un antioxidante, desactivador de iones metálicos, desemulsionante, aditivo antidesgaste o compuesto antihidrólisis.

**[0010]** En varias realizaciones, el aceite microbiano se deriva de microbios oleaginosos, tales como células microalgáceas, con perfiles lipídicos característicos (es decir, perfiles de ácidos grasos característicos), que incluyen células recombinantes que expresan genes exógenos los cuales codifican proteínas tales como una o más acil graso-ACP-tioesterasas. En realizaciones ilustrativas, el aceite microbiano se deriva de un microbio transgénico modificado genéticamente para que exprese uno o más genes exógenos, y el método incluye además cultivar el microbio hasta que este tenga al menos un 10% de aceite en peso seco y separar el aceite del microbio para producir un aceite microbiano que posteriormente se puede refinar, decolorar, desodorizar y opcionalmente desgomar, tal como se ha descrito anteriormente. También se pueden emplear otros microbios oleaginosos, incluidos levaduras, hongos y bacterias, con perfiles lipídicos similares o diferentes. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la presente invención proporciona métodos para la síntesis de lípidos y productos a base de aceite, incluidos fluidos dieléctricos, a partir de tales microbios microalgáceos y/o oleaginosos, incluidos levaduras, hongos y bacterias.

**[0011]** En ciertas realizaciones, la invención proporciona un producto que incluye un aceite microbiano, donde el aceite microbiano tiene un punto de fluidez comprendido entre aproximadamente 10 °C y aproximadamente -40 °C, y donde la composición de ácidos grasos del aceite microbiano es de al menos aproximadamente un 50% de C18:1 y menos de aproximadamente un 10% de C18:2. En variaciones de estas realizaciones, el producto tiene un punto de fluidez comprendido entre -10 °C y aproximadamente -40 °C. El aceite microbiano en el producto puede incluir, por ejemplo, al menos aproximadamente un 60%, al menos aproximadamente un 70% o al menos aproximadamente un 80% de C18:1. En algunos casos, el aceite microbiano puede incluir menos de aproximadamente un 5% de C18:2 (p. ej., tiene al menos aproximadamente un 80% de C18:1 y menos de aproximadamente un 5% de C18:2). En realizaciones particulares, el aceite microbiano en el producto tiene un índice de yodo comprendido entre aproximadamente 25 y aproximadamente 200. En ciertas realizaciones, el aceite microbiano puede ser producido por un microbio transgénico modificado genéticamente para que exprese uno o más genes exógenos. Los microbios ilustrativos a estos efectos incluyen especies del género *Prototheca* o *Chlorella* (p. ej., *Prototheca moriformis*). Tales microbios se pueden modificar genéticamente para que expresen, por ejemplo, uno o más genes exógenos que codifican sacarosa-invertasa y/o acil graso-ACP-tioesterasa. En realizaciones ilustrativas, se modifica genéticamente un microbio para que exprese genes exógenos que codifican dos o más acil graso-ACP-tioesterasas, o sacarosa-invertasa y una o más acil graso-ACP-tioesterasa.

**[0012]** En varias realizaciones, el producto incluye uno o más aditivos, tales como un antioxidante, un desactivador de iones metálicos, un inhibidor de la corrosión, un desemulsionante, un aditivo antidesgaste, un depresor del punto de fluidez o un compuesto antihidrólisis. Los productos ilustrativos incluyen un lubricante, un fluido hidráulico, un aceite industrial o un fluido dieléctrico. Los fluidos dieléctricos, en particular, pueden contener uno o más de los aditivos indicados anteriormente.

**[0013]** En algunos casos, el producto a base de aceite microbiano es un fluido dieléctrico. En algunas realizaciones, el aceite microbiano empleado en el fluido dieléctrico tiene uno o más de los siguientes atributos: (i) menos de 0.4 microgramos/mL de contenido total de carotenoides; (ii) menos de 0.001 microgramos/mL de licopeno; (iii) menos de 0.02 microgramos/mL de beta-caroteno; (iv) menos de 0.02 miligramos de clorofila por kilogramo de aceite; (v) 0.40-0.60 miligramos de gamma-tocoferol por 100 gramos de aceite; (vi) 3-9 mg de campesterol por 100 gramos de aceite; o (vii) menos de 0.5 miligramos de contenido total de tocotrienoles por gramo de aceite. En algunos casos, el fluido dieléctrico tiene una o más de una de las siguientes propiedades: viscosidad a 40 °C menor de aproximadamente 110 cSt, p. ej., en el rango de 20 a 30 cSt; (b) viscosidad a 100 °C en el rango de aproximadamente 2 a aproximadamente 15 cSt, p. ej., 4-8 cSt; (c) un índice de viscosidad (IV, un número sin unidades) a 40 °C de al menos 35, incluidos, sin carácter limitante, un IV comprendido entre 35 y 80, un IV comprendido entre 80 y 110, un IV comprendido entre 110 y 125, un IV comprendido entre 125 y 160, y, en algunas realizaciones, un IV superior a 160; (d) un punto de fluidez

(la temperatura más baja a la que fluye el líquido) comprendida entre -8 y 10 °C o inferior, incluidos, sin carácter limitante, un punto de fluidez comprendido entre -20 y -25 °C o inferior, y, en algunas realizaciones, un punto de fluidez de -30 °C o -40 °C, o inferior; (e) lubricidad equivalente a D2882 de la ASTM; (f) volatilidad baja; (g) un punto de inflamación elevado, incluido un punto de inflamación mayor o igual a 150 °C, incluido un punto de inflamación mayor o igual a 300 °C; (h) un punto de combustión mayor o igual a 150 °C (p. ej., superior a 300 °C), incluido un punto de inflamación mayor o igual a 300 °C; (i) reactividad baja, incluida la resistencia a la descomposición en presencia de ácidos y bases, buena estabilidad térmica, susceptibilidad a reaccionar con oxígeno baja y un índice de neutralización bajo (menor o igual a 0.06, por ejemplo, menor o igual a 0.03); (j) buena miscibilidad, incluida una desemulsionabilidad baja; (k) un factor de potencia a 25 °C mayor o igual a un 1%, incluidos, sin carácter limitante, menor o igual a un 0.5%, menor o igual a un 0.15%, menor o igual a un 0.1%, y, en algunas realizaciones, menor o igual a un 0.05%; (l) un factor de potencia a 100 °C menor o igual a un 1.5%, incluidos, sin carácter limitante, menor o igual a un 1%, menor o igual a un 0.3%, y, en algunas realizaciones, menor o igual a un 0.1%; (m) una rigidez dieléctrica alta; (n) un factor de disipación bajo; (o) una conductividad eléctrica baja; (p) calor específico elevado, incluidos, sin carácter limitante, un calor específico de al menos 0.39 cal/gm/°C, y, en algunas realizaciones, un calor específico de al menos 0.45 cal/gm/°C o superior; y (q) es biodegradable, es decir, se descompone en dióxido de carbono y agua en presencia de microbios, de modo que se degrade al menos un 15% o más del fluido dieléctrico en condiciones de prueba estándar en 28 días, y en algunas realizaciones, un 30% o más, o un 70% o más, o un 100% en estas condiciones.

**[0014]** La invención también proporciona un componente eléctrico que incluye el fluido dieléctrico descrito anteriormente. En ciertas realizaciones, el componente eléctrico es un transformador.

**[0015]** La invención proporciona además un método para producir un producto que incluye un aceite microbiano. En ciertas realizaciones, el producto tiene un punto de fluidez comprendido entre aproximadamente -10 °C y aproximadamente -40 °C, y en este la composición de ácidos grasos del aceite microbiano es de al menos un 50% de C18:1 y menos de un 10% de C18:2. En tales realizaciones, el método incluye cultivar un microbio transgénico modificado genéticamente para que exprese uno o más genes exógenos hasta que el microbio contenga al menos un 10% de aceite en peso seco y a continuación separar el aceite del microbio. El aceite microbiano se somete posteriormente a refinación, decoloración, desodorización y opcionalmente desgomación para producir aceite RBD. El método puede incluir, opcionalmente, añadir un antioxidante, un desactivador de iones metálicos, un inhibidor de la corrosión, desemulsionante, aditivo antidesgaste, depresor del punto de fluidez o compuesto antihidrólisis al aceite RBD. Los microbios ilustrativos modificados genéticamente pueden incluir especies del género *Prototheca* o *Chlorella* (p. ej., *Prototheca moriformis*). Tales microbios se pueden modificar genéticamente para que expresen, por ejemplo, uno o más genes exógenos que codifican sacarosa-invertasa y/o acil graso-ACP-tioesterasa. En realizaciones ilustrativas, se modifica genéticamente un microbio para que exprese genes exógenos que codifican dos o más acil graso-ACP-tioesterasas, o sacarosa-invertasa y una o más acil graso-ACP-tioesterasa.

**[0016]** En una realización, la presente invención proporciona un método para preparar un fluido dieléctrico, comprendiendo el método los siguientes pasos: (a) cultivar un microbio oleaginoso para proporcionar un microbio oleaginoso que contenga al menos un 10% de lípido en peso seco, (b) separar el lípido del microbio oleaginoso, y (c) someter el lípido a al menos un paso de procesamiento seleccionado entre el grupo constituido por refinación, decoloración, desodorización, desgomación y fraccionamiento mediante cristalización o fraccionamiento en seco o por winterización.

**[0017]** En realizaciones específicas del método, el microbio oleaginoso se selecciona del grupo constituido por microalgas, levaduras oleaginosas, hongos oleaginosos y bacterias oleaginosas. En algunos casos, el microbio oleaginoso es una bacteria oleaginoso que es *Rhodococcus opacus*. En algunos casos, el microbio oleaginoso es un hongo oleaginoso. En algunos casos, el hongo oleaginoso es una especie enumerada en la Tabla 3. En algunos casos, el microbio oleaginoso es una levadura oleaginoso. En algunos casos, la levadura oleaginoso es una especie enumerada en la Tabla 2. En algunos casos, el microbio oleaginoso es una microalga. En algunos casos, la microalga es una especie enumerada en la Tabla 1. En algunos casos, la microalga es del género *Prototheca*.

**[0018]** En algunas realizaciones, el fluido dieléctrico producido mediante el método tiene uno o más de los siguientes atributos: (i) 0.05-0.244 mcg/g de contenido total de carotenoides; (ii) menos de 0.003 mcg/g de licopeno; (iii) menos de 0.003 mcg/g de beta-caroteno; (iv) 0.045-0.268 mcg/g de clorofila A; (v) 38.3-164 mcg/g de gamma-tocoferol; (vi) menos de un 0.25% de brasicasterol, campesterol, estignasterol o beta-sitosterol; (vii) 249.6-325.3 mcg/g de contenido total de tocotrienoles; (viii) 0.003-0.039 mcg/g de luteína; y (ix) 60.8-261.7 mcg/g de tocoferoles. En algunas realizaciones, el fluido dieléctrico producido mediante el método tiene una propiedad seleccionada del grupo constituido por: (a) viscosidad a 40 °C menor de aproximadamente 110 cSt, p. ej., en el rango de 20 a 30 cSt; (b) viscosidad a 100 °C en el rango de aproximadamente 2 a aproximadamente 15 cSt, p. ej., 4-8 cSt; (c) un índice de viscosidad a 40 °C de al menos 35; (d) un punto de fluidez comprendido entre -8 y -10 °C o inferior, incluido entre -15 y -25 °C o inferior; (e) lubricidad equivalente a D2882 de la ASTM; (f) un punto de inflamación mayor o igual a 150 °C; (g) un índice de neutralización menor o igual a 0.06; (h) un factor de potencia a 25 °C menor o igual a un 1%; (i) un calor específico de al menos 0.39 cal/gm/°C; y (j) biodegradabilidad, de modo que al menos un 15% o más del fluido dieléctrico se degrade en condiciones de prueba estándar en 28 días.

**[0019]** En algunos casos, el fluido dieléctrico se mezcla con uno o más de los siguientes aditivos: (a) un antioxidante;

(b) un desactivador de iones metálicos; (c) un inhibidor de la corrosión; (d) un desemulsificante; (e) un aditivo antidesgaste; (f) un copolímero de malan-estireno; (g) un depresor del punto de fluidez, incluidos, sin carácter limitante, VISCOPLEX® 10-310 o 1-133 (Rohmax-Evonik Additives GmbH), u otros poli(acrilatos de alquilo) y poli(metilacrilatos) tales como INFINEUM® V-351 (Infineum UK limited), PMA-D110 y PMA D; o (h) una carbodiimida; o (i) ésteres sintéticos o (j) poli(alfa-olefinas) (PAO) o (k) éster de estólidios.

**[0020]** En algunos casos, el fluido dieléctrico comprende además al menos un 65% de C18:1. En algunos casos, el fluido dieléctrico comprende además menos de un 30% de C16:0.

**[0021]** En algunas realizaciones, el aceite microbiano se mezcla con otro aceite para producir el fluido dieléctrico de acuerdo con las realizaciones de la invención. En algunos casos, el otro aceite no es un aceite microbiano. En algunos casos, el otro aceite se selecciona del grupo constituido por aceite de soja, colza, canola, palma, palmiste, coco, maíz, hortalizas de desecho, árbol del sebo, oliva, girasol, semilla del algodón, grasa de pollo, sebo bovino, sebo porcino, microalgas, macroalgas, microbios, Cuphea, lino, maní, grasa blanca de calidad, manteca, Camellina sativa, grano de mostaza, anacardo, avena, lupino, kenaf, caléndula, cáñamo, café, linaza (lino), avellana, Euphorbia, pepita de calabaza, cilantro, camelia, sésamo, cártamo, arroz, tung, cacao, copra, adormidera, semillas de ricino, pecana, jojoba, nuez de macadamia, nuez de brasil, palta, levadura oleaginosa, bacterias oleaginosa, petróleo o una fracción destilada de cualquiera de los aceites precedentes.

**[0022]** En algunas realizaciones, el contenido del otro aceite en el fluido dieléctrico es menor de un 30%. En algunos casos, el contenido del otro aceite en el fluido dieléctrico es menor de un 20%. En algunos casos, el contenido del otro aceite en el fluido dieléctrico es menor de un 10%. En algunas realizaciones, el contenido del aceite microbiano en el fluido dieléctrico es menor de un 50%. En algunos casos, el contenido del aceite microbiano en el fluido dieléctrico es menor de un 25%. En algunos casos, el contenido del aceite microbiano en el fluido dieléctrico es menor de un 10%.

**[0023]** En otra realización, la presente invención proporciona un fluido dieléctrico que comprende uno o más de los siguientes aditivos: (a) un antioxidante, incluidos, sin carácter limitante, BHT y otros fenoles; (b) un desactivador de iones metálicos tales como Cu, Zn y similares, incluido, sin carácter limitante, el benzotriazol; (c) inhibidores de la corrosión, incluidos, sin carácter limitante, los ésteres de tipo sulfonato y ésteres del ácido succínico; (d) desmulsionantes; (e) aditivos antidesgaste, incluido, sin carácter limitante, el ditiofosfato de zinc; (f) aditivos para reducir el punto de fluidez, incluidos, sin carácter limitante, los copolímeros de malan-estireno y poli(alquilacrilatos), incluidos, sin carácter limitante, los polimetacrilatos; y (g) compuestos que protegen contra la hidrólisis, incluidas, sin carácter limitante, las carbodiimidias.

**[0024]** Estas y otras realizaciones de la invención se describen en la siguiente descripción detallada y se ejemplifican en los siguientes ejemplos. Todas o algunas de las características descritas anteriormente y en toda esta solicitud se pueden combinar en diversas realizaciones de la presente invención.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

**[0025]** La invención se puede comprender haciendo referencia a la siguiente descripción junto con los dibujos adjuntos que ilustran ciertas realizaciones específicas de la presente invención.

Figura 1. Perfil de enfriamiento típico para el fraccionamiento de aceite RBD ( $T_f$  = temperatura de filtración).

Figura 2. Perfil de enfriamiento típico para el fraccionamiento de oleína algácea ( $T_f$  = temperatura de filtración).

Figura 3. Efecto de VPL 10-310 sobre el punto de fluidez de aceite algáceo y aceites fraccionados. "Aceite desodorizado" es aceite RBD; "oleína" es oleína # 1; "superoleína" es superoleína #1."

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA

**[0026]** La presente invención surge, en parte, del descubrimiento de que Prototheca y otros microorganismos oleaginosos tienen, en ciertas realizaciones, propiedades inesperadamente ventajosas para la producción de fluidos dieléctricos que anteriormente se basaban principalmente en aceites minerales.

**[0027]** La presente invención también tiene origen, en parte, en el descubrimiento de procesos de modificación de aceites microbianos para reducir su punto de fluidez. La transesterificación de lípidos proporciona ésteres de ácidos grasos de cadena larga. Otros procesos enzimáticos y químicos se pueden adaptar para obtener ácidos grasos, aldehídos, alcoholes, alcanos y alquenos. En algunas aplicaciones, se producen compuestos hidrocarbonados útiles en fluidos dieléctricos.

**[0028]** Esta descripción detallada de la invención se divide en secciones para mayor comodidad del lector. La sección I proporciona definiciones de las expresiones y los términos utilizados en la presente. La Sección II proporciona una descripción de condiciones de cultivo útiles en realizaciones de los métodos de la invención. La Sección III proporciona una descripción de materiales y métodos de ingeniería genética. La Sección IV proporciona una descripción de la

ingeniería genética de microbios para permitir la utilización de sacarosa, con referencia específica a microalgas, tal como ejemplifica Prototheca. La Sección V proporciona una descripción de la ingeniería genética para modificar la biosíntesis de lípidos. La Sección VI describe métodos para preparar aceites microbianos de realizaciones de la invención y productos derivados de estos, tales como fluidos dieléctricos. La Sección VII describe ejemplos que ilustran las diversas realizaciones de la invención.

## I. DEFINICIONES

**[0029]** Todas las expresiones y los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el significado que habitualmente sobreentenderá un experto en la técnica a la cual pertenece esta invención, a menos que se definan de otro modo. Las siguientes referencias proporcionan a un experto una definición general de muchos de los términos y expresiones empleados en esta invención: Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2.a ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5.a Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991); y Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991). Los siguientes términos y expresiones, tal como se utilizan en la presente, tienen los significados que se les atribuyen a menos que se especifique lo contrario.

**[0030]** La expresión "activo en microalgas" se refiere a un ácido nucleico que es funcional en microalgas. Por ejemplo, un promotor que se ha utilizado para hacer que un gen de resistencia a antibióticos confiera resistencia a antibióticos a una microalga transgénica es activo en microalgas.

**[0031]** La expresión "proteína portadora de acilo" o "ACP" se refiere a una proteína que se une a una cadena de acilo en crecimiento durante la síntesis de un ácido graso como un éster tiólico en el tiol distal del resto 4'-fosfopanteteína y comprende un componente del complejo de la ácido graso-sintasa.

**[0032]** La expresión "molécula acil-CoA" o "acil-CoA" se refiere a una molécula que comprende un resto acilo unido covalentemente a coenzima A mediante un enlace de tipo éster tiólico en el tiol distal del resto 4'-fosfopanteteína de la coenzima A.

**[0033]** El término "antioxidante" se refiere a una molécula que es capaz de inhibir la oxidación de otras moléculas. Es habitual añadir antioxidantes a los productos industriales. Un uso común es como estabilizantes en combustibles y lubricantes para prevenir la oxidación, y en gasolinas para prevenir la polimerización que conduce a la formación de residuos que ensucian el motor. También se usan habitualmente para prevenir la degradación oxidativa de polímeros, tales como cauchos, plásticos y adhesivos, que provoca una pérdida de resistencia y flexibilidad en estos materiales.

**[0033]** La expresión "compuesto antihidrólisis" se refiere a una molécula que inhibe la descomposición de un compuesto químico por reacción con agua. Las carbodiimidas, por ejemplo, se pueden emplear como compuestos antihidrólisis. Los compuestos antihidrólisis se pueden adquirir de proveedores comerciales, p. ej., SpecialChem, entre otros.

**[0034]** El "compuesto anti-hidrólisis" es una molécula que inhibe la descomposición de un compuesto químico por reacción con agua. Las carbodiimidas, por ejemplo, pueden emplearse como compuestos anti-hidrólisis. Los compuestos anti-hidrólisis están disponibles comercialmente, p. de SpecialChem, entre otros.

**[0035]** El "aditivo antidesgaste" es un aditivo para un fluido (por ejemplo, un aceite lubricante) que da como resultado una vida útil más larga de la máquina debido a una mayor resistencia al desgaste y a las marcas de los componentes. Los aditivos antidesgaste evitan el contacto directo de metal a metal entre las partes de la máquina cuando la película de aceite se descompone. Típicamente, el aditivo reacciona con el metal en la superficie de la pieza y forma una película, que puede deslizarse sobre la superficie de fricción. Los aditivos antidesgaste suelen contener compuestos de zinc y fósforo. Los ejemplos de aditivos antidesgaste incluyen ditiofosfato de zinc (ZDP), dialquil ditio fosfato de zinc (ZDDP, también actúa como inhibidor de la corrosión y antioxidante), fosfato de tricresilo (TCP, utilizado para operaciones a altas temperaturas), halocarbonos (parafinas cloradas, para operaciones de presión extrema), monooleato de glicerol, ácido esteárico (que se adhiere a las superficies mediante un proceso de adsorción reversible bajo 150 ° C, útil para condiciones de contacto leves).

**[0036]** La expresión "porcentaje de área" se refiere al área de picos observados utilizando métodos de detección por FAME GC/FID en los que cada ácido graso en la muestra se convierte en un éster metílico de ácido graso (FAME) antes de la detección. Por ejemplo, se observa un pico separado para un ácido graso de 14 átomos de carbono sin insaturación (C14:0) en comparación con cualquier otro ácido graso tal como C14:1. El área de pico para cada clase de FAME es directamente proporcional a su composición porcentual en la mezcla y se calcula en función de la suma de todos los picos presentes en la muestra (es decir, [área bajo un pico específico/área total de todos los picos medidos] X 100). Cuando se hace referencia a perfiles lipídicos (de ácidos grasos) de aceites y células descritos en la presente, la expresión "al menos un 4% de C8-C14" quiere decir que al menos un 4% de los ácidos grasos totales en la célula o en la composición glicerolípida extraída tiene una longitud de cadena que incluye 8, 10, 12 o 14 átomos de carbono.

- [0037]** El término "axénico" se refiere a un cultivo de un organismo que no está contaminado por otros organismos vivos.
- 5 **[0038]** El término "biodiésel" se refiere a un éster alquílico de ácido graso producido biológicamente adecuado para emplear como combustible en un motor diésel.
- [0039]** El término "biomasa" se refiere al material producido por el crecimiento y/o la propagación de células. La biomasa puede contener células y/o componentes intracelulares, así como también material extracelular, que incluye, sin carácter limitante, los compuestos secretados por una célula.
- 10 **[0040]** El término "biorreactor" se refiere a un espacio cerrado o parcialmente cerrado en el que se cultivan las células, opcionalmente en suspensión.
- 15 **[0041]** La expresión "voltaje de ruptura" de un fluido dieléctrico es el voltaje en el que el fluido dieléctrico pierde sus propiedades aislantes.
- [0042]** El término "catalizador" se refiere a un agente, tal como una molécula o complejo macromolecular, capaz de facilitar o fomentar una reacción química de un reactivo para obtener un producto sin que llegue a formar parte del producto. Un catalizador incrementa la velocidad de una reacción, después de lo cual, el catalizador puede actuar sobre otro reactivo para formar el producto. Un catalizador generalmente reduce la energía de activación global requerida para la reacción, de modo que esta se produce más rápido o a una temperatura inferior. Por lo tanto, se puede alcanzar un equilibrio de reacción más rápidamente. Los ejemplos de catalizadores incluyen enzimas, que son catalizadores biológicos; calor, que es un catalizador no biológico; y metales utilizados en procesos de refinación del petróleo fósil.
- 20 **[0043]** La expresión "material celulósico" es el producto de la digestión de celulosa, incluidas la glucosa y xilosa, y opcionalmente compuestos adicionales tales como disacáridos, oligosacáridos, lignina, furfurales y otros compuestos. Los ejemplos no limitantes de fuentes de material celulósico incluyen bagazos de la caña de azúcar, pulpa de la remolacha azucarera, forraje del maíz, virutas de madera, serrín y pasto varilla.
- 30 **[0044]** El término "cocultivo" y sus variantes, tales como "cocultivar" y "cofermentar", se refieren a la presencia de dos o más tipos de células en el mismo biorreactor. Los dos o más tipos de células pueden ser microorganismos, tales como microalgas, o pueden ser una célula microalgácea cultivada con un tipo de célula diferente. Las condiciones de cultivo pueden ser aquellas que estimulan el crecimiento y/o la propagación de tales tipos de células, o aquellas que facilitan el crecimiento y/o la proliferación de una de tales células o de un subconjunto de estas, manteniendo el crecimiento celular para el resto.
- 35 **[0045]** El término "cofactor" define a cualquier molécula, que no sea el sustrato, necesaria para que una enzima ejerza su actividad enzimática.
- 40 **[0046]** La expresión "ADN complementario" o "ADNc" se refiere a una copia de ADN de ARNm, que normalmente se obtiene mediante la transcripción inversa de ARN mensajero (ARNm) o amplificación (p. ej., mediante reacción en cadena de la polimerasa ("PCR")).
- 45 **[0047]** La expresión "inhibidor de la corrosión" se refiere a una molécula que, cuando se añade a un fluido, reduce la tasa de corrosión de un metal o una aleación que está en contacto con el fluido.
- [0048]** El término "cultivado" y sus variantes, tales como "fermentado", se refieren a la estimulación intencionada del crecimiento (aumentos del tamaño celular, contenido celular y/o actividad celular) y/o la propagación (aumentos de los números de células por mitosis) de una o más células mediante el uso de condiciones seleccionadas y/o controladas. La combinación de crecimiento y propagación se puede denominar "proliferación". Los ejemplos de condiciones seleccionadas y/o controladas incluyen el uso de un medio definido (con características conocidas tales como pH, fuerza iónica y fuente de carbono), temperatura específica, tensión de oxígeno, niveles de dióxido de carbono y crecimiento en un biorreactor. El término "cultivar" no se refiere al crecimiento ni a la propagación de microorganismos en la naturaleza o sin intervención humana; por ejemplo, el crecimiento natural de un organismo que al final se convierte en un fósil para producir petróleo bruto geológico no es un cultivo.
- 50 **[0049]** El término "citólisis" se refiere a la lisis de células en un entorno hipotónico. La citólisis se debe a una ósmosis excesiva o movimiento de agua hacia el interior de una célula (hiperhidratación). La célula no puede soportar la presión osmótica del agua en su interior y, por lo tanto, revienta.
- 60 **[0050]** Las expresiones "harina deslipidada" y "biomasa microbiana deslipidada" se refieren a una biomasa microbiana después de que se haya extraído o aislado el aceite (incluidos los lípidos) de esta, ya sea mediante una extracción mecánica (es decir, ejercida por una prensa de tornillo) o con un disolvente, o ambas. La harina deslipidada tiene una cantidad reducida de aceite/lípidos en comparación con antes de la extracción o el aislamiento de aceite/lípidos de la
- 65

biomasa microbiana pero contiene algo de aceite/lípidos residuales.

**[0051]** El término "desmulsionante" se refiere a una molécula que descompone emulsiones (normalmente emulsiones de líquido-líquido) o evita que estas se formen. Los desmulsionantes normalmente se basan en los siguientes compuestos químicos: resinas de fenol-formaldehído catalizadas con ácido, resinas de fenol-formaldehído catalizadas con base, poliaminas, diepóxidos, polioles. Estas moléculas se suelen etoxilar (y/o propoxilar) para proporcionar el grado deseado de solubilidad en agua/aceite. La adición de óxido de etileno incrementa la solubilidad en agua, mientras que el óxido de propileno la reduce. Las formulaciones desmulsionantes comercializadas suelen ser una mezcla de dos a cuatro compuestos químicos diferentes, en uno o más disolventes portadores tales como xileno, nafta aromática pesada (HAN), isopropanol, metanol, 2-etilhexanol o diésel.

**[0052]** Las expresiones "dieléctrico" o "fluido dieléctrico" se refieren a un fluido que no conduce una corriente eléctrica o que tiene un nivel de conductividad muy bajo para dicha corriente en condiciones normales (o en las condiciones en las que se pretende utilizar). Los fluidos dieléctricos se emplean para el aislamiento, el enfriamiento y la lubricación eléctricos, por ejemplo, en transformadores y otros dispositivos eléctricos. Los dispositivos eléctricos que emplean fluidos dieléctricos incluyen transformadores de potencia y distribución, disyuntores, condensadores, conmutadores, máquinas de rayos X y cables aislantes.

**[0053]** La "rigidez dieléctrica" de un material (p. ej., aislante) es el máximo voltaje requerido para producir una ruptura dieléctrica, es decir, la falla de sus propiedades aislantes, expresada como voltios por unidad de espesor. La rigidez dieléctrica de un material se puede determinar de acuerdo con los métodos estándar, por ejemplo, los métodos de prueba D1816, D877, D3300, D117, D2413, D6180, D6181 o D1310 de la ASTM.

**[0054]** Las expresiones "vector de expresión" o "constructo de expresión" o "plásmido" o "constructo de ADN recombinante" se refieren a un ácido nucleico que se ha generado mediante la intervención humana, que incluye mediante métodos recombinantes o síntesis química directa, con una serie de elementos de ácido nucleico especificados que permitan la transcripción y/o traducción de un ácido nucleico particular en una célula huésped. El vector de expresión puede ser parte de un plásmido, virus o un fragmento de ácido nucleico. Habitualmente, el vector de expresión incluye un ácido nucleico que se ha de transcribir unido operablemente a un promotor.

**[0055]** La expresión "gen exógeno" se refiere a un ácido nucleico que codifica la expresión de un ARN y/o una proteína que se ha introducido ("transformado") en una célula, y también se denomina "transgén". Una célula transformada se puede denominar célula recombinante, en la cual se pueden introducir uno o más genes exógenos adicionales. El gen exógeno puede ser de una especie diferente (y, por lo tanto, heterólogo) o de la misma especie (y, por lo tanto, homólogo) respecto a la célula que se está transformando. Por lo tanto, un gen exógeno puede incluir un gen homólogo que ocupa una posición diferente en el genoma de la célula o que está sometido a un control diferente, respecto a la copia endógena del gen. Un gen exógeno puede estar presente en más de una copia en la célula. Un gen exógeno se puede mantener en una célula como una inserción en el genoma (nuclear o plasmídico) o como una molécula episomal.

**[0056]** La expresión "proporcionado/a de forma exógena" se refiere a una molécula proporcionada al medio de cultivo de un cultivo celular.

**[0057]** La expresión "prensado con una prensa de tornillo" se refiere a un método mecánico para extraer aceite de materias primas tales como soja y colza. Una prensa de tornillo es una máquina de tornillo que prensa material a través de una cavidad cilíndrica cerrada. Las materias primas entran por un lado de la prensa y la masa prensada sale por el otro lado, mientras que el aceite se filtra entre las barras de la rejilla y se recoge. La máquina emplea fricción y presión continua por accionamiento del tornillo para mover y comprimir la materia prima. El aceite se filtra a través de aberturas pequeñas que no permiten el paso de sólidos a su través. Al prensar la materia prima, la fricción suele provocar su calentamiento.

**[0058]** La expresión "ácido graso" es un ácido carboxílico con una cola (cadena) alifática larga. La porción alifática del ácido graso puede estar completamente saturada (sin ningún doble enlace) o puede estar insaturada en una o más porciones diferentes de la molécula. La mayoría de los ácidos grasos de origen natural tienen una cadena con un número par de átomos de carbono, comprendido entre 4 y 28. Los ácidos grasos pueden ser componentes de triglicéridos u otros lípidos, p. ej., fosfolípidos, esfingolípidos. Los ácidos grasos se pueden caracterizar por los "números lipídicos". Los números lipídicos se expresan como C:D, donde C es el número de átomos de carbono en el ácido graso y D es el número de dobles enlaces en el ácido graso. Por consiguiente, "C18:1" se refiere a un ácido graso con 18 carbonos y 1 doble enlace, mientras que "C18:2" se refiere a un ácido graso con 18 carbonos y 2 dobles enlaces.

**[0059]** La expresión "acil graso-ACP-tioesterasa" se refiere a una enzima que cataliza la escisión de un ácido graso de una proteína portadora de acilo (ACP) durante la síntesis de lípidos.

**[0060]** La expresión "acil graso-CoA/aldehído-reductasa" se refiere a una enzima que cataliza la reducción de una molécula acil-CoA para obtener un alcohol primario.

- [0061]** La expresión "acil graso-CoA-reductasa" se refiere a una enzima que cataliza la reducción de una molécula acil-CoA para obtener un aldehído.
- 5 **[0062]** La expresión "aldehído graso-descarbonilasa" se refiere a una enzima que cataliza la conversión de un aldehído graso en un alcano.
- [0063]** La expresión "aldehído graso-reductasa" se refiere a una enzima que cataliza la reducción de un aldehído para obtener un alcohol primario.
- 10 **[0064]** El punto de combustión de un material es la temperatura a la que continuará quemándose durante al menos 5 segundos tras la ignición con una llama abierta. El punto de combustión se puede determinar de acuerdo con métodos estándar, por ejemplo, los métodos de prueba D92 o D1310 de la ASTM.
- 15 **[0065]** La expresión "punto de combustión" se refiere a la temperatura más baja a la que un material se puede vaporizar para formar una mezcla inflamable en el aire. En el punto de combustión, el material se puede inflamar pero los vapores producidos durante la ignición puede que no se produzcan a una velocidad suficiente para mantener la combustión. El punto de inflamación se puede determinar de acuerdo con métodos estándar, por ejemplo, los métodos de prueba D3278, D3828, D56 o D93 de la ASTM.
- 20 **[0066]** La expresión "fuente fija de carbono" se refiere a una o más moléculas que contienen carbono, habitualmente una molécula orgánica, que están presentes a temperatura y presión ambiente en forma sólida o líquida en un medio de cultivo las cuales pueden ser utilizadas por un microorganismo cultivado en él.
- 25 **[0067]** El término "heterotrófico", en lo que respecta a condiciones de cultivo, se refiere a cultivar en ausencia sustancial de luz, a la vez que se utiliza o metaboliza una fuente fija de carbono.
- [0068]** El término "homogeneizado" se refiere a biomasa que ha sido alterada físicamente.
- 30 **[0069]** La expresión "fluido hidráulico" se refiere al fluido que sirve como medio de transmisión de potencia en un sistema hidráulico.
- [0070]** La expresión "hidrocarburo" se refiere a una molécula que contiene solamente átomos de hidrógeno y carbono, donde los átomos de carbono se enlazan covalentemente para formar una estructura principal lineal, ramificada, cíclica o parcialmente cíclica a la que se unen los átomos de hidrógeno. La estructura molecular de compuestos hidrocarbonados varía de la más simple, en forma de metano (CH<sub>4</sub>), que es un constituyente del gas natural, a las muy pesadas y muy complicadas, tales como algunas moléculas, como por ejemplo, asfaltenos que se encuentran en el crudo, petróleo y asfaltos. Los hidrocarburos pueden estar en forma gaseosa, líquida o sólida, o cualquier combinación de estas formas, y pueden tener uno o más dobles o triples enlaces entre átomos de carbono adyacentes en la estructura principal. Por consiguiente, el término incluye parafina, lípidos, alquenos y alcanos lineales, ramificados, cíclicos o parcialmente cíclicos. Los ejemplos incluyen propano, butano, pentano, hexano, octano y escualeno.
- 35 **[0071]** La expresión "proporción de hidrógeno:carbono" se refiere a la proporción de átomos de hidrógeno frente a átomos de carbono en una molécula, basada en átomo por átomo. La proporción se puede utilizar para referirse al número de átomos de carbono e hidrógeno en una molécula hidrocarbonada. Por ejemplo, el hidrocarburo con la mayor proporción es el metano CH<sub>4</sub> (4:1).
- 40 **[0072]** La expresión "fracción hidrofóbica" se refiere a la porción o fracción de un material que es más soluble en una fase hidrofóbica en comparación con una fase acuosa. Una fracción hidrofóbica es sustancialmente insoluble en agua y normalmente es apolar.
- 45 **[0073]** La expresión "aumento del rendimiento lipídico" se refiere a un aumento de la productividad de lípidos de un cultivo microbiano, por ejemplo, aumentando el peso seco de células por litro de cultivo, aumentando el porcentaje de células que constituyen lípidos y/o aumentando la cantidad total de lípidos por litro de volumen de cultivo por unidad de tiempo.
- 50 **[0074]** La expresión "promotor inducible" se refiere a un promotor que media la transcripción de un gen unido operablemente como respuesta a un estímulo particular.
- 55 **[0075]** La expresión "unido(s)/a(s) operablemente" se refiere a una unión funcional entre dos secuencias de ácidos nucleicos, tales como una secuencia de control (habitualmente un promotor) y la secuencia unida (habitualmente una secuencia que codifica una proteína, denominada también secuencia codificante). Un promotor está unido operablemente a un gen exógeno si puede mediar la transcripción del gen.
- 60 **[0076]** La expresión "in situ" se refiere a "en el lugar" o "en su posición original".
- 65

- 5 **[0077]** La expresión "índice de yodo" (o "número de yodo") se refiere a una medida del grado de insaturación de un aceite. Es la masa de yodo que consumen los enlaces insaturados en un aceite. Por ejemplo, un aceite con un índice de yodo de 50 es un aceite en el que 100 g de aceite consumirían 50 g de yodo. Los índices de yodo se determinan de forma rutinaria en la técnica. Los métodos estándar para determinar los índices de yodo incluyen D5768-02(2006) de la ASTM y 53241 del DIN.
- 10 **[0078]** La expresión "concentración limitante de un nutriente" se refiere a una concentración de un compuesto en un cultivo que limita la propagación de un organismo cultivado. La expresión "una concentración no limitante de un nutriente" se refiere a una concentración que estimula la propagación máxima durante un periodo de cultivo dado. Por lo tanto, el número de células producidas durante un periodo de cultivo dado es menor en presencia de una concentración limitante de un nutriente que cuando el nutriente no es limitante. Se dice que un nutriente está "en exceso" en un cultivo, cuando el nutriente está presente en una concentración superior a la que estimula la propagación máxima.
- 15 **[0079]** El término "lipasa" se refiere a una enzima hidrosoluble que cataliza la hidrólisis de enlaces de tipo éster en sustratos lipídicos insolubles en agua. Las lipasas catalizan la hidrólisis de lípidos para obtener glicerol y ácidos grasos.
- 20 **[0080]** La expresión "enzima para la modificación de lípidos" se refiere a una enzima que altera la estructura covalente de un lípido. Los ejemplos de enzimas para la modificación de lípidos incluyen una lipasa, una acil graso-ACP-tioesterasa, una desaturasa, incluida una esteroil-proteína portadora de acil-desaturasa (SAD) y una acil graso-desaturasa (FAD), y una aldehído graso-descarbonilasa.
- 25 **[0081]** La expresión "enzima de la vía lipídica" se refiere a cualquier enzima que desempeña una función en el metabolismo de lípidos, es decir, ya sea en la síntesis, la modificación o la degradación de lípidos, y cualesquiera proteínas que modifican lípidos químicamente, así como también proteínas portadoras.
- 30 **[0082]** Los términos "lípido" o "lípidos" se refieren a una clase de moléculas que son solubles en disolventes apolares (tales como éter y cloroformo) y son relativa o completamente insolubles en agua. Las moléculas lipídicas tienen estas propiedades, ya que están compuestas en gran parte por largas colas hidrocarbonadas que son de naturaleza hidrófoba. Los ejemplos de lípidos incluyen ácidos grasos (saturados e insaturados); glicéridos o glicerolípidos (tales como monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos o grasas neutras, y fosfoglicéridos o glicerofosfolípidos); no glicéridos (esfingolípidos, lípidos esteróicos incluidos el colesterol y las hormonas esteroides, lípidos prenóicos incluidos los terpenoides, alcoholes grasos, ceras y policétidos); y derivados de lípidos complejos (lípidos unidos a azúcares o glucolípidos, lípidos unidos a proteínas). La expresión "grasas" se refiere a un subgrupo de lípidos denominados "triacilglicéridos".
- 35 **[0083]** La expresión "lubricante" se refiere a una sustancia capaz de reducir la fricción, el calor y/o el desgaste cuando se coloca como una película entre superficies sólidas.
- 40 **[0084]** La expresión "lisado" se refiere a una solución que contiene el contenido de células lisadas.
- 45 **[0085]** La expresión "lisar" o "lisis" se refiere a una disrupción de la membrana celular y opcionalmente de la pared celular de un organismo biológico o célula que es suficiente para liberar al menos parte del contenido intracelular.
- 50 **[0086]** La expresión "desactivador de iones metálicos", denominado también "desactivador de metales" o "agente desactivador de metales (ADM)" se refiere a un combustible y/o aditivo oleoso utilizado para estabilizar fluidos mediante la desactivación (normalmente por captura) de iones metálicos. Los iones metálicos pueden ser producidos por acción de ácidos de origen natural en el combustible y ácidos generados en lubricantes mediante procesos oxidativos con las partes metálicas de los sistemas.
- 55 **[0087]** El término "microalgas" se refiere a un organismo microbiano eucariota que contiene un cloroplasto o plástido y que opcionalmente es capaz de realizar la fotosíntesis, o a un organismo microbiano procariota capaz de realizar la fotosíntesis. Las microalgas incluyen fotoautótrofos obligados, que no pueden metabolizar una fuente fija de carbono como energía, así como también heterótrofos, los cuales pueden vivir únicamente a costa de una fuente fija de carbono. Las microalgas incluyen organismos unicelulares que se separan de células hermanas poco después de la división celular, tales como Chlamydomonas, así como también microbios tales como, por ejemplo, Volvox, que es un microbio fotosintético multicelular simple de dos tipos diferentes de células. Las microalgas incluyen células tales como Chlorella, Dunaliella y Prototheca. Las microalgas también incluyen otros organismos fotosintéticos microbianos que exhiben adhesión de célula-célula tales como Agmenellum, Anabaena y Pyrobotrys. El término "microalgas" también se refiere a microorganismos heterotróficos obligados que han perdido la capacidad de realizar la fotosíntesis, tales como ciertas especies de algas dinoflageladas y especies del género Prototheca.
- 60 **[0088]** Los términos "microorganismo" y "microbio" se refieren a organismos unicelulares microscópicos.
- 65

**[0089]** La expresión "coexpresado(s)/a(s) de forma natural", con respecto a dos proteínas o genes, se refiere a que las proteínas o sus genes se coexpresan de forma natural en un tejido u organismo del cual se derivan, p. ej., porque los genes que codifican las dos proteínas están controlados por una secuencia reguladora común o porque se expresan como respuesta al mismo estímulo.

**[0090]** El término "aceite" se refiere a cualquier aceite triacilglicérido, producido por organismos, que incluyen levaduras oleaginosas, plantas y/o animales. El término "aceite", a diferencia del término "grasa", se refiere, a menos que se indique lo contrario, a lípidos que son generalmente, pero no siempre, líquidos en condiciones normales de presión y temperatura ambiente. Por ejemplo, el término "aceite" incluye aceites vegetales o seminales derivados de plantas, incluidos sin carácter limitante un aceite derivado del aguacate, nueces de Brasil, caléndula, camelina, Camelina Sativa, canola, anacardo, ricino, manteca de cacao (conocida también como cacao, que es un aceite triacilglicérido derivado de granos de cacao que es sólido en las condiciones habituales de temperatura y presión ambiente), coco, café, copra, cilantro, maíz, semilla de algodón, Cuphea, Euphorbia, avellana, cáñamo, Jatropha, jojoba, kenaf, linaza, altramuz, nueces de macadamia, semillas de mostaza, avena, Oliva, adormidera, palma, palmiste, maní, pacana, pepitas de calabaza, colza, arroz, cártamo, sésamo, soja, girasol y árbol de Tung, así como también combinaciones de estos. La expresión "aceite microbiano" se refiere a un aceite derivado de microbio.

**[0091]** La expresión "levaduras oleaginosas" se refiere a levaduras que pueden acumular de forma natural más de un 20% de su peso celular seco como lípido y pertenecen al subreino Dikarya de hongos. Las levaduras oleaginosas incluyen, sin carácter limitante, organismos tales como Yarrowia lipolytica, Rhodotorula glutinis, Cryptococcus curvatus y Lipomyces starkeyi.

**[0092]** La expresión "choque osmótico" se refiere a la ruptura de las células en una solución tras una reducción repentina de la presión osmótica. En algunas ocasiones se induce el choque osmótico para liberar componentes celulares de dichas células en una solución.

**[0093]** La expresión "enzima que degrada polisacáridos" se refiere a cualquier enzima capaz de catalizar la hidrólisis o sacarificación de cualquier polisacárido. Por ejemplo, las celulasas catalizan la hidrólisis de la celulosa.

**[0094]** Los "polisacáridos" o "glicanos" son carbohidratos constituidos por monosacáridos unidos entre sí por enlaces glicosídicos. La celulosa es un polisacárido que forma parte de ciertas paredes celulares de plantas. La celulosa puede ser despolimerizada por enzimas para obtener monosacáridos tales como xilosa y glucosa, así como también disacáridos más grandes y oligosacáridos.

**[0095]** La expresión "punto de fluidez" es la temperatura más baja a la que un líquido se verterá o fluirá en un conjunto específico de condiciones. Los estándares ilustrativos del punto de fluidez incluyen D97-11, D5853-11 y D5949-10 de la ASTM, pero también se pueden emplear otros, con los que estén familiarizados los expertos en la técnica o que estos desarrollen, para determinar el punto de fluidez en relación con los métodos descritos en la presente.

**[0096]** Las expresiones "depresores del punto de fluidez" o "DPF" se refieren a polímeros que controlan la formación de cristales cerosos en aceites o lubricantes, lo cual hace que se reduzca el punto de fluidez y mejoren las cualidades de fluidez a temperatura baja.

**[0097]** El término "promotor" se refiere a una secuencia de control de un ácido nucleico que dirige la transcripción de un ácido nucleico. Un promotor, tal como se utiliza en la presente, incluye las secuencias de ácido nucleico necesarias cerca del sitio de inicio de la transcripción, tales como, en el caso de un promotor de tipo polimerasa II, un elemento TATA. Un promotor también incluye opcionalmente elementos represores o potenciadores distales, que pueden estar situados incluso a varios miles de pares de bases del sitio de inicio de la transcripción.

**[0098]** El término "recombinante" se refiere a una célula, ácido nucleico, proteína o vector que ha sido modificado debido a la introducción de un ácido nucleico exógeno o la alteración de un ácido nucleico nativo. De este modo, p. ej., las células recombinantes expresan genes que no se encuentran en la forma nativa (no recombinante) de la célula o expresar genes nativos de forma diferente a la que esos genes son expresados por una célula no recombinante. Un "ácido nucleico recombinante" es un ácido nucleico formado originariamente in vitro, en general, mediante la manipulación de un ácido nucleico, p. ej., utilizando polimerasas y endonucleasas, o que está en una forma en la que no se encuentra normalmente en la naturaleza. Los ácidos nucleicos recombinantes se pueden producir, por ejemplo, para colocar dos o más ácidos nucleicos en unión operable. Por lo tanto, un ácido nucleico aislado o un vector de expresión formado in vitro, ligando moléculas de ADN que normalmente no están unidas en la naturaleza, se considerarán ambos recombinantes. Una vez se ha obtenido un ácido nucleico recombinante y se ha introducido en una célula u organismo huésped, este se puede replicar utilizando la maquinaria celular in vivo de la célula huésped; sin embargo, estos ácidos nucleicos, una vez producidos de forma recombinante, aunque se repliquen posteriormente de forma intracelular, se seguirán considerando recombinantes. De forma similar, una "proteína recombinante" es una proteína obtenida utilizando técnicas recombinantes, es decir, mediante la expresión de un ácido nucleico recombinante.

**[0099]** La expresión "aceite RBD" se refiere a un aceite que ha sido sometido a refinación, decoloración o

desodorización.

**[0100]** La expresión "diésel renovable" se refiere a una mezcla de alcanos (tal como C10:0, C12:0, C14:0, C16:0 y C18:0) producidos mediante la hidrogenación y desoxigenación de lípidos.

**[0101]** El término "sacarificación" se refiere a un proceso de conversión de biomasa, normalmente biomasa celulósica o lignocelulósica, en azúcares monoméricos tales como glucosa y xilosa. La biomasa o material celulósico "sacarificado" o "despolimerizado" se refiere a la biomasa o material celulósico que se ha convertido en azúcares monoméricos mediante sacarificación.

**[0102]** El término "sonicación" se refiere a un proceso de disrupción de materiales biológicos, tales como una célula, utilizando energía de ondas sonoras.

**[0103]** La expresión "especies de furfural" se refiere a 2-furancarboxaldehído o a un derivado que conserva las mismas características estructurales básicas.

**[0104]** El término "forraje" define a las hojas y los tallos secos de un cultivo remanentes después de que el grano se ha recolectado.

**[0105]** La expresión "gen de utilización de sacarosa" se refiere a un gen que, cuando se expresa, aumenta la capacidad de una célula para utilizar sacarosa como fuente de energía. Las proteínas codificadas por un gen de utilización de sacarosa se denominan en la presente "enzimas de utilización de sacarosa" e incluyen transportadores de sacarosa, sacarosa-invertasas y hexocinasas tales como glucocinasas y fructocinasas.

**[0106]** El término "transformador" se refiere a un dispositivo que transfiere energía eléctrica de un circuito a otro a través de conductores acoplados inductivamente, normalmente las bobinas del transformador.

**[0107]** Las expresiones "winterizar" aceite o "winterización de aceite" se refieren a un proceso que incluye eliminar los componentes con un punto de fusión mayor de un aceite y/o añadir uno o más depresores del punto de fluidez.

## II. Cultivo y condiciones de cultivo

**[0108]** En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere en general al cultivo de microbios oleaginosos tales como microalgas naturales y recombinantes, incluidas especies y cepas de *Chlorella* y *Prototheca*, y especies y cepas de levaduras, hongos y bacterias, para la producción de aceite microbiano (lípidos). Para mayor comodidad del lector, esta sección se subdivide en subsecciones. La subsección 1 describe especies y cepas de *Prototheca*, y cómo identificar nuevas especies y cepas de *Prototheca* y microalgas relacionadas mediante comparación de ADN genómico, así como también otras microalgas, levaduras, hongos y bacterias útiles en los métodos descritos en la presente. La subsección 2 describe biorreactores útiles para el cultivo. La subsección 3 describe medios de cultivo. La subsección 4 describe la producción de aceite (lípidos) de acuerdo con métodos de cultivo descritos en la presente. La subsección 5 describe tipos de levaduras oleaginosas adecuadas para utilizar en los métodos descritos en la presente, condiciones de cultivo para generar biomasa de levadura y los perfiles lipídicos y la composición química de la biomasa preparada de acuerdo con los métodos ilustrativos descritos en la presente.

### 1. Especies y cepas de *Prototheca* y otros microbios oleaginosos

**[0109]** *Prototheca* es un microorganismo destacado para utilizar en la producción de lípidos, ya que puede producir niveles elevados de lípidos, particularmente lípidos adecuados para la producción de fluidos dieléctricos y otros lubricantes. El lípido producido por *Prototheca* tiene un grado de saturación mayor que los producidos por otras microalgas. Además, el lípido de *Prototheca* generalmente está exento de pigmento (niveles entre bajos e indetectables de clorofila y ciertos carotenoides) y, en todo caso, contiene mucho menos pigmento que los lípidos de otras microalgas. Además, las células de *Prototheca* recombinantes proporcionadas para utilizar en los métodos descritos en la presente se pueden emplear para producir lípido con un rendimiento y una eficacia mayores, y con costos reducidos, en comparación con la producción de lípido a partir de otros microorganismos. Las cepas y especies de *Prototheca* ilustrativas para utilizar en los métodos descritos en la presente incluyen *Prototheca wickerhamii*, *Prototheca stagnora* (que incluye UTEX 327), *Prototheca portoricensis*, *Prototheca moriformis* (que incluye las cepas UTEX 1441, 1435) y *Prototheca zopfii*. Las especies del género *Prototheca* son heterótrofos obligados.

**[0110]** Las especies de *Prototheca* para utilizar en los métodos descritos en la presente se pueden identificar mediante la amplificación de ciertas regiones diana del genoma. Por ejemplo, la identificación de una especie o cepa específica de *Prototheca* se puede conseguir mediante la amplificación y secuenciación de ADN nuclear y/o cloroplástico utilizando cebadores y metodología que emplee cualquier región del genoma, por ejemplo, mediante los métodos descritos en Wu et al., Bot. Bull. Acad. Sin. (2001) 42:115-121 Identification of *Chlorella* spp. isolates using ribosomal DNA sequences. Los expertos en la técnica pueden utilizar métodos muy establecidos de análisis filogenético, tales como la amplificación y secuenciación del espaciador transcrito interno ribosómico (ADNr ITS1 y ITS2), ARNr 23S, ARNr 18S y otras regiones genómicas conservadas para identificar especies, no solamente de *Prototheca*, sino

también de otros organismos productores de hidrocarburos y lípidos con perfiles lipídicos y una capacidad de producción similares. Para consultar ejemplos de métodos de identificación y clasificación de algas remítase también a, por ejemplo, Genetics, agosto de 2005;170(4):1601-10 y RNA, abril de 2005;11(4):361-4.

5 **[0111]** Por lo tanto, se puede usar la comparación de ADN genómico para identificar las especies adecuadas de microalgas que se pueden utilizar en los métodos descritos en la presente. Se pueden amplificar regiones de ADN genómico conservado, tal como, sin carácter limitante, ADN que codifica ARNr 23S, procedentes de especies de microalgas y se pueden comparar con secuencias consenso para seleccionar especies de microalgas que estén relacionadas taxonómicamente con las microalgas preferidas utilizadas en los métodos descritos en la presente. A  
10 continuación, se muestran ejemplos de dicha comparación de secuencias de ADN para especies del género *Prototheca*. La comparación de ADN genómico también puede ser útil para identificar especies de microalgas que hayan sido identificadas erróneamente en una colección de cepas. A menudo, una colección de cepas identificará especies de microalgas en función de características fenotípicas y morfológicas. El uso de estas características puede conducir a la clasificación errónea de las especies o el género de una microalga. El uso de la comparación de ADN  
15 genómico puede ser un método mejor para clasificar especies de microalgas en función de su relación filogenética.

**[0112]** Las microalgas ilustrativas para utilizar en los métodos descritos en la presente normalmente tienen secuencias de ADN genómico que codifican ARNr 23S con una identidad nucleotídica de al menos un 99%, al menos 95%, al menos 90% o al menos un 85% con respecto a al menos una de las secuencias enumeradas en las SEQ ID NOs: 11-  
20 19.

**[0113]** Para comparar secuencias con el fin de determinar el porcentaje de identidad nucleotídica o aminoacídica, normalmente una secuencia actúa como secuencia de referencia con la cual se comparan las secuencias de prueba. Al aplicar un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y referencia se introducen en una  
25 computadora, se designan las coordenadas posteriores, si es necesario, y se designan los parámetros del programa para el algoritmo de las secuencias. El algoritmo de comparación de secuencias calcula a continuación el porcentaje de identidad secuencial para la(s) secuencia(s) de prueba en relación con la secuencia de referencia, en función de los parámetros de programa designados.

**[0114]** Se puede realizar un alineamiento óptimo de secuencias para compararlas, p. ej., mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), mediante el algoritmo de alineamiento por homología de Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete informático de Wisconsin Genetics, Genetics Computer  
30 Group, 575 Science Dr., Madison, WI) o mediante inspección visual (remítase en general a Ausubel et al., supra).

**[0115]** Otro ejemplo de un algoritmo adecuado para determinar el porcentaje de identidad secuencial y similitud secuencial es el algoritmo de BLAST, que se describe en Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990). El programa para realizar análisis de BLAST es de acceso público a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica (en el sitio web [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Este algoritmo implica identificar primero los pares de secuencias con puntaje alto (HSP, por sus siglas en inglés) identificando palabras cortas de longitud  $W$  en la secuencia problema, que coinciden o satisfacen un puntaje umbral de valor positivo  $T$  determinado cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos.  $T$  se denomina el umbral de puntaje de palabras vecinas (Altschul et al., supra.). Estos aciertos de palabras vecinas iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas con el fin de encontrar HPS más largas que las contengan. A continuación, los aciertos de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia en la medida en que el puntaje de alineamiento acumulativo puede incrementar. Los puntajes acumulativos se calculan utilizando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros  $M$  (puntaje de recompensa para un par de residuos coincidente; siempre  $> 0$ ) y  $N$  (puntaje de penalización para residuos no coincidentes; siempre  $< 0$ ). Para las secuencias de aminoácidos, se emplea una matriz de puntaje para calcular el puntaje acumulativo. La extensión de los aciertos de las palabras en cada dirección se detiene cuando: el puntaje de alineamiento acumulativo se reduce una cantidad  $X$  respecto a su máximo valor conseguido; el puntaje acumulativo se reduce hasta un valor menor o igual a cero debido a la acumulación de uno o más alineamientos de residuos con puntaje negativo; o se llega al final de una de las secuencias. Para identificar si un ácido nucleico o polipéptido está comprendido por el alcance de la invención, los parámetros predeterminados de los programas BLAST son adecuados. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) utiliza como valores predeterminados una longitud de palabra ( $W$ ) de 11, una esperanza ( $E$ ) de 10,  $M=5$ ,  $N=-4$  de una comparación de ambas hebras. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza como valores predeterminados una longitud de palabra ( $W$ ) de 3, una esperanza ( $E$ ) de 10 y la matriz de puntaje BLOSUM62. El programa TBLASTN (que emplea secuencias de proteínas para secuencias de nucleótidos) utiliza como parámetros predeterminados una longitud de palabra ( $W$ ) de 3, una esperanza ( $E$ ) de 10 y una matriz de puntaje BLOSUM 62. (remítase a Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989)).  
40  
45  
50  
55  
60

**[0116]** Además de calcular el porcentaje de identidad secuencial, el algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias ( remítase a, p. ej., Karlin & Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993)). Una medición de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña ( $P(N)$ ), que proporciona una indicación de la probabilidad de que se produzca una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a  
65

una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de prueba con el ácido nucleico de referencia es menor de aproximadamente 0.1, más preferentemente menor de aproximadamente 0.01 y aún más preferentemente menor de aproximadamente 0.001.

5 **[0117]** Se pueden utilizar una amplia variedad de microbios oleaginosos además de Prototheca en los métodos descritos en la presente. Por ejemplo, Chlorella, incluidas sin carácter limitante cepas de las especies prototecoides de Chlorella, es una microalga excelente para utilizar en los métodos descritos en la presente. Las consideraciones que afectan a la selección de microorganismos para utilizar en los métodos descritos en la presente, además de la producción de lípidos o hidrocarburos adecuados para producir aceites, combustibles y compuestos oleoquímicos, pueden incluir una o más de las siguientes: (1) contenido elevado de lípidos como porcentaje de peso celular; (2) crecimiento fácil; (3) modificación genética fácil; y (4) procesamiento de la biomasa fácil. En realizaciones particulares, el microorganismo natural o modificado genéticamente proporciona células con un contenido de aceite microbiano (es decir, lípidos y ácidos grasos) de al menos un 40%, al menos un 45%, al menos un 50%, al menos un 55%, al menos un 60%, al menos un 65% o al menos un 70% o superior. Los organismos preferidos crecen (y se cultivan) de forma heterotrófica (sobre azúcares en ausencia sustancial de luz). En general, las microalgas son excelentes microbios para utilizar en los métodos descritos en la presente. Los ejemplos de microalgas que se pueden utilizar para llevar a la práctica los métodos incluyen, sin carácter limitante, las siguientes algas que se enumeran en la Tabla 1.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabla 1. Ejemplos de microalgas oleaginosas.

5	Achnanthes orientalis, Agmenellum, Amphiprora hyaline, Amphora coffeiformis, Amphora coffeiformis lineata, Amphora coffeiformis punctata, Amphora coffeiformis taylori, Amphora coffeiformis tenuis, Amphora delicatissima, Amphora delicatissima capitata, Amphora sp., Anabaena, Ankistrodesmus, Ankistrodesmus falcatus, Boekelovia hooglandii, Borodinella sp., Botryococcus braunii, Botryococcus sudeticus, Carteria, Chaetoceros gracilis, Chaetoceros muelleri, Chaetoceros muelleri subsalsum, Chaetoceros sp., Chlorella anitrata, Chlorella Antarctica, Chlorella aureoviridis, Chlorella candida, Chlorella capsule, Chlorella desiccata, Chlorella ellipsoidea, Chlorella emersonii, Chlorella fusca, Chlorella fusca var. vacuolata, Chlorella glucotropha, Chlorella infusionum, Chlorella infusionum var. actophila, Chlorella infusionum var. auxenophila, Chlorella kessleri, Chlorella lobophora (cepa SAG 37.88), Chlorella luteoviridis, Chlorella luteoviridis var. aureoviridis, Chlorella luteoviridis var. lutescens, Chlorella miniata, Chlorella minutissima, Chlorella mutabilis, Chlorella nocturna, Chlorella parva, Chlorella photophila, Chlorella pringsheimii, Chlorella protothecoides (incluidas cualquiera de las cepas UTEX 1806, 411, 264, 256, 255, 250, 249, 31, 29, 25, y las cepas CCAP 211/17 y 211/8d), Chlorella protothecoides var. acidicola, Chlorella regularis, Chlorella regularis var. minima, Chlorella regularis var. umbricata, Chlorella reisiigii, Chlorella saccharophila, Chlorella saccharophila var. ellipsoidea, Chlorella salina, Chlorella simplex, Chlorella sorokiniana, Chlorella sp., Chlorella sphaerica, Chlorella stigmatophora, Chlorella vanniellii, Chlorella vulgaris, Chlorella vulgaris, Chlorella vulgaris f. tertia, Chlorella vulgaris var. autotrophica, Chlorella vulgaris var. viridis, Chlorella vulgaris var. vulgaris, Chlorella vulgaris var. vulgaris f. tertia, Chlorella vulgaris var. vulgaris f. viridis, Chlorella xanthea, Chlorella zofingiensis, Chlorella trebouxii, Chlorella vulgaris, Chlorococcum infusionum, Chlorococcum sp., Chlorogonium, Chroomonas sp., Chrysosphaera sp., Cricosphaera sp., Cryptomonas sp., Cyclotella cryptica, Cyclotella meneghiniana, Cyclotella sp., Dunaliella sp., Dunaliella bardawil, Dunaliella bioculata, Dunaliella granulate, Dunaliella maritime, Dunaliella minuta, Dunaliella parva, Dunaliella peircei, Dunaliella primolecta, Dunaliella salina, Dunaliella terricola, Dunaliella tertiolecta, Dunaliella viridis, Dunaliella tertiolecta, Eremosphaera viridis, Eremosphaera sp., Ellipsoidon sp., Euglena, Franceia sp., Fragilaria crotonensis, Fragilaria sp., Gleocapsa sp., Gloeothamnion sp., Hymenomonas sp., Isochrysis aff. galbana, Isochrysis galbana, Lepocinclis, Micractinium, Micractinium (UTEX LB 2614), Monoraphidium minutum, Monoraphidium sp., Nannochloris sp., Nannochloropsis salina, Nannochloropsis sp., Navicula acceptata, Navicula biskanterae, Navicula pseudotenelloides, Navicula pelliculosa, Navicula saprophila, Navicula sp., Nephrochloris sp., Nephroselmis sp., Nitzschia communis, Nitzschia alexandrina, Nitzschia communis, Nitzschia dissipata, Nitzschia frustulum, Nitzschia hantzschiana, Nitzschia inconspicua, Nitzschia intermedia, Nitzschia microcephala, Nitzschia pusilla, Nitzschia pusilla elliptica, Nitzschia pusilla monoensis, Nitzschia quadrangular, Nitzschia sp., Ochromonas sp., Oocystis parva, Oocystis pusilla, Oocystis sp., Oscillatoria limnetica, Oscillatoria sp., Oscillatoria subbrevis, Pascheria acidophila, Pavlova sp., Phagus, Phormidium, Platymonas sp., Pleurochrysis carterae, Pleurochrysis dentate, Pleurochrysis sp., Prototheca wickerhamii, Prototheca stagnora, Prototheca portoricensis, Prototheca moriformis, Prototheca zopfii, Pyramimonas sp., Pyrobotrys, Sarcinoid chrysophyte, Scenedesmus armatus, Spirogyra, Spirulina platensis, Stichococcus sp., Synechococcus sp., Tetradon, Tetraselmis sp., Tetraselmis suecica, Thalassiosira weissflogii y Viridiella fridericiana.
10	
15	
20	
25	
30	
35	
40	
45	

[0118] Además de microalgas, las levaduras oleaginosas pueden acumular más de un 20% de su peso celular seco como lípidos y, por lo tanto, son útiles en los métodos descritos en la presente. En una realización de la presente invención, un microorganismo que produce un lípido o un microorganismo a partir del cual se puede extraer, recuperar u obtener aceite, es una levadura oleaginosas. Los ejemplos de levaduras oleaginosas que se pueden emplear en los métodos descritos en la presente incluyen, sin carácter limitante, las levaduras oleaginosas que se enumeran en la Tabla 2. En los siguientes ejemplos se proporcionan métodos ilustrativos para el cultivo de levaduras oleaginosas (*Yarrowia lipolytica* y *Rhodotorula graminis*) con el fin de conseguir un alto contenido de aceite.

55

60

65

Tabla 2. Ejemplos de levaduras oleaginosas.

Candida apicola, Candida sp., Cryptococcus curvatus, Cryptococcus terricolus, Debaromyces hansenii, Endomycopsis vernalis, Geotrichum carabidarum, Geotrichum cucujoidarum, Geotrichum histeridarum, Geotrichum silvicola, Geotrichum vulgare, Hyphopichia burtonii, Lipomyces lipofer, Lypomyces orientalis, Lipomyces starkeyi, Lipomyces tetrasporous, Pichia mexicana, Rodosporidium sphaerocarpum, Rhodosporidium toruloides Rhodotorula aurantiaca, Rhodotorula dairenensis, Rhodotorula diffluens, Rhodotorula glutinus, Rhodotorula glutinis var. glutinis, Rhodotorula gracilis, Rhodotorula graminis Rhodotorula minuta, Rhodotorula mucilaginosa, Rhodotorula mucilaginosa var. mucilaginosa, Rhodotorula terpenoidalis, Rhodotorula toruloides, Sporobolomyces alborubescens, Starmerella bombicola, Torulaspora delbrueckii, Torulaspora pretoriensis, Trichosporon behrend, Trichosporon brassicae, Trichosporon domesticum, Trichosporon laibachii, Trichosporon loubieri, Trichosporon loubieri var. loubieri, Trichosporon montevideense, Trichosporon pullulans, Trichosporon sp., Wickerhamomyces Canadensis, Yarrowia lipolytica y Zygoascus meyerae

**[0119]** En una realización de la presente invención, un microorganismo que produce un lípido o un microorganismo a partir del cual se puede extraer, recuperar u obtener un lípido, es un hongo. Los ejemplos de hongos que se pueden emplear en los métodos descritos en la presente incluyen, sin carácter limitante, los hongos que se enumeran en la Tabla 3.

Tabla 3. Ejemplos de hongos oleaginosos.

Mortierella, Mortierella vinacea, Mortierella alpine, Pythium debaryanum, Mucor circinelloides, Aspergillus ochraceus, Aspergillus terreus, Pennicillium iilacinum, Hensenulo, Chaetomium, Cladosporium, Malbranchea, Rhizopus y Pythium

**[0120]** Por lo tanto, en una realización de la presente invención, el microorganismo utilizado en la producción de biomasa microbiana para utilizar en los métodos descritos en la presente es un hongo. Los ejemplos de hongos adecuados (p. ej., Mortierella alpine, Mucor circinelloides y Aspergillus ochraceus) incluyen aquellos que se ha demostrado que se pueden modificar genéticamente, tal como se describe en la bibliografía (remítase, por ejemplo, a Microbiology, julio; 153(Pt.7): 2013-25 (2007); Mol Genet Genomics, junio; 271(5): 595-602 (2004); Curr Genet, marzo; 21(3):215-23 (1992); Current Microbiology, 30(2):83-86 (1995); Sakuradani, NISR Research Grant, "Studies of Metabolic Engineering of Useful Lipid-producing Microorganisms" (2004); y PCT/JP2004/012021).

**[0121]** En otras realizaciones de la presente invención, un microorganismo que produce un lípido o un microorganismo a partir del cual se puede extraer, recuperar u obtener aceite, es una bacteria oleaginosa. Las bacterias oleaginosas son bacterias que pueden acumular más de un 20% de su peso celular seco como lípidos. Las especies de bacterias oleaginosas para utilizar en los métodos descritos en la presente incluyen especies del género Rhodococcus, tales como Rhodococcus opacus y Rhodococcus sp. En la técnica se conocen métodos para cultivar bacterias oleaginosas, tales como Rhodococcus opacus, (remítase a Waltermann, et al., (2000) Microbiology, 146: 1143-1149). En los siguientes ejemplos se proporcionan métodos ilustrativos para cultivar Rhodococcus opacus con el fin de conseguir un contenido elevado de aceite.

## 2. Biorreactor

**[0122]** Los microorganismos se cultivan tanto con el fin de realizar manipulaciones genéticas como para la producción de aceite microbiano (p. ej., hidrocarburos tales como lípidos, ácidos grasos, aldehídos, alcoholes y alcanos). El primer tipo de cultivo se realiza a pequeña escala y al menos inicialmente en condiciones en las que el microorganismo de partida pueda crecer. El cultivo cuyo fin es la producción de hidrocarburos se realiza normalmente a gran escala (p. ej., en biorreactores de 10 000 L, 40 000 L, 100 000 L o más grandes) en un biorreactor. Las microalgas, incluidas las especies de Prototheca, así como también el resto de microbios oleaginosos descritos en la presente, normalmente se cultivan en los métodos descritos en la presente en medios líquidos dentro de un biorreactor. Normalmente, el biorreactor no permite la entrada de cantidades sustanciales de luz o no permite que entre nada de luz. En algunas realizaciones, el paso o los pasos de cultivo completos del microbio oleaginoso, incluidas las microalgas, se realizan en ausencia sustancial de luz.

5 **[0123]** El biorreactor o fermentador se utiliza para cultivar las células de microalgas durante las diferentes fases de su ciclo fisiológico. Los biorreactores ofrecen muchas ventajas para su uso en el crecimiento heterotrófico y métodos de propagación. Las microalgas y otros microbios oleaginosos descritos en la presente normalmente se fermentan en grandes cantidades en líquido tal como, por ejemplo, en cultivos en suspensión. Los biorreactores, tales como los fermentadores de acero, pueden dar cabida a volúmenes de cultivo muy grandes (en varias realizaciones de la invención se utilizan biorreactores de 40 000 litros y de mayor capacidad). Los biorreactores suelen permitir también el control de las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH, tensión de oxígeno y niveles de dióxido de carbono. Por ejemplo, habitualmente los biorreactores se pueden configurar, por ejemplo, utilizando puertos conectados a tubos, para permitir que los componentes gaseosos, como oxígeno o nitrógeno, sean burbujeados a través de un cultivo líquido. Otros parámetros de cultivo, tales como el pH del medio de cultivo, la identidad y la concentración de elementos traza y otros constituyentes del medio, también se pueden manipular más fácilmente utilizando un biorreactor.

15 **[0124]** Los biorreactores se pueden configurar para que los medios de cultivo fluyan a través del biorreactor durante todo el periodo de tiempo en el que las microalgas se reproducen y aumentan en número. En algunas realizaciones, por ejemplo, los medios se pueden infundir en el biorreactor después de la inoculación pero antes de que las células alcancen una densidad deseada. En otros ejemplos, un biorreactor se llena con los medios de cultivo al principio de un cultivo, y no se infunde más medio de cultivo después que el cultivo se haya inoculado. Es decir, la biomasa de microalgas (u otros microbios) se cultiva en un medio acuoso durante un período de tiempo en el que las microalgas se reproducen y aumentan en número; sin embargo, no fluye ninguna cantidad de medio de cultivo acuoso a través del biorreactor durante todo este período de tiempo. De este modo, en algunas realizaciones, el medio de cultivo acuoso no fluye a través del biorreactor después de la inoculación.

25 **[0125]** Se pueden emplear biorreactores equipados con dispositivos tales como aspas giratorias e impulsores, mecanismos de oscilación, barras de agitación, medios para la infusión de gas a presión para hacer que los cultivos de microalgas se mezclen. La mezcla puede ser continua o intermitente. Por ejemplo, en algunas realizaciones, no se mantiene un régimen de flujo turbulento de entrada de gas ni la entrada de medios durante la reproducción de las microalgas, hasta que se haya conseguido un incremento deseado en el número de dichas microalgas.

30 **[0126]** Los puertos del biorreactor se pueden utilizar para introducir o extraer gases, sólidos, semisólidos y líquidos en la cámara del biorreactor que contiene las microalgas. Aunque muchos biorreactores tienen más de un puerto (por ejemplo, uno para la entrada de medios y otro para el muestreo), no es necesario que solamente una sustancia entre o salga de un puerto. Por ejemplo, un puerto se puede utilizar para hacer fluir medios de cultivo al interior del biorreactor y posteriormente se puede utilizar para el muestreo, la entrada de gases, la salida de gases u otros fines. Preferentemente, un puerto de muestreo se puede utilizar repetidamente sin alterar ni comprometer la naturaleza axénica del cultivo. Un puerto de muestreo se puede configurar con un valor u otro dispositivo que permita detener y reanudar el flujo de muestra o para proporcionar un modo de muestreo continuo. Los biorreactores normalmente tienen al menos un puerto que permite la inoculación de un cultivo, y dicho puerto también se puede utilizar con otros fines tales como la entrada de medios o gases.

45 **[0127]** Los puertos de los biorreactores permiten manipular el contenido de gas del cultivo de microalgas. A modo ilustrativo, parte del volumen de un biorreactor puede ser gas en lugar de líquido y las entradas de gas del biorreactor pueden permitir el bombeo de gases al interior del biorreactor. Los gases que se pueden bombear beneficiosamente al interior de un biorreactor incluyen aire, mezclas de aire/CO<sub>2</sub>, gases nobles, tales como el argón, y otros gases. Los biorreactores normalmente están diseñados para que el usuario pueda controlar la velocidad de entrada de un gas en el biorreactor. Como se indicó anteriormente, el aumento del flujo de gas en un biorreactor se puede usar para aumentar la mezcla del cultivo.

50 **[0128]** El aumento del flujo de gas afecta también a la turbidez del cultivo. Se puede producir turbulencia colocando un puerto de entrada de gas por debajo del nivel de los medios de cultivo acuosos para que de este modo la entrada de gas en el biorreactor produzca burbujas en la superficie del cultivo. Uno o más puertos de salida de gas permiten que el gas se escape, de este modo se evita que la presión aumente en el biorreactor. Preferentemente, un puerto de salida de gas conduce a una válvula "unidireccional" que evita la entrada de microorganismos contaminantes en el biorreactor.

### **3. Medios**

60 **[0129]** Los medios de cultivo microalgáceos, así como también otros medios de cultivo microbianos, normalmente contienen componentes tales como una fuente de nitrógeno fijo, una fuente de carbono fijo, elementos traza, opcionalmente un tampón regulador del pH y fosfato (normalmente proporcionado como una sal de fosfato). Otros componentes pueden incluir sales tales como cloruro de sodio, en particular para las microalgas de agua de mar. Las fuentes de nitrógeno incluyen fuentes de nitrógeno orgánicas e inorgánicas, entre ellas, por ejemplo, sin carácter limitante, nitrógeno molecular, nitrato, sales de nitrato, amoníaco (puro o en forma salina, tal como (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y NH<sub>4</sub>OH), proteína, harina de soja, licor de maceración del maíz y extracto de levadura. Los ejemplos de elementos traza incluyen zinc, boro, cobalto, cobre, manganeso y molibdeno en, por ejemplo, las formas respectivas de ZnCl<sub>2</sub>,

H3BO3, CoCl2·6H2O, CuCl2·2H2O, MnCl2·4H2O y (NH4)6Mo7O24·4H2O.

**[0130]** Los microorganismos útiles de acuerdo con los métodos de la presente invención se encuentran en diversos lugares y entornos en todo el mundo. Como consecuencia de su aislamiento de otras especies y su divergencia evolutiva resultante, puede ser difícil predecir el medio de cultivo particular para el cultivo y la generación óptimos de constituyentes lipídicos y/o hidrocarbonados. En algunos casos, puede que no sea posible cultivar ciertas cepas de microorganismos en un medio de cultivo particular debido a la presencia de algún componente inhibitorio o a la ausencia de algún nutriente esencial requerido por la cepa particular del microorganismo.

**[0131]** Normalmente los medios de cultivo sólidos y líquidos se pueden adquirir de una amplia variedad de fuentes, y las instrucciones para la preparación de medios particulares que son adecuados para una amplia variedad de cepas de microorganismos se pueden encontrar en internet, por ejemplo, en [www.utex.org/](http://www.utex.org/), un sitio mantenido por la Universidad de Texas en Austin, 1 University Station A6700, Austin, Texas, 78712-0183, para su colección de cultivos de algas (UTEX). Por ejemplo, diversos medios de agua dulce y agua salada incluyen los descritos en la publicación del PCT N.o 2008/151149, incorporada a la presente por referencia.

**[0132]** En un ejemplo particular, el medio Proteosa es adecuado para cultivos axénicos, y se puede preparar un volumen de 1 L del medio (pH ~ 6.8) mediante la adición de 1 g de proteosa peptona a 1 L de medio Bristol. El medio Bristol comprende NaNO3 2.94 mM, CaCl2·2H2O 0.17 mM, MgSO4·7H2O 0.3 mM, 0.43 mM, KH2PO4 1.29 mM y NaCl 1.43 mM en una solución acuosa. Para medio agar al 1.5%, se pueden añadir 15 g de agar a 1 L de la solución. La solución se cubre y esteriliza en autoclave, y se conserva después a una temperatura refrigerada antes de usarla. Otro ejemplo es el medio de aislamiento de Prototheca (PIM, por sus siglas en inglés), que comprende 10 g/L de hidrogenofalato de potasio (KHP), 0.9 g/L de hidróxido sódico, 0.1 g/L de sulfato de magnesio, 0.2 g/L de hidrogenofosfato de potasio, 0.3 g/L de cloruro de amonio, 10 g/L de glucosa, 0.001 g/L de clorhidrato de tiamina, 20 g/L de agar, 0.25 g/L de 5-fluorocitosina, a un pH comprendido en el rango de 5.0 a 5.2 (remítase a Pore, 1973, App. Microbiology, 26: 648-649). Otros medios adecuados para utilizar con los métodos descritos en la presente se pueden identificar fácilmente consultando la URL identificada anteriormente, o consultando otras organizaciones que mantienen los cultivos de microorganismos, tales como SAG, CCAP o CCALA. SAG se refiere a la colección de cultivos de algas en la Universidad de Göttingen (Göttingen, Alemania), CCAP se refiere a la colección de cultivos de algas y protozoos dirigida por la Asociación Escocesa de Ciencias Marinas (Escocia, Reino Unido) y CCALA se refiere a la colección de cultivos de algas en laboratorio en el Instituto de Botánica (Třeboň, República Checa). Además, la patente de EE. UU. N.o 5.900.370 describe formulaciones espacio de medios y condiciones adecuadas para la fermentación heterotrófica de especies de Prototheca.

**[0133]** Para que la producción sea rentable, la selección de una fuente de carbono fijo es importante, ya que el costo de la fuente de carbono fijo debe ser lo suficientemente bajo como para que la producción de aceite sea económica. Las fuentes de carbono adecuadas incluyen, por ejemplo, acetato, floridósida, fructosa, galactosa, ácido glucurónico, glucosa, glicerol, lactosa, manosa, N-acetilglucosamina, ramnosa, rafinosa, estaquiosa, sacarosa y/o xilosa. Las materias primas adecuadas útiles de acuerdo con los métodos descritos en la presente incluyen, por ejemplo, licor negro, almidón de maíz, material celulósico despolimerizado, suero lácteo, azúcar invertido (glucosa/fructosa), molasas, papa, sorgo, sacarosa, remolacha azucarera, caña de azúcar, jugo de caña espeso, arroz y trigo. Las fuentes de carbono también se pueden proporcionar como una mezcla, tal como una mezcla de sacarosa y pulpa de remolacha azucarera despolimerizada.

**[0134]** La fuente o las fuentes de carbono se pueden suministrar en una concentración de al menos aproximadamente 50 µM, al menos aproximadamente 100 µM, al menos aproximadamente 500 µM, al menos aproximadamente 5 mM, al menos aproximadamente 50 mM y al menos aproximadamente 500 mM de una o más fuentes de carbono fijo proporcionadas de forma exógena. Se prefieren las fuentes de carbono muy concentradas como materia prima para la fermentación y, en varias realizaciones, la fuente de carbono se proporciona en una materia prima con una concentración que es próxima a su solubilidad máxima (es decir, en una concentración que excede un 90% de solubilidad, tal como una concentración mayor o igual a un 95%, es decir, un 99% de solubilidad).

**[0135]** Por ejemplo, en algunas realizaciones, se utilizan niveles de glucosa de al menos 300 g/L, al menos 400 g/L, al menos 500 g/L o al menos 600 g/L o superiores en la materia prima en un cultivo discontinuo, en el que la fuente de carbono fijo muy concentrada se añade a las células con el tiempo mientras las células crecen y acumulan aceite microbiano (lípidos). En otras realizaciones, se utilizan niveles de sacarosa de al menos 500 g/L, al menos 600 g/L, al menos 700 g/L, al menos 800 g/L o superiores en la materia prima en un cultivo discontinuo. Los ejemplos no limitantes de fuentes de carbono de tipo sacarosa muy concentradas incluyen jugo de caña espeso, jugo de caña de azúcar, jugo de remolacha azucarera y molasas. Las fuentes de carbono de particular interés a efectos de los métodos descritos en la presente incluyen celulosa (en una forma despolimerizada), glicerol, sacarosa y sorgo, cada uno de los cuales se describe más detalladamente a continuación.

**[0136]** De acuerdo con los métodos descritos en la presente, los microorganismos se pueden cultivar utilizando biomasa celulósica despolimerizada como materia prima. La biomasa celulósica (p. ej., forraje, tal como el forraje del maíz) no es costosa y se puede adquirir fácilmente; sin embargo, los intentos de utilizar este material como materia prima para levaduras han fallado. En particular, se ha descubierto que tales materias primas inhiben el crecimiento de

levaduras, y las levaduras no pueden utilizar los azúcares de cinco carbonos producidos a partir de materiales celulósicos (p. ej., xilosa a partir de hemicelulosa). Por el contrario, las microalgas pueden crecer en material celulósico procesado. Los materiales celulósicos generalmente incluyen aproximadamente un 40-60% de celulosa; aproximadamente un 20-40% de hemicelulosa; y un 10-30% de lignina.

**[0137]** Los materiales celulósicos adecuados incluyen residuos de cultivos energéticos herbáceos y leñosos, así como también cultivos agrícolas, es decir, las partes de la planta, principalmente tallos y hojas, que no se eliminaron de los campos con el alimento principal o el producto fibroso. Los ejemplos incluyen desperdicios agrícolas tales como el bagazo de la caña de azúcar, cáscaras de arroz, fibra de maíz (incluidos los tallos, hojas, cortezas y mazorcas), harina de soja, paja de trigo, paja de arroz, pulpa de remolacha azucarera, pulpa de cítricos, pieles de cítricos; desperdicios forestales tales como diluyentes de madera dura y blanda, y residuos de madera dura y blanda de operaciones madereras; desperdicios de madera tales como desperdicios de aserraderos (virutas de madera, aserrín) y desperdicios del molino de pulpa; desperdicios urbanos tales como fracciones de papel de los desperdicios sólidos municipales, desperdicios urbanos de madera y desperdicios urbanos verdes tales como segados de hierba municipales; y desperdicios de la construcción con madera. Los materiales celulósicos adicionales incluyen cultivos celulósicos dedicados tales como el pasto varilla, madera híbrida de álamo y *Miscanthus*, caña fibrosa y sorgo fibroso. Los azúcares de cinco carbonos que se producen a partir de este tipo de materiales incluyen la xilosa.

**[0138]** Los materiales celulósicos se tratan para incrementar la eficiencia con la que los microbios pueden utilizar el azúcar o los azúcares contenidos en los materiales. Los métodos descritos en la presente se pueden llevar a la práctica para aprovechar nuevos métodos para el tratamiento de materiales celulósicos después de la explosión ácida de modo que los materiales sean adecuados para utilizar en un cultivo heterotrófico de microbios (p. ej., microalgas y levaduras oleaginosas). Tal como se indicó anteriormente, la biomasa lignocelulósica está compuesta por varias fracciones que incluyen celulosa, un polímero cristalino de glucosa con enlaces beta-1,4 (un azúcar de seis carbonos), hemicelulosa, un polímero asociado ligeramente compuesto principalmente por xilosa (un azúcar de cinco carbonos) y en menor medida por manosa, galactosa, arabinosa, lignina, un polímero aromático complejo compuesto por alcohol sináptico y sus derivados, y pectinas, que son cadenas lineales de un ácido poligalacturónico con enlaces alfa-1,4. Debido a que la estructura polimérica de la celulosa y la hemicelulosa, los azúcares (p. ej., xilosa y glucosa monomérica) contenidos en estas no se encuentran en una forma que los microbios puedan utilizar de forma eficiente (metabolizados). Para tales microbios, puede ser muy útil procesar adicionalmente la biomasa celulósica para generar los azúcares monoméricos que constituyen los polímeros con el fin de garantizar que los materiales celulósicos se utilizan de forma eficiente como materia prima (fuente de carbono).

**[0139]** La celulosa o la biomasa celulósica se somete a un proceso, denominado "explosión", en el que la biomasa se trata con ácido sulfúrico diluido ( u otro ácido) a una temperatura y presión elevadas. Este proceso acondiciona la biomasa de modo que se pueda someter de forma eficiente a la hidrólisis enzimática de las fracciones celulósicas y hemicelulósicas para obtener monómeros de glucosa y xilosa. Los azúcares monoméricos resultantes se denominan azúcares celulósicos. Los azúcares celulósicos pueden ser utilizados posteriormente por microorganismos para producir varios metabolitos (p. ej., lípido). El paso de la explosión ácida da como resultado una hidrólisis parcial de la fracción hemicelulósica para obtener los monosacáridos constituyentes. Estos azúcares se pueden liberar completamente de la biomasa con un tratamiento posterior. En algunas realizaciones, el tratamiento posterior es un tratamiento hidrotérmico que incluye lavar el material sometido a explosión con agua caliente, la cual elimina contaminantes tales como sales. Este paso no es necesario para fermentaciones de etanol celulósico debido a las concentraciones de azúcares más diluidas utilizadas en tales procesos. En otras realizaciones, el tratamiento posterior es un tratamiento ácido adicional. En otras realizaciones más, el tratamiento posterior es la hidrólisis enzimática del material sometido a explosión. Estos tratamientos también se pueden utilizar en cualquier combinación. El tipo de tratamiento puede afectar al tipo de azúcares liberados (p. ej., azúcares de cinco carbonos frente a azúcares de seis carbonos) y a la etapa en la que se liberen en el proceso. Como consecuencia de esto, se pueden crear corrientes diferentes de azúcares, ya sean principalmente de cinco carbonos o de seis carbonos. Estas corrientes enriquecidas de cinco carbonos o de seis carbonos se pueden dirigir, por lo tanto, a microorganismos específicos con diferentes capacidades de utilización de carbono.

**[0140]** Los métodos descritos en la presente normalmente implican la fermentación hasta densidades celulares superiores a las que se consiguen en la fermentación etanólica. Debido a las elevadas densidades de los cultivos para la producción de lípidos heterotróficos, la fuente de carbono fijo (p. ej., la corriente o las corrientes de azúcares derivados celulósicos) se encuentra preferentemente en una forma concentrada. El nivel de glucosa del material celulósico despolimerizado es preferentemente de al menos 300 g/L, al menos 400 g/L, al menos 500 g/L o al menos 600 g/L antes del paso de cultivo, que es opcionalmente un cultivo discontinuo en el que el material se añade a las células con el tiempo mientras las células crecen y acumulan lípido. Las corrientes de azúcares celulósicos no se utilizan en un rango próximo o igual a este rango de concentración en la producción de etanol celulósico. Por lo tanto, para generar y mantener las sumamente elevadas densidades celulares durante la producción de aceite lignocelulósico, la materia o materias primas de carbono se deben suministrar a los cultivos heterotróficos en una forma muy concentrada. Sin embargo, cualquier componente en la corriente de alimentación que no sea un sustrato para el microorganismo oleaginoso y que no sea metabolizado por este se acumulará en el biorreactor, lo cual puede dar lugar a problemas si el componente es tóxico o inhibe la producción del producto final deseado. Debido a que los subproductos de tipo lignina y derivados de la lignina, los subproductos derivados de carbohidratos, tales como

furfurales e hidroximetilfurfurales, y las sales derivadas de la generación de los materiales celulósicos (tanto en el proceso de explosión como en el proceso de neutralización posterior) e incluso azúcares de pentosa/hexosa no metabolizados pueden plantear problemas en las fermentaciones etanólicas, estos efectos se amplifican significativamente en un proceso en el que su concentración en la materia prima inicial es elevada. Para conseguir concentraciones de azúcares a partir de materiales celulósicos de 300 g/L, 400 g/L, 500 g/L o superiores para azúcares de seis carbonos que se puedan utilizar en la producción a gran escala de la presente invención, la concentración de estos materiales tóxicos puede ser 20 veces superior a las concentraciones que suelen estar presentes en las fermentaciones etanólicas de biomasa celulósica.

**[0141]** Este tratamiento del proceso de explosión del material celulósico utiliza cantidades significativas de ácido sulfúrico, calor y presión, de este modo se libera subproductos de carbohidratos, a saber furfurales e hidroximetilfurfurales. Los furfurales e hidroximetilfurfurales se producen durante la hidrólisis de hemicelulosa por deshidratación de xilosa para obtener furfural y agua. En algunas realizaciones de la presente invención, estos subproductos (p. ej., furfurales hidroximetilfurfurales) se eliminan del material lignocelulósico sacarificado antes de introducirlo en el biorreactor. En ciertas realizaciones de la presente invención, el proceso para la eliminación de los subproductos de carbohidratos es un tratamiento hidrotérmico de los materiales celulósicos sometidos a explosión. Además, en realizaciones particulares, la presente invención proporciona métodos en los que se utilizan cepas que pueden tolerar compuestos tales como furfurales o hidroximetilfurfurales para la producción. En otra realización, la presente invención también proporciona métodos para utilizar microorganismos que no solamente pueden tolerar furfurales en los medios de fermentación, sino que también pueden metabolizar estos subproductos durante la fermentación.

**[0142]** El proceso de explosión también genera niveles significativos de sales. Por ejemplo, las condiciones típicas para la explosión pueden dar como resultado conductividades en exceso de 5 mS/cm cuando la biomasa celulósica sometida a explosión se resuspende en una proporción 10:1 de agua:sólidos (peso seco). En ciertas realizaciones de la presente invención, la biomasa sometida a explosión diluida se somete a sacarificación enzimática, y el sobrenadante resultante se concentra con un factor de 25 para utilizarlo en el biorreactor. El nivel salino (según se mida por conductividad) en la corriente o las corrientes de azúcares concentrados puede que sea inaceptablemente elevado (de hasta 1.5 M equivalentes de Na<sup>+</sup>). Se generan a su vez sales adicionales durante la neutralización de los materiales sometidos a explosión para el proceso de sacarificación enzimática posterior. De acuerdo con los métodos descritos en la presente, estas sales se pueden eliminar de modo que la corriente o las corrientes de azúcares celulósicos concentrados resultantes se puedan utilizar en procesos heterotróficos para producir lípido. En algunas realizaciones, el método de eliminación de estas sales es desionización con resinas tales como, sin carácter limitante, DOWEX Marathon MR3. En ciertas realizaciones, el paso de desionización con resinas se lleva a cabo antes de ajustar el pH o la concentración de los azúcares y el tratamiento hidrotérmico de la biomasa antes de la sacarificación, o cualquier combinación de lo anterior; en otras realizaciones, el paso tiene lugar después de uno o más de estos procesos. En otras realizaciones, el proceso de explosión en sí se modifica para evitar de este modo que se generen sales hasta niveles inaceptablemente elevados. Por ejemplo, una alternativa adecuada a la explosión con ácido sulfúrico (u otro ácido) de la biomasa celulósica es la pulpación mecánica para que la biomasa celulósica se vuelva receptiva a la hidrólisis enzimática (sacarificación). En otras realizaciones más, se utilizan cepas nativas de microorganismos resistentes a niveles elevados de sales o cepas modificadas genéticamente con resistencia a niveles elevados de sales.

**[0143]** Una realización preferida para el proceso de preparación de biomasa celulósica sometida a explosión para utilizar en la producción de aceites microbianos heterotróficos utilizando microbios oleaginosos se lleva a cabo como se indica a continuación. Un primer paso comprende ajustar el pH de la biomasa celulósica sometida a explosión resuspendida al rango comprendido entre 5.0-5.3 y a continuación se lava la biomasa celulósica tres veces. Este paso de lavado se puede llevar a cabo de varias formas, incluidos el uso de resinas de intercambio iónico y desalinización, ósmosis inversa, tratamiento hidrotérmico (como el descrito anteriormente) o la resuspensión y centrifugación repetida en agua desionización. Este paso de lavado da como resultado una corriente celulósica cuya conductividad está comprendida entre 100 y 300  $\mu$ S/cm y la eliminación de cantidades significativas de furfurales e hidroximetilfurfurales. El líquido decantado en este paso de lavado se puede guardar para concentrar azúcares de cinco carbonos liberados de la fracción hemicelulósica. Un segundo paso comprende la sacarificación enzimática de la biomasa celulósica lavada. En una realización, se utiliza acelerasa (Genencor). Un tercer paso comprende la recuperación de azúcares mediante centrifugación o decantación y el enjuague de la biomasa sacarificada. La biomasa resultante (sólidos) es un componente energético denso con un alto contenido de lignina que se puede utilizar como combustible o se puede enviar a desechos. Se recoge la corriente de azúcares recuperados en el proceso de centrifugación/decantación y enjuague. Un cuarto paso comprende la microfiltración para eliminar sólidos contaminantes con recuperación del permeado. Un quinto paso comprende un paso de concentración que se puede llevar a cabo utilizando un evaporador de vacío. Este paso puede incluir opcionalmente la adición de agentes antiespumantes, tales como P'2000 (Sigma/Fluka), que en ocasiones es necesaria debido al contenido proteico de la materia prima de azúcar resultante.

**[0144]** En otra realización de los métodos de la invención, la fuente de carbono es glicerol, incluido el subproducto de glicerol acidulado y no acidulado procedente de la transesterificación de biodiésel. En una realización, la fuente de carbono incluye glicerol y al menos una fuente de carbono diferente. En algunos casos, todo el glicerol y la fuente o las fuentes de carbono fijo diferentes se proporcionan al microorganismo al principio de la fermentación. En algunos

casos, el glicerol y la fuente o las fuentes de carbono fijo diferentes se proporcionan al microorganismo simultáneamente en una proporción predeterminada. En algunos casos, el glicerol y la fuente o las fuentes de carbono fijo diferentes se proporcionan a los microbios en una tasa predeterminada durante el curso de la fermentación.

5

**[0145]** Algunas algas experimentan la división celular más rápido en presencia de glicerol que en presencia de glucosa (remítase a la publicación de PCT N.o 2008/151149). En estos casos, los procesos de cultivo en dos etapas, en los que primero se añade glicerol a las células para incrementar la densidad de células rápidamente y a continuación se añade glucosa para acumular aceite microbiano (lípidos), puede mejorar la eficacia con la que se produce el aceite.

10 El uso del subproducto de glicerol del proceso de transesterificación proporciona ventajas económicas significativas cuando se recicla en un proceso de producción de aceite microbiano. Además se proporcionan otros métodos de alimentación, tales como los que emplea mezclas de glicerol y glucosa como fuente de carbono fijo. El uso de tales mezclas como alimentación también proporciona beneficios económicos similares. Además, en ciertas realizaciones, la inversión proporciona métodos de alimentación de microalgas con azúcares alternativos tales como sacarosa en diferentes combinaciones con glicerol.

15

**[0146]** En otra realización de los métodos de la invención, la fuente de carbono es azúcar invertido. El azúcar invertido se produce dividiendo la sacarosa en sus componentes monosacáridos: fructosa y glucosa. La producción de azúcar invertido se puede conseguir mediante varios métodos conocidos en la técnica. Uno de estos métodos consiste en calentar una solución acuosa de sacarosa. Habitualmente se emplean catalizadores para acelerar la conversión de sacarosa en azúcar invertido. Estos catalizadores pueden ser biológicos; por ejemplo, se pueden añadir enzimas tales como invertasas y sucrasas a la sacarosa para acelerar la reacción de hidrólisis con el fin de producir azúcar invertido. Un ácido es un ejemplo de un catalizador no biológico que, cuando se combina con calor, puede acelerar la reacción de hidrólisis. Una vez que se forma el azúcar invertido, este tiene una menor tendencia a cristalizar en comparación con la sacarosa y, por lo tanto, proporciona ventajas para el almacenamiento y las fermentaciones discontinuas, en las que, en el caso del cultivo heterotrófico de microbios, incluidas microalgas, se necesita una fuente de carbón concentrada. En una realización, la fuente de carbono es azúcar invertido, preferentemente en una forma concentrada (al menos 90% de su solubilidad máxima en las condiciones utilizadas, tal como se describió anteriormente), es decir, al menos 800 g/L, al menos 900 g/L, al menos 1000 g/L o al menos 1100 g/L. El azúcar invertido, preferentemente en una forma concentrada, se añade a las células con el tiempo mientras las células crecen y acumulan lípido.

20

25

30

**[0147]** En otra realización de los métodos de la invención, la fuente de carbono es sacarosa, incluida una materia prima compleja que contiene sacarosa, tal como el jugo de caña espeso obtenido tras procesar la caña de azúcar. Como se indicó anteriormente, debido a las elevadas densidades de los cultivos para la producción de aceites heterotróficos, la fuente de carbono fijo (p. ej., sacarosa, glucosa, etc.) está en una forma concentrada, es decir, al menos 500 g/L, al menos 600 g/L, al menos 700 g/L o al menos 800 g/L de la fuente de carbono fijo antes del paso de cultivo, que es opcionalmente un cultivo discontinuo en el que el material se añade a las células con el tiempo mientras las células crecen y acumulan lípidos. En algunos casos, la fuente de carbono es sacarosa en forma de jugo de caña espeso, normalmente en una forma concentrada, es decir, al menos un 60% de sólidos o aproximadamente 770 g/L de azúcar, al menos un 70% de sólidos o aproximadamente 925 g/L de azúcar, o al menos un 80% de sólidos o aproximadamente 1125 g/L de azúcar antes del paso de cultivo, que opcionalmente es un cultivo discontinuo. El jugo de caña espeso concentrado se añade a las células con el tiempo mientras las células crecen y acumulan lípido.

35

40

**[0148]** En una realización, el medio de cultivo incluye además al menos una enzima de utilización de sacarosa. En algunos casos, el medio de cultivo incluye una sacarosa-invertasa. En una realización, la enzima sacarosa-invertasa es una enzima sacarosa-invertasa secretable codificada por un gen de sacarosa-invertasa exógeno expresado por la población de microorganismos. Por lo tanto, en algunos casos, como se describe más detalladamente en la Sección IV, más adelante, el microbio utilizado en los métodos descritos en la presente ha sido modificado genéticamente para expresar una enzima de utilización de sacarosa, tal como un transportador de sacarosa, una sacarosa-invertasa, una hexocinasa, una glucocinasa o una frutocinasa.

45

50

**[0149]** Las materias primas complejas que contienen sacarosa incluyen molasas de desecho obtenidas durante el procesamiento de la caña de azúcar; el uso de este producto de desecho de escaso valor obtenido durante el procesamiento de la caña de azúcar puede proporcionar un ahorro de costos importante en la producción de hidrocarburos y otros aceites. Otra materia prima compleja que contiene sacarosa y que es útil en los métodos descritos en la presente es el sorgo, incluidos el jarabe de sorgo y el sorgo puro. El jarabe de sorgo se produce a partir del jugo de caña de sorgo dulce. Su perfil de azúcares consiste principalmente en glucosa (dextrosa), fructosa y sacarosa.

55

60

#### **4. Producción de aceite**

**[0150]** Para la producción de aceite (lípido) de acuerdo con los métodos descritos en la presente, es preferible cultivar las células en la oscuridad, como en el caso, por ejemplo, en el que se utilicen fermentadores de capacidad muy elevada (mayor o igual a 40 000 litros) los cuales no permiten que la luz llegue al cultivo. Por ejemplo, Prototheca y otras especies de microalgas se pueden cultivar y propagar para producir aceite en un medio que contenga una fuente de carbono fijo y en ausencia de luz; dicho cultivo se conoce como crecimiento heterotrófico.

65

**[0151]** A modo de ejemplo, se introduce un inóculo de células de microalgas que producen lípido en el medio; hay un período de latencia (fase de latencia) antes de que las células comiencen a propagarse. Tras el período de latencia, la velocidad de propagación aumenta constantemente y entra en la fase logarítmica o exponencial. La fase exponencial va seguida a su vez de una ralentización de la propagación debido a la disminución de nutrientes, tales como nitrógeno, el aumento de sustancias tóxicas y los mecanismos de detección de cuórum. Después de esta ralentización, la propagación se detiene y las células entran en una fase estacionaria o estado de crecimiento constante, en función del entorno particular que se proporcione a las células. Para obtener la biomasa con un contenido lipídico elevado, el cultivo se cosecha normalmente mucho después del final de la fase exponencial, la cual puede finalizar temprano al permitir que el nitrógeno u otro nutriente fundamental (que no sea carbono) se agote, lo cual obliga a las células a convertir las fuentes de carbono, presentes en exceso, en lípido. Los parámetros de las condiciones de cultivo se pueden manipular para optimizar la producción total de aceite, la combinación de ácidos grasos en el aceite producido, y/o la producción de un ácido graso específico y el lípido o los lípidos correspondientes.

**[0152]** Preferentemente, los microorganismos cultivados utilizando las condiciones que se describen en la presente y otras conocidas en la técnica comprenden al menos aproximadamente un 20% en peso de lípido, preferentemente al menos aproximadamente un 40% en peso, más preferentemente al menos aproximadamente un 50% en peso y aún más preferentemente al menos aproximadamente un 60% en peso. Las condiciones del proceso se pueden ajustar para incrementar el rendimiento lipídico de modo que sea adecuado para un uso particular y/o para reducir los costos de producción. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, se cultiva una microalga u otro microbio oleaginoso en presencia de una concentración limitante de uno o más nutrientes, tales como, por ejemplo, nitrógeno, fósforo o azufre, y a la vez se proporciona un exceso de una fuente de carbono fijo tal como glucosa. La limitación de nitrógeno tiende a aumentar el rendimiento lipídico microbiano en comparación con el rendimiento lipídico microbiano en un cultivo en el que se proporciona nitrógeno en exceso. En realizaciones particulares, el aumento en el rendimiento lipídico es de al menos aproximadamente: un 10%, un 50%, un 100%, un 200% o un 500%. El microbio se puede cultivar en presencia de una cantidad limitante de un nutriente durante parte del período de cultivo total o durante el período completo. En realizaciones particulares, la concentración de nutriente se alterna entre una concentración limitante y una concentración no limitante al menos dos veces durante el período de cultivo total. El contenido lipídico de las células se puede incrementar continuando el cultivo durante periodos de tiempo mayores mientras se proporciona un exceso de carbono, pero limitando el nitrógeno o en ausencia de este.

**[0153]** En otra realización, el rendimiento lipídico se incrementa cultivando un microbio que produce lípido (p. ej., una microalga) en presencia de uno o más cofactores para una enzima de la vía lipídica (por ejemplo, una enzima sintética de ácido graso). Generalmente, la concentración del cofactor o de los cofactores es suficiente para que el rendimiento del aceite microbiano (p. ej., lípidos y ácidos grasos) sea superior al rendimiento del aceite microbiano en ausencia del cofactor o los cofactores. En una realización particular, el cofactor o los cofactores se proporcionan al cultivo mediante la inclusión en el cultivo de un microbio (p. ej., microalga) que contiene un gen exógeno que codifica el cofactor o los cofactores. Como alternativa, el cofactor o los cofactores se pueden proporcionar al cultivo mediante la inclusión de un microbio (p. ej., microalga) que contiene un gen exógeno que codifica una proteína que participa en la síntesis del cofactor. En ciertas realizaciones, los cofactores adecuados incluyen cualquier vitamina requerida por una enzima de la vía lipídica, tal como, por ejemplo: biotina y pantotenato. Los genes que codifican cofactores adecuados para utilizar en los métodos descritos en la presente o que participan en la síntesis de tales cofactores son muy conocidos y se pueden introducir en microbios (p. ej., microalgas u otro microbio oleaginoso descrito en la presente) utilizando constructos y técnicas como los que se describen anteriormente.

**[0154]** Los ejemplos específicos de biorreactores, condiciones de cultivo, y métodos de propagación y crecimiento heterotrófico descritos en la presente se pueden combinar de cualquier manera que sea adecuada para mejorar los rendimientos del crecimiento microbiano y la producción de lípido y/o proteína.

**[0155]** Se ha generado biomasa de microalgas con un porcentaje elevado de acumulación de aceite/lípido en peso seco (remítase a la publicación de PCT N.o 2008/151149). La biomasa de microalgas generada mediante los métodos de cultivo descritos en la presente y útil de acuerdo con los métodos descritos en la presente comprende al menos un 10% de aceite microalgáceo en peso seco. En algunas realizaciones, la biomasa de microalgas comprende al menos un 25%, al menos un 50%, al menos un 55% o al menos un 60% de aceite microalgáceo en peso seco. En algunas realizaciones, la biomasa de microalgas contiene entre un 10 y un 90% en peso de aceite microalgáceo, entre un 25 y un 75% de aceite microalgáceo, entre un 40 y un 75% de aceite microalgáceo o entre un 50 y un 70% de aceite microalgáceo en peso seco.

**[0156]** El aceite microalgáceo de la biomasa descrita en la presente o extraído de la biomasa para utilizar en los métodos y las composiciones descritos en la presente puede comprender glicerolípidos con una o más cadenas laterales de éster de ácido graso diferentes. Los glicerolípidos están compuestos por una molécula de glicerol esterificada a una, dos, o tres moléculas de ácidos grasos, que pueden tener longitudes variables y grados de saturación variables. Las características referentes a la saturación y a la longitud de las moléculas de ácidos grasos (y los aceites microalgáceos que las contienen) se pueden manipular para modificar las propiedades o las proporciones de las moléculas de ácidos grasos en los aceites microalgáceos descritos en la presente diseñando las condiciones de cultivo o la vía lipídica, tal como se describe más detalladamente en la Sección V, más adelante. Por lo tanto, se

pueden preparar mezclas específicas de aceite de algas (u otros microbios) ya sea dentro de una única especie de algas o mezclando la biomasa o aceite algáceo de dos o más especies de microalgas, o mezclando aceite algáceo descrito en la presente con aceites procedentes de otras fuentes tales como la soja, colza, canola, palma, palmiste, coco, maíz, hortalizas de desecho, árbol del sebo, oliva, girasol, semilla del algodón, grasa de pollo, sebo bovino, sebo porcino, microalgas, macroalgas, microbios, Cuphea, lino, maní, grasa blanca de calidad, manteca, Camellina sativa, semilla de mostaza, anacardo, avena, lupino, kenaf, caléndula, cáñamo, café, linaza (lino), avellana, Euphorbia, pepita de calabaza, cilantro, camelia, sésamo, cártamo, arroz, tung, cacao, copra, adormidera, semillas de ricino, pecana, joboba, nuez de macadamia, nuez de brasil, palta, petróleo o una fracción destilada de cualquiera de los aceites precedentes.

**[0157]** Tal como se indicó anteriormente, la composición del aceite, es decir, las propiedades y proporciones de los constituyentes correspondientes a los ácidos grasos de los glicerolípidos, se pueden manipular también combinando biomasa o aceite de al menos dos especies de microalgas distintas. En algunas realizaciones, al menos dos de las distintas especies de microalgas tienen diferentes perfiles glicerolípidicos. Las distintas especies de microalgas se pueden cultivar juntas o por separado, tal como se describe en la presente, preferentemente en condiciones heterotróficas, para generar los respectivos aceites. Las diferentes especies de microalgas pueden contener diferentes porcentajes de distintos constituyentes correspondientes a los ácidos grasos en los glicerolípidos de la célula.

**[0158]** Generalmente, las cepas de Prototheca tienen perfiles lipídicos con ácidos grasos C16 y C18 como las especies predominantes. Por lo general, para la producción de fluidos dieléctricos se prefieren los ácidos grasos de cadena más larga, especialmente los ácidos grasos C16 y C18 monosaturados (es decir, C16:1 y C18:1) (remítase, por ejemplo, a la patente de EE. UU. N.o 6.274.067). Por ejemplo, Prototheca moriformis (UTEX 1435), Prototheca stagnora (UTEX 327) y Prototheca moriformis (UTEX 1441) contienen entre un 12% y un 30% de ácidos grasos C16 y entre un 50% y un 58% de ácidos grasos C18:1. Chlorella protothecoides (UTEX 250) contiene aproximadamente un 73% de ácidos grasos C18:1 y otras cepas de Chlorella protothecoides, incluidas, sin carácter limitante, UTEX 25, UTEX 249, UTEX 256, UTEX 264, UTEX 411, CCAP 211/17, CCAP 221/8D y SAG 221 10d, pueden contener entre un 7% y un 18% de ácidos grasos C16 y entre un 55% y un 75% de ácidos grasos C18:1. En varias realizaciones, el aceite microbiano (lípidos) útil en los productos descritos en la presente (tales como fluidos dieléctricos) contiene al menos aproximadamente un 50% de C18:1, p. ej., al menos aproximadamente un 55%, al menos aproximadamente un 60%, al menos aproximadamente un 65%, al menos aproximadamente un 70%, al menos aproximadamente un 75%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 85% y al menos aproximadamente un 90% de C18:1. En estas u otras realizaciones, el aceite microbiano (lípidos) contiene menos de aproximadamente un 10% de C18:2, p. ej., menos de aproximadamente un 7.5%, menos de aproximadamente un 5%, menos de aproximadamente un 2.5% y menos de aproximadamente un 1% de C18:2. El aceite microbiano puede contener cualquier combinación de porcentajes de C18:1 y C18:2 que ascienda a un 100% o menos. Por ejemplo, el aceite microbiano puede contener al menos un 50% de C18:1 y menos de un 10% de C18:2 o al menos un 80% de C18:1 y menos de un 5% de C18:2.

**[0159]** El aceite (lípidos) de microalgas (u otros microbios) también puede incluir otros constituyentes producidos por las microalgas o incorporados en el aceite de microalgas a partir del medio de cultivo. Éstos otros constituyentes pueden estar presentes en diferentes cantidades dependiendo de las condiciones de cultivo, la especie, el método de extracción utilizado para recuperar el aceite de la biomasa y otros factores que puedan afectar a la composición del aceite. Los ejemplos no limitantes de tales constituyentes incluyen carotenoides, presentes en una cantidad inferior a 0.4 microgramos/mL; licopeno, presente en una cantidad inferior a 0.001 microgramos/mL; beta-caroteno, presente en una cantidad inferior a 0.02 microgramos/mL; clorofila, presente en una cantidad inferior a 0.02 miligramos por kilogramo de aceite; gamma-tocoferol, presente en una cantidad comprendida entre 0.40 y 0.60 miligramos por 100 gramos de aceite; campesterol, presente en una cantidad comprendida entre 3 y 9 miligramos por 100 gramos de aceite; y tocotrienoles, presentes en una cantidad inferior a 0.5 miligramos por gramo de aceite.

**[0160]** Los otros constituyentes pueden incluir, sin carácter limitante, fosfolípidos, tocoferoles, tocotrienoles, carotenoides (p. ej., alfa-caroteno, beta-caroteno, licopeno, etc.), xantófilas (p. ej., luteína, zeaxantina, alfa-criptoxantina y beta-criptoxantina) y varios compuestos orgánicos o inorgánicos. En algunos casos, el aceite extraído de especies de Prototheca comprende entre 0.003 y 0.039 microgramos de luteína/gramos de aceite, menos de 0.003 microgramos de licopeno/gramos de aceite; y menos de 0.003 microgramos de beta-caroteno/gramo de aceite

## **5. Cepas y condiciones de cultivo de levaduras oleaginosas**

**[0161]** La presente invención proporciona métodos para producir aceites/lípidos a partir de biomasa de levaduras oleaginosas. La invención tiene origen, en parte, en descubrimientos de que la biomasa de levadura se puede preparar con un alto contenido de aceite y el aceite extraído se puede convertir en varios productos útiles, incluidos fluidos dieléctricos y otros lubricantes. El aceite de levadura, que puede comprender una mezcla de ácidos grasos saturados de cadena entre media y larga (p. ej., ácidos grasos C16 y C18), proporciona un material de partida excelente para la preparación de productos químicos incluidos fluidos dieléctricos.

**[0162]** Se pueden utilizar diversas especies de levadura que produce aceites y/o lípidos adecuados de acuerdo con los métodos descritos en la presente, aunque se prefieren la levadura que produce niveles altos de aceites o lípidos adecuados de forma natural.

**[0163]** En realizaciones particulares, la levadura oleaginoso comprende células que contienen al menos un 20% o más de aceite triglicérido en peso seco. En otras realizaciones, la levadura oleaginoso contiene al menos un 25-35% o más de aceite triglicérido en peso seco. Generalmente, en estas realizaciones, cuanto más aceite contenga la levadura oleaginoso, más aceite se podrá extraer de la biomasa, de modo que normalmente se prefiere que la levadura oleaginoso se pueda cultivar hasta que contenga al menos un 40%, al menos un 50% o al menos un 60% o más de aceite triglicérido en peso seco. No todos los tipos de lípidos son convenientes para utilizar en productos químicos, tales como fluidos dieléctricos, ya que pueden tener una longitud de cadena o unos niveles de saturación no deseados, o estar asociados con contaminantes no deseados. Estas consideraciones también afectan a la selección de la levadura oleaginoso (o cualquier otro microbio) que se vaya a utilizar en los métodos descritos en la presente.

**[0164]** Las especies adecuadas de levadura oleaginoso para utilizar en los métodos descritos en la presente incluyen, sin carácter limitante, *Candida apicola*, *Candida* sp., *Cryptococcus curvatus*, *Cryptococcus terricolus*, *Debaromyces hansenii*, *Endomycopsis vernalis*, *Geotrichum carabidarum*, *Geotrichum cucujoidarum*, *Geotrichum histeromyces*, *Geotrichum silvicola*, *Geotrichum vulgare*, *Hyphopichia burtonii*, *Lipomyces lipofer*, *Lipomyces orientalis*, *Lipomyces starkeyi*, *Lipomyces tetrasporous*, *Pichia mexicana*, *Rhodospidium sphaerocarum*, *Rhodospidium toruloides*, *Rhodotorula aurantiaca*, *Rhodotorula dairenensis*, *Rhodotorula diffluens*, *Rhodotorula glutinus*, *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis*, *Rhodotorula gracilis*, *Rhodotorula graminis*, *Rhodotorula minuta*, *Rhodotorula mucilaginoso*, *Rhodotorula mucilaginoso* var. *mucilaginoso*, *Rhodotorula terpenoidalis*, *Rhodotorula toruloides*, *Sporobolomyces alborubescens*, *Starmerella bombicola*, *Torulaspota delbruekii*, *Torulaspota pretoriensis*, *Trichosporon behrend*, *Trichosporon brassicae*, *Trichosporon domesticum*, *Trichosporon laibachii*, *Trichosporon loubieri*, *Trichosporon loubieri* var. *loubieri*, *Trichosporon montevidense*, *Trichosporon pullulans*, *Trichosporon* sp., *Wickerhamomyces Canadensis*, *Yarrowia lipolytica* y *Zygoascus meyerae*.

**[0165]** Las especies de levadura oleaginoso para utilizar en los métodos descritos en la presente se pueden identificar por comparación de ciertas regiones diana de su genoma con esas mismas regiones de especies identificadas en la presente; las especies preferidas son aquellas que exhiben identidad o al menos un nivel muy alto de homología con las especies identificadas en la presente, y que producen cantidades similares y tipos similares de lípido en comparación con las cepas descritas específicamente en la presente. Por ejemplo, se puede conseguir identificar una especie o cepa de levadura oleaginoso específica mediante la amplificación y secuenciación de ADN genómico utilizando cebadores y metodología que emplea regiones adecuadas del genoma, por ejemplo, utilizando los métodos descritos en Kurtzman y Robnett, *Antonie van Leeuwenhoek* 73(4): 331-371 (1998), Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. Los expertos en la técnica pueden emplear métodos de análisis filogenético bien establecidos, tales como la amplificación y secuenciación de 18S y 26S nucleares, y regiones de espaciadores transcritos internos (ITS, por sus siglas en inglés) de genes de ARN ribosómico y otras regiones conservadas, para identificar las especies de levaduras oleaginosas adecuadas para utilizar en los métodos descritos en la presente.

**[0166]** Por lo tanto, se puede usar la comparación de ADN genómico para identificar las especies adecuadas de levaduras oleaginosas que se pueden utilizar en los métodos descritos en la presente. Se pueden amplificar regiones de ADN genómico conservadas, tales como, sin carácter limitante, secuencias genómicas conservadas entre regiones 3' de 18S fúngico y regiones 5' de genes de ARNr 26S fúngico, de especies de levaduras que pueden, por ejemplo, estar relacionadas taxonómicamente con las levaduras oleaginosas preferidas utilizadas en los métodos descritos en la presente, y se pueden comparar con las regiones correspondientes de tales especies preferidas. Las especies que presentan un nivel alto de similitud se seleccionan posteriormente para utilizarlas en los métodos descritos en la presente. El Ejemplo 6 describe la secuenciación genómica de regiones 3' de 18S fúngico y regiones 5' de ARNr 26S fúngico conservadas para 48 cepas de levaduras oleaginosas. La comparación de las secuencias para determinar el porcentaje de identidad nucleotídica o aminoacídica se puede realizar utilizando los mismos métodos se describen anteriormente para las microalgas/microorganismos.

**[0167]** Las levaduras oleaginosas se cultivan en medios líquidos para propagar la biomasa de acuerdo con los métodos descritos en la presente. En los métodos descritos en la presente, las especies de levaduras oleaginosas se cultivan en un medio que contiene una fuente de carbono fijo y/o una fuente de nitrógeno fijo en ausencia de luz (crecimiento heterotrófico). El crecimiento heterotrófico de levaduras oleaginosas normalmente tiene lugar en un entorno aeróbico. Por ejemplo, el crecimiento heterotrófico durante periodos de tiempo prolongados, tales como de entre 10 y 15 días o más, en condiciones de nitrógeno limitado puede dar como resultado la acumulación de un contenido bajo de lípido/aceite en las células.

**[0168]** Los medios de cultivo de levaduras oleaginosas normalmente contienen componentes tales como una fuente de carbono fijo (descrita anteriormente), una fuente de nitrógeno fijo (tal como proteína, harina de soja, extracto de levadura, licor de maceración del maíz, amoníaco (puro o en forma salina), nitrato o sal de nitrato), elementos traza, opcionalmente un tampón regulador del pH y fosfato (una fuente de fósforo; se pueden utilizar otras sales de fosfato).

**[0169]** En un ejemplo particular, un medio adecuado para el cultivo de cepas de levadura oleaginoso es el medio YPD. Este medio es adecuado para cultivos axénicos, y se puede preparar un volumen de 1 L del medio (pH ~ 6.8) mediante la adición de 10 g de bacto-levadura, 20 g de bacto-peptona y 40 g de glucosa en agua destilada. Para medio agar al

1.5%, se puede añadir 15 g de agar a 1 L de solución. La solución se cubre y esteriliza en autoclave, y se conserva después a una temperatura refrigerada antes de usarla. Se han descrito otros métodos para el crecimiento y la propagación de cepas de levaduras oleaginosas con el fin de generar altos niveles de lípidos como un porcentaje del peso seco (remítase, por ejemplo, a Li et al., *Enzyme and Microbial Technology* (2007) 41:312-317 (que describe el cultivo de *Rhodospiridium toruloides* hasta un 67.5% p/p de lípido utilizando fermentación discontinua). Las levaduras oleaginosas con un contenido de aceite/lípido elevado se pueden generar normalmente incrementando la duración de la fermentación mientras que se proporciona un exceso de fuente de carbono con limitación de nitrógeno.

**[0170]** Normalmente los medios de cultivo sólidos y líquidos se pueden adquirir de una amplia variedad de fuentes, y las instrucciones para la preparación de medios particulares que son adecuados para una amplia variedad de cepas de levaduras oleaginosas se pueden encontrar en internet, por ejemplo, en [www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ\\_Medium186.pdf](http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium186.pdf).

**[0171]** Otros medios adecuados para utilizar con los métodos descritos en la presente se pueden identificar fácilmente consultando la URL identificada anteriormente o consultando otras organizaciones que mantienen cultivos de levaduras oleaginosas tales como las colecciones de cultivos fúngicos del Centro Austriaco Mundial de Recursos Biológicos y Micología Aplicada ([www.biotech.boku.ac.at/acbr.html](http://www.biotech.boku.ac.at/acbr.html)); la colección biomédica de hongos y levaduras ([bccm.belspo.be/about/ihem.php](http://bccm.belspo.be/about/ihem.php)); la colección checa de microorganismos ([sci.muni.cz/ccm/index.html](http://sci.muni.cz/ccm/index.html)); el Instituto Pasteur ([www.pasteur.fr/ip/easysite/go/03b-000011-08h/](http://www.pasteur.fr/ip/easysite/go/03b-000011-08h/)); la colección alemana de microorganismos y cultivos celulares ([www.dsmz.de/](http://www.dsmz.de/)); la micoteca Univesitatis Taurinensis ([web086.unito.it/cgi-bin/bioveg/documenti.pl/Show?\\_id=b522](http://web086.unito.it/cgi-bin/bioveg/documenti.pl/Show?_id=b522)); la colección japonesa de microorganismos del Centro de Biorrecursos Riken ([www.jcm.riken.jp/JCM/announce.shtml](http://www.jcm.riken.jp/JCM/announce.shtml)); la colección nacional de cultivos de levaduras ([www.ncyc.co.uk/](http://www.ncyc.co.uk/)); ATCC ([www.atcc.org/](http://www.atcc.org/)); y la colección de cultivos de levaduras Phaff ([www.phaffcollection.org/](http://www.phaffcollection.org/)).

**[0172]** Las levaduras oleaginosas útiles de acuerdo con los métodos descritos en la presente se encuentran en diversos lugares y entornos en todo el mundo. Como consecuencia de su aislamiento de otras especies y su divergencia evolutiva resultante, puede ser difícil o imposible predecir el medio de cultivo particular para el crecimiento y la generación óptimos de aceite y/o lípido y/o proteína a partir de una especie particular de microbio cualquiera, pero los expertos en la técnica podrán encontrar fácilmente medios que sean adecuados mediante pruebas rutinarias, considerando la descripción de la presente. En algunos casos, puede que no sea posible cultivar ciertas cepas de microorganismos en un medio de cultivo particular debido a la presencia de algún componente inhibitorio o a la ausencia de algún nutriente esencial requerido por la cepa particular del microorganismo. Los siguientes ejemplos proporcionan los métodos ilustrativos para cultivar diferentes especies de levaduras oleaginosas con el fin de acumular altos niveles de lípido como un porcentaje del peso celular seco.

**[0173]** La fuente de carbono fijo es un componente fundamental del medio. Las fuentes de carbono fijo adecuadas para los propósitos de los métodos descritos en la presente incluyen, por ejemplo, glucosa, fructosa, sacarosa, lactosa, galactosa, xilosa, manosa, ramnosa, arabinosa, N-acetilglucosamina, glicerol, ácido glucurónico, rafinosa, estaquiosa y/o acetato. La Subsección 3 (Medios) anterior contiene una discusión más detallada sobre las fuentes de carbono adecuadas.

**[0174]** Las condiciones del proceso se pueden ajustar para aumentar el porcentaje en peso de células correspondiente a lípido (aceite). Por ejemplo, en ciertas realizaciones, se cultiva una levadura oleaginosa en presencia de una concentración limitante de uno o más nutrientes, tales como, por ejemplo, nitrógeno, fosfato y ciertos iones metálicos, y a la vez se proporciona un exceso de una fuente de carbono fijo tal como glucosa. La limitación de nitrógeno tiende a aumentar el rendimiento lipídico microbiano en comparación con el rendimiento lipídico microbiano en un cultivo en el que se proporciona nitrógeno en exceso. En realizaciones particulares, el aumento en el rendimiento lipídico es de al menos aproximadamente un 10%, 50%, 100%, 200% ó 500%. El microbio se puede cultivar en presencia de una cantidad limitante de un nutriente durante parte del período de cultivo total o durante el período completo. En algunas realizaciones, la concentración de nutriente se alterna entre una concentración limitante y una concentración no limitante al menos dos veces durante el período de cultivo total.

**[0175]** En un estado de crecimiento estacionario, las células acumulan aceite (lípido) pero no experimentan división celular. En una realización de la invención, el estado de crecimiento se mantiene al continuar proporcionando todos los componentes de los medios de cultivo originales a las células, excepto una fuente de nitrógeno fijo. El cultivo de levaduras oleaginosas mediante el suministro de todos los nutrientes proporcionados inicialmente a las células, excepto una fuente de nitrógeno fijo, tal como alimentando las células durante un período de tiempo prolongado, da como resultado un porcentaje superior de lípido en peso celular seco.

**[0176]** En otras realizaciones, la biomasa con un alto contenido lipídico se genera suministrando una fuente de carbono fijo a las células, después que todo el nitrógeno fijo se haya consumido, durante períodos de tiempo prolongados, tales como de al menos una o dos semanas. En algunas realizaciones, se deja que las células acumulen aceite en presencia de una fuente de carbono fijo y en ausencia de una fuente de nitrógeno fijo durante más de 10 días, más de 15 días o más de 20 días. Las levaduras oleaginosas cultivadas utilizando las condiciones descritas en la presente u otras conocidas en la técnica pueden comprender al menos aproximadamente un 20% de lípido en peso seco y con frecuencia comprenden un 35%, un 45%, un 55%, un 65%, e incluso un 75% o más de lípido en peso seco. Por lo

tanto, el porcentaje del peso celular seco correspondiente a lípido en la producción de lípido a partir de microbios se puede entonces mejorar manteniendo las células en un estado de crecimiento en el que consumen carbono y acumulan aceite, pero no experimentan división celular.

5 **[0177]** Las condiciones en las que el nitrógeno está en exceso tienden a aumentar el rendimiento proteico microbiano en comparación con el rendimiento de aceite microbiano en un cultivo en el que no se proporciona nitrógeno en exceso. Las fuentes de nitrógeno adecuadas para las levaduras oleaginosas pueden provenir de fuentes de nitrógeno orgánico y/o fuentes de nitrógeno inorgánico.

10 **[0178]** Los ejemplos no limitantes de fuentes de nitrógeno orgánico son extracto de levadura, peptona, licor de maceración del maíz y maíz macerado en polvo. Los ejemplos no limitantes de fuentes de nitrógeno inorgánico preferidas incluyen, por ejemplo, y sin carácter limitante,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y  $\text{NH}_4\text{OH}$ . En una realización, los medios de cultivo para llevar a la práctica la invención contienen únicamente fuentes de nitrógeno inorgánico. En otra realización, los medios de cultivo para llevar a la práctica la invención contienen únicamente fuentes de nitrógeno orgánico. En otra realización más, los medios de cultivo para llevar a la práctica la invención contienen una mezcla de fuentes de nitrógeno orgánico e inorgánico.

15 **[0179]** Un ejemplo de una formulación de un medio utilizada para cultivar levaduras oleaginosas incluye: 7 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 2 g/L de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 1.5 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 1.5 g/L de extracto de levadura; 0.2 g/L de  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0.1 g/L de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0.001 g/L de biotina y 0.001 g/L de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  con un nivel de pH ajustado a 5.5 con HCL y con 12 g/L de glucosa y 30 g/L de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  como fuente de nitrógeno. Otro medio que se utiliza para cultivar levaduras oleaginosas incluye: 20 g/L de glucosa; 0.5 g/L de extracto de levadura; 5 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; y 1 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0.5 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Otra formulación de un medio para el cultivo de levaduras oleaginosas en un fermentador consiste en: 30 g/L de glucosa; 20 g/L de xilosa; 2 g/L de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 1 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; y 0.5 g/L de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

20 **[0180]** En los métodos descritos en la presente, se emplea un biorreactor o fermentador para cultivar células de levaduras oleaginosas durante las diferentes fases de su ciclo fisiológico. A modo de ejemplo, se introduce un inóculo de células de levaduras oleaginosas que producen lípido en el medio; hay un período de latencia (fase de latencia) antes de que las células comiencen a propagarse. Tras el período de latencia, la velocidad de propagación aumenta constantemente y entra en la fase logarítmica o exponencial. La fase exponencial va seguida a su vez de una ralentización de la propagación debido a la disminución de nutrientes, tales como nitrógeno, el aumento de sustancias tóxicas y los mecanismos de detección de cuórum. Después de esta ralentización, la propagación se detiene y las células entran en una fase estacionaria o estado de crecimiento constante, en función del entorno particular que se proporcione a las células. Para obtener la biomasa con un contenido lipídico elevado, el cultivo se cosecha normalmente mucho después del final de la fase exponencial, la cual puede finalizar temprano al permitir que el nitrógeno u otro nutriente fundamental (que no sea carbono) se agote, lo cual obliga a las células a convertir las fuentes de carbono, presentes en exceso, en lípido. Los parámetros de las condiciones de cultivo se pueden manipular para optimizar la producción total de aceite, la combinación de las especies de ácidos grasos producidas y/o la producción de un aceite específico.

25 **[0181]** Para producir levaduras oleaginosas con un alto contenido lipídico, las células se fermentan preferentemente en grandes cantidades en líquido tal como, por ejemplo, en cultivos en suspensión. Los biorreactores, tales como fermentadores de acero (en varias realizaciones de la invención se utilizan volúmenes de 5000 litros, 10 000 litros, 80 000 litros y volúmenes superiores), pueden dar cabida a volúmenes de cultivo muy grandes. Los biorreactores normalmente también permiten controlar las condiciones de cultivo tales como la temperatura, el pH, la tensión de oxígeno y los niveles de dióxido de carbono. Por ejemplo, habitualmente los biorreactores se pueden configurar, por ejemplo, utilizando puertos conectados a tubos, para permitir que los componentes gaseosos, como oxígeno o nitrógeno, sean burbujeados en un cultivo líquido.

30 **[0182]** Los biorreactores se pueden configurar para que los medios de cultivo fluyan a través del biorreactor durante todo el periodo de tiempo en el que las levaduras oleaginosas se reproducen y aumentan en número. En algunas realizaciones, por ejemplo, los medios se pueden infundir en el biorreactor después de la inoculación pero antes de que las células alcancen una densidad deseada. En otros ejemplos, un biorreactor se llena con los medios de cultivo al principio de un cultivo, y no se infunde más medio de cultivo después que el cultivo se haya inoculado. Es decir, la biomasa de levaduras oleaginosas se cultiva en un medio acuoso durante un período de tiempo en el que las levaduras se reproducen y aumentan en número; sin embargo, no fluye ninguna cantidad de medio de cultivo acuoso a través del biorreactor durante todo este período de tiempo. De este modo, en algunas realizaciones, el medio de cultivo acuoso no fluye a través del biorreactor después de la inoculación.

35 **[0183]** Se pueden emplear biorreactores equipados con dispositivos tales como aspas giratorias e impulsores, mecanismos de oscilación, barras de agitación, medios para la infusión de gas a presión para hacer que los cultivos de levaduras oleaginosas se mezclen. La mezcla puede ser continua o intermitente. En resumen, tal como se mencionó anteriormente, los biorreactores suelen estar equipados con diferentes puertos que permiten, por ejemplo, manipular el contenido de gas del cultivo. A modo ilustrativo, parte del volumen de un biorreactor puede ser gas en lugar de líquido y las entradas de gas del biorreactor pueden permitir el bombeo de gases al interior del biorreactor. Los gases que se pueden bombear beneficiosamente al interior de un biorreactor incluyen aire, mezclas de aire/ $\text{CO}_2$ , gases

nobles, tales como el argón, y otros gases. Los biorreactores normalmente están diseñados para que el usuario pueda controlar la velocidad de entrada de un gas en el biorreactor. Como se indicó anteriormente, el aumento del flujo de gas en un biorreactor se puede usar para aumentar la mezcla del cultivo.

5 **[0184]** El aumento del flujo de gas afecta también a la turbidez del cultivo. Se puede producir turbulencia colocando un puerto de entrada de gas por debajo del nivel de los medios de cultivo acuosos para que de este modo la entrada de gas en el biorreactor produzca burbujas en la superficie del cultivo. Uno o más puertos de salida de gas permiten que el gas se escape, de este modo se evita que la presión aumente en el biorreactor. Preferentemente, un puerto de salida de gas conduce a una válvula "unidireccional" que evita la entrada de microorganismos contaminantes en el

10 biorreactor.

**[0185]** Los ejemplos específicos de biorreactores, condiciones de cultivo, y métodos de propagación y crecimiento heterotrófico descritos en la presente se pueden combinar de cualquier manera que sea adecuada para mejorar los rendimientos del crecimiento microbiano y la producción de lípido y/o proteína.

15 **[0186]** Los cultivos de levaduras oleaginosas generados de acuerdo con los métodos descritos anteriormente producen biomasa de levaduras oleaginosas en los medios de fermentación. Para preparar esta biomasa, así como también para preparar biomasa de microalgas o de otros microbios, con el fin de extraer aceite, la biomasa se concentra o cosecha habitualmente del medio de fermentación. En el momento de la cosecha de la biomasa de levadura oleaginosas del medio de fermentación, la biomasa comprende principalmente células intactas suspendidas en un medio de cultivo acuoso. Para concentrar la biomasa, se puede llevar a cabo un paso de deshidratación. La deshidratación o concentración se refiere a la separación de la biomasa del caldo de fermentación u otro medio líquido y, por lo tanto, se trata de una separación sólido-líquido. De este modo, durante la deshidratación, el medio de cultivo se elimina de la biomasa (por ejemplo, drenando el caldo de fermentación a través de un filtro que retiene la biomasa)

20 o la biomasa se elimina del medio de cultivo. Los procesos comunes para la deshidratación incluyen centrifugación, filtración y el uso de presión mecánica. Estos procesos se pueden usar individualmente o en cualquier combinación.

**[0187]** La centrifugación implica el uso de fuerza centrífuga para separar mezclas. Durante la centrifugación, los componentes más densos de la mezcla migran lejos del eje de la centrífuga, mientras que los componentes menos densos de la mezcla migran hacia el eje. Al aumentar la fuerza de la gravedad efectiva (es decir, aumentando la velocidad de centrifugación), el material más denso, tal como sólidos, se separa del material menos denso, tal como líquidos, y así se separan de acuerdo con su densidad. La centrifugación de biomasa y caldo u otra solución acuosa forma una pasta concentrada que comprende las células de levadura oleaginosas. La centrifugación no elimina cantidades significativas de agua intracelular. De hecho, después de la centrifugación, podría haber todavía una cantidad considerable de humedad superficial o libre en la biomasa (por ejemplo, superior al 70%), por lo que la centrifugación no se considera un paso de secado.

30 **[0188]** También se puede utilizar filtración para la deshidratación. Un ejemplo de filtración que es adecuada para los métodos descritos en la presente es la filtración de flujo tangencial (FFT), conocida también como filtración de flujo cruzado. La filtración de flujo tangencial es una técnica de separación que emplea sistemas de membrana y fuerza de flujo para separar sólidos de líquidos. Para consultar un método de filtración adecuado ilustrativo, remítase a Geresh, Carb. Polym. 50; 183-189 (2002), que describe el uso de un filtro de fibra hueca de 0.45  $\mu\text{m}$  de MaxCell A/G Technologies. Consulte además, por ejemplo, los dispositivos Pellicon® de Millipore, utilizados con membranas de 100 kD, 300 kD, 1000 kD (número de catálogo P2C01MC01), 0.1  $\mu\text{m}$  (número de catálogo P2VVPV01), 0.22  $\mu\text{m}$  (número de catálogo P2GVPPV01) y 0.45  $\mu\text{m}$  (número de catálogo P2HVMPV01). Preferentemente, el volumen retenido no pasa por el filtro en un nivel significativo y, preferentemente, el producto en el volumen retenido no se adhiere al material de filtro. La FFT también se puede realizar utilizando sistemas de filtración de fibra hueca. Los filtros con un tamaño de poro de al menos aproximadamente 0.1 micrómetros, por ejemplo, aproximadamente de 0.12, 0.14, 0.16, 0.18, 0.2, 0.22, 0.45 micrómetros o al menos aproximadamente 0.65 micrómetros son adecuados. Los tamaños de poro preferidos de FFT permiten que los solutos y restos celulares del caldo de fermentación atraviesen el filtro, pero no las células microbianas.

35 **[0189]** La deshidratación se puede efectuar también aplicando una presión mecánica directamente sobre la biomasa para separar el caldo de fermentación líquido de la biomasa microbiana que sea suficiente para deshidratar la biomasa, sin provocar la lisis de las células predominantes. La presión mecánica para deshidratar la biomasa microbiana se puede aplicar usando, por ejemplo, una prensa filtradora de bandas. Una prensa filtradora de bandas es un dispositivo de deshidratación que aplica presión mecánica sobre una suspensión (p. ej., la biomasa microbiana extraída directamente del fermentador o biorreactor) la cual se hace pasar entre las dos bandas tensionadas a través de un serpentín de rodillos de diámetro decreciente. De hecho, la prensa filtradora de bandas puede dividirse en tres zonas:

40 la zona de gravedad, en la que el agua/líquido de drenaje libre se drena por acción de la gravedad a través de una banda porosa; una zona de cuña, en la que los sólidos se preparan para aplicar presión; y una zona de presión, en la que se aplica presión regulable a los sólidos drenados por gravedad.

45 **[0190]** Tras concentrar, la biomasa de levadura oleaginosas se procesa, como se describe más adelante en la presente, para prepararla con el fin de extraer el aceite.

50

55

60

65

[0191] Se ha generado biomasa de levadura oleaginosa con un porcentaje más elevado de acumulación de aceite/lípido en peso seco utilizando métodos de cultivo diferentes, incluidos los métodos conocidos en la técnica. Las levaduras oleaginosas con un porcentaje más alto de aceite/lípido acumulado son útiles en los métodos descritos en la presente. Se ha comprobado que *Candida* 107 es capaz de acumular hasta un 40% p/p de lípido en condiciones de nitrógeno limitante (Gill et al., *Appl and Environ Microbiology* (1977) págs. 231-239). Li et al. han demostrado la producción a partir de *Rhodospiridium toruloids* 44 de hasta un contenido lipídico de un 48% p/p en cultivos discontinuos (Li et al., *Enzyme and Microbial Technology* (2007) 41:312-317). Se ha demostrado que *Yarrowia lipolytica* es capaz de producir 0.44-0.54 g de lípido por gramo de biomasa cuando se utiliza grasa animal (estearina) como fuente de carbono (Panpanikolaou et al., *Appl Microbiol Biotechnol* (2002) 58:308-312).

[0192] La biomasa generada mediante los métodos de cultivo descritos en la presente y útil de acuerdo con los métodos descritos en la presente comprende al menos un 10% de aceite en peso seco. En algunas realizaciones, la biomasa comprende al menos un 25%, al menos un 50%, al menos un 55% o al menos un 60% de aceite en peso seco. En algunas realizaciones, la biomasa contiene entre un 10 y un 90% de aceite, entre un 25 y 75% de aceite, entre un 40 y un 75% de aceite o entre un 50 y un 70% de aceite en peso seco.

[0193] El aceite de la biomasa descrita en la presente o extraído de la biomasa para utilizar en los métodos y las composiciones descritos en la presente puede comprender glicerolípidos con una o más cadenas laterales de éster de ácido graso diferentes. Los glicerolípidos están compuestos por una molécula de glicerol esterificada a una, dos, o tres moléculas de ácidos grasos, que pueden tener longitudes variables y grados de saturación variables. La composición del aceite, es decir, las propiedades y proporciones de los constituyentes correspondientes a los ácidos grasos de los glicerolípidos, se pueden manipular combinando la biomasa o aceite de al menos dos especies de levadura oleaginosa distintas (o una cepa de levadura oleaginosa y otro microbio productor de aceite). En algunas realizaciones, al menos dos de las distintas especies microbianas tienen diferentes perfiles glicerolipídicos. Las distintas especies microbianas se pueden cultivar juntas o por separado, tal como se describe en la presente, preferentemente en condiciones heterotróficas, para generar los respectivos aceites. Las diferentes especies microbianas pueden contener diferentes porcentajes de distintos constituyentes correspondientes a los ácidos grasos en los glicerolípidos de la célula.

[0194] *Yarrowia lipolytica* se ha modificado genéticamente. Una realización de la invención utiliza cepas modificadas de *Yarrowia lipolytica* que contienen enzimas de modificación de lípidos para preparar aceites adecuados para usar como lubricantes y fluidos dieléctricos. En las patentes de EE. UU. N.os 7.465.565 y 7.273.746 y las solicitudes de patente de EE. UU. con número de serie 10/840579, 11/613420, 11/714377 y 11/264737 se describen ejemplos de *Yarrowia* modificada.

### III. MÉTODOS Y MATERIALES PARA LA MODIFICACIÓN GENÉTICA

[0195] Los métodos descritos en la presente se pueden llevar a la práctica utilizando microalgas recombinantes u otros microbios oleaginosos recombinantes. Esta sección describe métodos y materiales para modificar genéticamente microbios oleaginosos, tales como microalgas, específicamente células de *Prototheca* ilustrativas, con el fin de conseguir que las células huésped recombinantes sean útiles en los métodos descritos en la presente, incluidas, sin carácter limitante, células huésped de *Prototheca moriformis*, *Prototheca zopfii*, *Prototheca krugani*, y *Prototheca stagnora* recombinantes. La descripción de estos métodos y materiales se divide en subsecciones para mayor comodidad del lector. En la subsección 1, se describen métodos de transformación. En la subsección 2, se describen métodos de modificación por ingeniería genética que emplean recombinación homóloga. En la subsección 3, se describen componentes y vectores de expresión.

#### 1. Métodos de modificación – transformación

[0196] Las células se pueden transformar mediante cualquier técnica adecuada incluidas, p. ej., biolística, electroporación (remítase a Maruyama et al. (2004), *Biotechnology Techniques* 8:821-826), transformación con microesferas de vidrio y transformación con whiskers de carburo de silicio. Otro método que se puede utilizar implica la formación de protoplastos y el uso de  $\text{CaCl}_2$  y polietilenglicol (PEG) para introducir ADN recombinante en células de microalgas u otros microbios (remítase a Kim et al. (2002), *Mar. Biotechnol.* 4:63-73, que describe el uso de este método para la transformación de *Chorella ellipsoidea*). La cotransformación de microalgas se puede utilizar para introducir dos moléculas vectoriales distintas en una célula simultáneamente (remítase, por ejemplo, a Protist, diciembre de 2004;155(4):381-93).

[0197] También se pueden utilizar métodos biolísticos (remítase, por ejemplo, a Sanford, *Trends In Biotech.* (1988) 6:299-302, la patente de EE. UU. N.o 4.945.050); electroporación (Fromm et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. (EE. UU.)* (1985) 82:5824-5828), el uso de un haz de láser, microinyección o cualquier otro método capaz de introducir ADN en una microalga para transformar microbios oleaginosos, tales como una célula de *Prototheca*.

#### 2. Métodos de modificación - recombinación homóloga

**[0198]** La recombinación homóloga se refiere a la capacidad de secuencias de ADN complementarias para alinearse e intercambiar regiones de homología. En el proceso de recombinación homóloga, se introduce ADN transgénico ("donante") que contiene secuencias homólogas a las secuencias genómicas diana ("molde") en el organismo y posteriormente se somete a recombinación en el genoma en el sitio de las secuencias homólogas genómicas correspondientes. Los pasos mecanísticos de este proceso, en la mayoría de los casos, incluyen: (1) apareamiento de los segmentos de ADN homólogos; (2) introducción de rupturas bicatenarias en la molécula de ADN donante; (3) invasión de la molécula de ADN molde por parte de los extremos de ADN donante libres seguida de la síntesis de ADN; y (4) resolución de eventos de reparación de rupturas bicatenarias que dan como resultado productos finales de recombinación.

**[0199]** La capacidad para realizar una recombinación homóloga en un organismo huésped tiene muchas implicaciones prácticas sobre lo que se puede conseguir a nivel genético molecular y es útil en la generación de un microbio oleaginoso que pueda producir aceites diseñados (lípidos). Por su propia naturaleza, la recombinación homóloga es un evento de modificación dirigida a genes preciso; por lo tanto, la mayoría de las líneas transgénicas generadas con la misma secuencia de modificación dirigida serán esencialmente idénticas en términos del fenotipo, lo cual reduce el número de eventos de transformación que se deben evaluar. La recombinación homóloga también dirige eventos de inserción génica al cromosoma huésped, lo cual da como resultado una estabilidad genética excelente, incluso en ausencia de selección genética. Debido a que locus cromosómicos diferentes pueden afectar a la expresión génica, incluso de promotores/UTR heterólogos, la recombinación homóloga puede ser un método de búsqueda de locus en un entorno genómico poco familiar y de evaluación del impacto de un entorno genómico particular sobre la expresión génica.

**[0200]** Las aplicaciones de modificación por ingeniería genética particularmente útiles que emplean recombinación homóloga incorporan elementos regulatorios huésped específicos tales como promotores/UTR para dirigir la expresión génica heteróloga de un modo sumamente específico. Por ejemplo, la ablación o desactivación de genes de desaturasa/familias génicas con un gen heterólogo que codifica un marcador selectivo se puede utilizar para incrementar el porcentaje global de ácidos grasos saturados producidos en la célula huésped. El Ejemplo 4 describe los constructos de modificación dirigida por recombinación homóloga y un ejemplo práctico de ablaciones de genes de desaturasa (desactivaciones) generados en *Prototheca moriformis*. Otra estrategia para reducir la expresión de un gen endógeno es emplear un método inducido por ARN de reducción o silenciamiento de la expresión génica que incluye, sin carácter limitante, una estrategia de ARNi o antisentido, así como también una estrategia de ARNbc. Las estrategias de ARN horquillado, ARNi, ARNbc y antisentido son muy conocidas en la técnica e incluyen la introducción de un constructo de expresión que, cuando se expresa como ARNm, conduce a la formación de un ARN horquillado o un constructo de expresión que contiene una porción del gen diana que se transcribe en la orientación antisentido. Todas estas estrategias dan como resultado la reducción de la expresión del gen diana. El Ejemplo 4 también describe constructos de expresión y un ejemplo práctico de la reducción de la expresión de un gen de desaturasa delta 12 de *Prototheca moriformis* endógeno (FADc) mediante un enfoque de ARN horquillado.

**[0201]** Debido a que la recombinación homóloga es un evento de modificación dirigida a genes preciso, se puede utilizar para modificar cualquier nucleótido o nucleótidos en un gen o región de interés de forma precisa, siempre que se hayan identificado suficientes secuencias flanqueantes. Por lo tanto, la recombinación homóloga se puede utilizar como una forma de modificación de secuencias regulatorias que afectan a la expresión génica de ARN y/o proteínas. También se puede emplear para modificar regiones que codifican proteínas con el fin de modificar actividades enzimáticas tales como la Km, la especificidad y la afinidad del sustrato, de este modo se consigue el cambio deseado en el metabolismo de la célula huésped. La recombinación homóloga proporciona un medio potente para manipular el genoma huésped que da como resultado la modificación dirigida a genes, conversión génica, delección génica, duplicación génica, inversión génica y el intercambio de elementos regulatorios de la expresión génica tales como promotores, potenciadores y 3'UTR.

**[0202]** La recombinación homóloga se puede conseguir utilizando constructos de modificación dirigida que contienen trozos de secuencias endógenas cuya "diana" es el gen o región de interés en el genoma de la célula huésped endógena. Tales secuencias de direccionamiento pueden estar situadas en 5' respecto al gen o la región de interés, 3' respecto al gen/región de interés o incluso flanquear el gen/región de interés. Tales constructos de modificación dirigida se pueden transformar en la célula huésped ya sea como un ADN plasmídico superhelicoidal con una estructura principal vectorial adicional, un producto de PCR sin estructura principal vectorial o como una molécula linealizada. En algunos casos, puede ser conveniente exponer primero las secuencias homólogas del ADN transgénico (ADN donante) a una enzima de restricción. Este paso puede incrementar la eficacia de la recombinación y reducir la aparición de eventos no deseados. Otros métodos para incrementar la eficacia de la recombinación incluyen utilizar PCR para generar ADN transgénico transformante que contiene extremos lineales homólogos a las secuencias genómicas diana.

**[0203]** A efectos ilustrativos no limitantes, las regiones de secuencias de ADN donante que son útiles para la recombinación homóloga incluyen la región KE858 de ADN en *Prototheca moriformis*. KE858 es un fragmento genómico de 1.3 kb que engloba la parte de la región codificante de una proteína que comparte homología con la familia de proteínas de ARN transferente (ARNt). Los ensayos de inmunotransferencia de Southern han demostrado que la secuencia de KE858 está presente en una única copia en el genoma de *Prototheca moriformis* (UTEX 1435).

Esta región y los ejemplos de uso de esta región para la modificación dirigida por recombinación homóloga se han descrito en la solicitud de PCT N.o PCT/US2009/66142. Otra región útil de ADN donante es la secuencia genómica 6S.

### 5 **3. Vectores y componentes vectoriales**

[0204] Los vectores para la transformación de microorganismos se pueden preparar mediante técnicas con las que estarán familiarizados los expertos en la técnica en vista de la descripción de la presente. Un vector contiene normalmente uno o más genes, donde cada gen codifica la expresión de un producto deseado (el producto génico) y está unido operablemente a una o más secuencias de control que regulan la expresión génica o dirigen el producto génico a una posición particular en la célula recombinante. Para mayor comodidad del lector, esta subsección está dividida en subsecciones. La subsección A describe secuencias de control que pueden estar contenidas en vectores. La subsección B describe genes contenidos normalmente en vectores así como también métodos de optimización de codones y genes preparados utilizándolos.

#### 15 **A. Secuencias de control**

[0205] Las secuencias de control son ácidos nucleicos que regulan la expresión de una secuencia codificante o dirigen un producto génico a una posición particular en el interior o exterior de una célula. Las secuencias de control que regulan la expresión incluyen, por ejemplo, promotores que regulan la transcripción de una secuencia codificante y terminadores que detienen la transcripción de una secuencia codificante. Otra secuencia de control es una secuencia 3' no traducida situada en el extremo de una secuencia codificante que codifica una señal de poliadenilación. Las secuencias de control que dirigen productos génicos a posiciones particulares incluyen aquellas que codifican péptidos señal, que dirigen la proteína a la que están unidos a una posición particular en el interior o exterior de la célula.

[0206] Por lo tanto, un diseño de un vector ilustrativo para la expresión de un gen exógeno en una microalga u otro microbio oleaginoso contiene una secuencia que codifica un producto génico deseado (por ejemplo, un marcador seleccionable, una enzima de modificación de la vía lipídica o una enzima de utilización de sacarosa) en unión operable con un promotor activo en la microalga u otro microbio oleaginoso. Como alternativa, si el vector no contiene un promotor en unión operable con la secuencia codificante de interés, la secuencia codificante se puede transformar en las células de modo que se una operablemente a un promotor endógeno en el punto de integración del vector. Se ha demostrado que el método de transformación sin promotor funciona en microalgas (remítase, por ejemplo, a Plant Journal 14:4, (1998), págs. 441-447) y otros microbios.

[0207] Muchos promotores son activos en microalgas, incluidos promotores que son endógenos a las algas que se están transformando, así como también promotores que no son endógenos a las algas que se están transformando (es decir, promotores de otras algas, promotores de plantas superiores y promotores de virus vegetales o virus algáceos). En la publicación de PCT N.o 2008/151149 y las referencias citadas en dicho documento se describen promotores endógenos y/o exógenos ilustrativos que son activos en microalgas (así como también genes de resistencia a antibióticos funcionales en microalgas).

[0208] El promotor utilizado para expresar un gen exógeno puede ser el promotor unido de forma natural a ese gen o puede ser un promotor de un gen heterólogo. Algunos promotores son activos en más de una especie de microalgas. Otros promotores son específicos para una especie. Los promotores ilustrativos incluyen promotores tales como  $\beta$ -tubulina de *Chlamydomonas reinhardtii*, utilizados más adelante en los Ejemplos, y promotores víricos, tales como promotores derivados del virus del mosaico de la coliflor (VMC) y el virus de *Chlorella*, que se ha demostrado que son activos en múltiples especies de microalgas (remítase, por ejemplo, a Plant Cell Rep. marzo de 2005;23(10-11):727-35; J Microbiol. agosto de 2005;43(4):361-5; Mar Biotechnol (NY). enero de 2002;4(1):63-73). Otro promotor que es adecuado para utilizar para la expresión de genes exógenos en *Prototheca* es el promotor/5'UTR de la glutamato-deshidrogenasa de *Chlorella sorokiniana*. Normalmente, se utilizan al menos 10, 20, 30, 40, 50 o 60 nucleótidos o más de estas secuencias que contienen un promotor. En el listado de secuencias de esta solicitud se enumeran los promotores ilustrativos útiles para la expresión de genes exógenos en *Prototheca*, tales como el promotor del gen HUP1 de *Chlorella* (SEQ ID NO:1) y el promotor de la nitrato-reductasa de *Chlorella ellipsoidea* (SEQ ID NO:2). Los promotores del virus de *Chlorella* también se pueden utilizar para expresar genes en *Prototheca*, tales como las SEQ ID NOs: 1-7 de la patente de EE. UU. 6.395.965. Se pueden encontrar otros promotores activos en *Prototheca*, por ejemplo, en Biochem Biophys Res Commun. 14 de octubre de 1994;204(1):187-94; Plant Mol Biol. octubre de 1994;26(1):85-93; Virology. 15 de agosto de 2004;326(1):150-9; y Virology. 5 de enero de 2004;318(1):214-23.

[0209] Un promotor se puede caracterizar generalmente como constitutivo o inducible. Los promotores constitutivos son generalmente activos o funcionan para dirigir la expresión en todo momento (o en ciertos momentos durante el ciclo de la vida celular) al mismo nivel. Los promotores inducibles, por el contrario, son activos (o se modifican para inactivarlos), o se inducen o reprimen de forma significativa únicamente en respuesta a estímulos. Ambos tipos de promotores encuentran aplicación en los métodos descritos en la presente. Los promotores inducibles útiles en los métodos descritos en la presente incluyen aquellos que median la transcripción de un gen unido operablemente en respuesta a un estímulo, tal como una pequeña molécula proporcionada exógenamente (p. ej., glucosa, como en la SEQ ID NO:1), temperatura (calor o frío), carencia de nitrógeno en medios de cultivo, etc. Los promotores adecuados

pueden activar la transcripción de un gen esencialmente silencioso o incrementar, preferentemente de forma sustancial, la transcripción de un gen unido operablemente que se transcribe en un nivel bajo.

5 [0210] La inclusión de una secuencia de control correspondiente a la región de terminación es opcional y si se emplea, entonces la elección es principalmente una de conveniencia, ya que las regiones de terminación son relativamente intercambiables. La región de terminación puede ser nativa de la región de inicio de la transcripción (el promotor), puede ser nativa de la secuencia de ADN de interés o se puede obtener de otra fuente. Remítase, por ejemplo, a Chen and Orozco, Nucleic Acids Res. (1988) 16:8411.

10 [0211] Los métodos descritos en la presente también pueden emplear vectores que contienen secuencias de control y genes recombinantes que proporcionan la expresión compartimentada de un gen de interés. Los orgánulos que se emplean como dianas son cloroplastos, plástidos, mitocondrias y el retículo endoplasmático. Además, los métodos descritos en la presente también emplean secuencias de control y genes recombinantes, y vectores que los contienen descritos en la presente que proporcionan la secreción de una proteína fuera de la célula.

15 [0212] Las proteínas que se expresan en el genoma nuclear de *Prototheca* se pueden dirigir al plástido utilizando señales de direccionamiento plastídico. Se conocen secuencias de direccionamiento plastídico endógenas de *Chlorella*, tales como genes en el genoma nuclear de *Chlorella* que codifican proteínas que se dirigen al plástido; consulte, por ejemplo, los números de acceso a GenBank AY646197 y AF499684, y, en una realización, se utilizan vectores que contienen tales secuencias de control en los métodos descritos en la presente para dirigir la expresión de una proteína a un plástido de *Prototheca*.

20 [0213] Los ejemplos describen más adelante el uso de secuencias de direccionamiento plastídico de algas para dirigir proteínas heterólogas al compartimento correcto en la célula huésped. Se prepararon genotecas de ADNc utilizando células de *Prototheca moriformis* y *Chlorella protothecoides*, y se describen en la solicitud de PCT N.o PCT/US2009/066142.

25 [0214] En otra realización, la expresión de un polipéptido en *Prototheca* u otro microbio oleaginoso se dirige al retículo endoplasmático. La inclusión de una señal de selección o retención adecuada en un vector de expresión garantiza que las proteínas se retengan en el retículo endoplasmático (RE) y no se pasen posteriormente a Golgi. Por ejemplo, el vector IMPACTVECTOR1.3, de Wageningen UR- Plant Research International, incluye la señal de selección o retención muy conocida KDEL. Con este vector, la retención en el RE tiene la ventaja práctica de que se ha detectado que mejora los niveles de expresión en un quintuple o más. La principal razón por la que esto ocurre parece ser que el RE contiene concentraciones menores y/o diferentes proteasas responsables de la degradación postraslacional de proteínas expresadas que están presentes en el citoplasma. Se conocen señales de retención en el RE funcionales en microalgas verdes. Por ejemplo, remítase a Proc Natl Acad Sci U S A. 26 de abril de 2005; 102(17):6225-30.

30 [0215] En otra realización de la presente invención, un polipéptido se dirige para que se secrete fuera de la célula en los medios de cultivo. Remítase a Hawkins et al., Current Microbiology Vol. 38 (1999), págs. 335–341 para consultar ejemplos de señales de secreción activas en *Chlorella* que se pueden utilizar además en otras microalgas, tales como *Prototheca*.

### **B. Optimización de codones y genes**

35 [0216] Normalmente, un gen incluye un promotor, una secuencia codificante y secuencias de control de terminación. Cuando se prepara mediante tecnología de ADN recombinante, un gen se puede denominar casete de expresión y puede estar flanqueado por sitios de restricción para ser insertado de forma conveniente en un vector que se utiliza para introducir el gen recombinante en una célula huésped. El casete de expresión puede estar flanqueado por secuencias de ADN del genoma u otro ácido nucleico diana para facilitar la integración estable del casete de expresión en el genoma mediante recombinación homóloga. Como alternativa, el vector y su casete de expresión pueden permanecer no integrados, en cuyo caso, el vector normalmente incluye un origen de replicación, que es capaz de proporcionar replicación del ADN del vector heterólogo.

40 [0217] Un gen común presente en un vector es un gen que codifica una proteína, cuya expresión permite que la célula recombinante que contiene la proteína se diferencie de células que no expresan la proteína. Dicho gen, o su producto génico correspondiente, se denomina marcador seleccionable. Se puede emplear cualquiera de una gran variedad de marcadores seleccionables en un constructo transgénico útil para transformar *Prototheca* o cualquier otro microbio oleaginoso útil en los métodos descritos en la presente. Los ejemplos de marcadores seleccionables adecuados incluyen el gen de resistencia G418, el gen de nitrato-reductasa (remítase a Dawson et al. (1997), Current Microbiology 35:356-362), el gen de higromicina-fosfotransferasa (HPT; remítase a Kim et al. (2002), Mar. Biotechnol. 4:63-73), el gen de neomicina-fosfotransferasa y el gen ble, que confiere resistencia a la fleomicina (Huang et al. (2007), Appl. Microbiol. Biotechnol. 72:197-205). Los métodos para determinar la sensibilidad de microalgas y otros microbios oleaginosos a antibióticos son muy conocidos. Por ejemplo, remítase a Mol Gen Genet. 16 de octubre de 1996;252(5):572-9.

45 [0218] También se pueden emplear otros marcadores seleccionables que no están basados en antibióticos en un

constructo transgénico útil para transformar microalgas en general, incluidas las especies de *Prototheca*. También se pueden utilizar genes que confieren la capacidad de utilización de ciertas fuentes de carbono que previamente no podían ser utilizadas por las microalgas como marcadores seleccionables. A modo ilustrativo, las cepas de *Prototheca moriformis* normalmente crecen poco o nada en sacarosa. Utilizando un constructo que contiene un gen de sacarosa-invertasa se puede conferir la capacidad a transformantes positivos de crecer en sacarosa como sustrato de carbono.

**[0219]** A efectos de ciertas realizaciones de los métodos descritos en la presente, el vector de expresión utilizado para preparar una célula huésped recombinante incluirá al menos dos y a menudo tres genes, si uno de los genes es un marcador seleccionable. Por ejemplo, una *Prototheca* modificada genéticamente se puede preparar mediante la transformación con vectores que comprenden, además de un marcador seleccionable, uno o más genes exógenos, tales como, por ejemplo, un gen de sacarosa-invertasa o un gen de acil ACP-tioesterasa. Uno o ambos genes se pueden expresar utilizando un promotor inducible, que permite controlar el momento relativo en el que se expresen estos genes para incrementar el rendimiento lipídico y la conversión en ésteres de ácidos grasos. La expresión de dos o más genes exógenos puede estar controlada por el mismo promotor inducible o controlada por promotores inducibles (o constitutivos) diferentes. En la última situación, la expresión de un primer gen exógeno se puede inducir durante un primer periodo de tiempo (durante el cual se puede inducir o no un segundo gen exógeno) y la expresión de un segundo gen exógeno se puede inducir durante un segundo periodo de tiempo (durante el cual se puede inducir o no la expresión de un primer gen exógeno).

**[0220]** En otras realizaciones, los dos o más genes exógenos (además de cualquier marcador seleccionable) son: una acil graso-ACP-tioesterasa y una acil graso-CoA/aldehído-reductasa, cuya acción combinada proporciona un producto alcohólico. Se proporcionan además otras combinaciones de genes exógenos que incluyen, sin carácter limitante, una acil graso-ACP-tioesterasa y una acil graso-CoA-reductasa para generar aldehídos. En una realización, el vector proporciona la combinación de una acil graso-ACP-tioesterasa, una acil graso-CoA-reductasa y una aldehído graso-descarbonilasa para generar alcanos. En cada una de estas realizaciones, se pueden expresar uno o más genes exógenos utilizando un promotor inducible.

**[0221]** Otros vectores ilustrativos que expresan dos o más genes exógenos incluyen aquellos que codifican tanto un transportador de sacarosa como una enzima sacarosa-invertasa y aquellos que codifican tanto un marcador seleccionable como una sacarosa-invertasa secretada. La *Prototheca* recombinante u otra célula microalgácea o microbiana transformada con uno de los tipos de vectores produce lípidos con costos de fabricación menores debido a la capacidad adquirida de utilización de la caña de azúcar (y azúcares derivados de la caña de azúcar) como fuente de carbono. La inserción de los dos genes exógenos descritos anteriormente se puede combinar con la disrupción de la biosíntesis de polisacáridos mediante mutagénesis dirigida y/o aleatoria, que dirige un flujo de carbono incluso mayor a la producción de lípido. De modo individual y combinados, la conversión trófica, la modificación para alterar la producción de lípido y el tratamiento con enzimas exógenas alteran la composición lipídica producida por un microorganismo. La alteración puede ser un cambio en la cantidad de lípidos producidos, la cantidad de una o más especies lipídicas (ácidos grasos) producidas con relación a otras especies lipídicas y/o los tipos de especies lipídicas producidas en el microorganismo. Por ejemplo, las microalgas se pueden modificar para que produzcan una cantidad y/o un porcentaje mayor de TAG.

**[0222]** Para la expresión óptima de una proteína recombinante, es beneficioso emplear secuencias codificantes que produzcan ARNm con codones utilizados preferentemente por la célula huésped que se haya de transformar. Por lo tanto, la expresión adecuada de transgenes puede requerir que el uso de codones del transgén coincida con la preferencia codónica específica del organismo en el que el transgén se esté expresando. Los mecanismos precisos en los que se basa este efecto son muchos pero incluyen el balance adecuado de agrupaciones de ARNt aminoacilado disponibles, siendo las proteínas sintetizadas en la célula, acoplado con una traducción más eficiente del ARN mensajero transgénico (ARNm) cuando se satisface esta necesidad. Cuando el uso de codones en el transgén no se optimiza, las agrupaciones de ARNt disponibles no son suficientes para permitir una traducción eficiente del ARNm heterólogo, lo cual produce detención y terminación ribosómicas y posible inestabilidad del ARNm transgénico.

**[0223]** En la presente se describen ácidos nucleicos con codones optimizados útiles para la expresión exitosa de proteínas recombinantes en *Prototheca*. El uso de codones en especies de *Prototheca* se analizó estudiando secuencias de ADNc aisladas de *Prototheca moriformis*. Este análisis representa la interrogación sobre 24 000 codones y dio como resultado la siguiente Tabla 4.

Tabla 4. Uso de codones preferido en cepas de Prototheca.

5	Ala	GCG	345 (0.36)	Asn	AAT	8 (0.04)
		GCA	66 (0.07)		AAC	201 (0.96)
		GCT	101 (0.11)	Pro	CCG	161 (0.29)
		GCC	442 (0.46)		CCA	49 (0.09)
10	Cys	TGT	12 (0.10)		CCT	71 (0.13)
		TGC	105 (0.90)		CCC	267 (0.49)
	Asp	GAT	43 (0.12)	Gln	CAG	226 (0.82)
		GAC	316 (0.88)		CAA	48 (0.18)
15	Glu	GAG	377 (0.96)	Arg	AGG	33 (0.06)
		GAA	14 (0.04)		AGA	14 (0.02)
	Phe	TTT	89 (0.29)		CGG	102 (0.18)
20		TTC	216 (0.71)		CGA	49 (0.08)
	Gly	GGG	92 (0.12)		CGT	51 (0.09)
		GGA	56 (0.07)		CGC	331 (0.57)
		GGT	76 (0.10)	Ser	AGT	16 (0.03)
25		GGC	559 (0.71)		AGC	123 (0.22)
	His	CAT	42 (0.21)		TCG	152 (0.28)
		CAC	154 (0.79)		TCA	31 (0.06)
	Ile	ATA	4 (0.01)		TCT	55 (0.10)
30		ATT	30 (0.08)	Thr	TCC	173 (0.31)
		ATC	338 (0.91)		ACG	184 (0.38)
	Lys	AAG	284 (0.98)		ACA	24 (0.05)
		AAA	7 (0.02)		ACT	21 (0.05)
35	Leu	TTG	26 (0.04)	Val	GTG	308 (0.50)
		TTA	3 (0.00)		GTA	9 (0.01)
		CTG	447 (0.61)		GTT	35 (0.06)
		CTA	20 (0.03)	Trp	GTC	262 (0.43)
40		CTT	45 (0.06)		TGG	107 (1.00)
		CTC	190 (0.26)	Tyr	TAT	10 (0.05)
	Met	ATG	191 (1.00)		TAC	180 (0.95)
				Parada	TGA/TAG/TAA	

45  
 [0224] En otras realizaciones, el gen en el vector recombinante ha sido sometido a optimización de codones con referencia a una cepa de microalga que no sea una cepa de Prototheca u otra cepa microbiana. En la patente de EE. UU. N.o 7.135.290 se describen, por ejemplo, métodos de recodificación de genes para la expresión en microalgas. Se dispone de información adicional sobre la optimización de codones, p. ej., en la base de datos de uso de codones de GenBank.

50  
 [0225] Aunque los métodos y materiales que se describen en la presente permiten introducir cualquier gen exógeno en Prototheca u otras microalgas u otros microbios oleaginosos, los genes relacionados con la modificación de vía lipídica y la utilización de sacarosa son de particular interés para microbios incapaces de utilizarlos de forma natural o para microbios que los utilizan de forma ineficiente, tal como se discute en las siguientes secciones.

#### 60 IV. UTILIZACIÓN DE SACAROSA

60  
 [0226] En una realización, la Prototheca recombinante u otra célula microalgácea u otra célula microbiana contiene uno o más genes de utilización de sacarosa exógenos. En varias realizaciones, el gen o genes codifican una o más proteínas seleccionadas del grupo constituido por una fructocinasa, una glucocinasa, una hexocinasa, una sacarosa-invertasa y un transportador de sacarosa. Por ejemplo, la expresión de un transportador de sacarosa y una sacarosa-invertasa permite a Prototheca o a cualquier otra célula microbiana o microalgácea transportar sacarosa al interior de la célula desde los medios de cultivo e hidrolizar sacarosa para proporcionar glucosa y fructosa. Opcionalmente, se

puede expresar además una fructocinasa en casos en los que la actividad hexocinasa endógena es insuficiente para que la fosforilización de fructosa sea máxima. Algunos ejemplos de transportadores de sacarosa adecuados son los números de acceso a Genbank CAD91334, CAB92307 y CAA53390. Algunos ejemplos de fructocinasas adecuadas son los números de acceso a Genbank P26984, P26420 y CAA43322.

5  
10  
15  
**[0227]** En una realización, los métodos descritos en la presente se llevan a la práctica con una célula huésped de Prototheca que secreta una sacarosa-invertasa. La secreción de una sacarosa-invertasa obvia la necesidad de expresar un transportador que pueda transportar sacarosa a la célula. Esto se debe a que una invertasa secretada cataliza la conversión de una molécula de sacarosa en una molécula de glucosa y una molécula de fructosa, ambas de las cuales pueden ser transportadas y utilizadas por microbios útiles en los métodos descritos en la presente. Por ejemplo, la expresión de una sacarosa-invertasa (tal como SEQ ID NO:3) con una señal de secreción (tal como la de SEQ ID NO:4 (de levadura), SEQ ID NO:5 (de plantas superiores), SEQ ID NO:6 (señal de secreción consenso eucariota) y SEQ ID NO:7 (combinación de secuencia señal de plantas superiores y consenso eucariota) genera actividad invertasa fuera de la célula. La expresión de esta proteína, tal como permite la metodología de ingeniería genética descrita en la presente, permite a células que ya son capaces de utilizar glucosa extracelular como fuente de energía utilizar sacarosa como fuente de energía extracelular.

20  
25  
30  
**[0228]** Las especies de Prototheca que expresan una invertasa que es secretada en un medio que contiene sacarosa son las especies de microalgas preferidas para la producción de aceite microbiano con el fin de utilizarlo como un fluido dieléctrico u otro lubricante (para la producción de aceites alimentarios, algunos consumidores puede que prefieran aceite producido utilizando microbios no recombinantes). La expresión y el direccionamiento extracelular de esta proteína completamente activa permite a las células huésped resultantes crecer en sacarosa, mientras que sus homólogas no transformadas no pueden. Por lo tanto, la práctica de los métodos descritos en la presente puede emplear células de Prototheca recombinantes con un gen de invertasa con codones optimizados, incluido, sin carácter limitante, el gen de invertasa de levadura, integrado en su genoma de modo que el gen de invertasa se expresa tal y como se evalúa por la actividad de invertasa y la hidrólisis de sacarosa. Los genes de invertasa son útiles como marcadores seleccionables en Prototheca y otras células recombinantes de microalgas, tales como células que pueden crecer en sacarosa, mientras que sus homólogos no transformados no pueden; y los métodos para seleccionar células huésped recombinantes que emplean una invertasa como marcador seleccionable son muy valiosos para la genética molecular de algas.

35  
40  
**[0229]** La expresión exitosa de una sacarosa-invertasa en Prototheca también demuestra que se pueden expresar proteínas (recombinantes) heterólogas en una célula algácea, y transportarlas con éxito fuera de la célula y al medio de cultivo en una forma funcional y completamente activa. Por lo tanto, se dispone de métodos y reactivos para expresar una amplia y diversa gama de proteínas heterólogas en microalgas y secretarlas fuera de la célula huésped. Tales proteínas incluyen, por ejemplo, enzimas industriales tales como, por ejemplo, lipasas, proteasas, celulasas, pectinasas, amilasas, esterasas, oxidoreductasas, transferasas, lactasas, isomerasas e invertasas.

45  
50  
55  
60  
65  
**[0230]** Algunos ejemplos de sacarosa-invertasas adecuadas incluyen las identificadas con los números de acceso a Genbank CAB95010, NP\_012104 y CAA06839. A continuación, se enumeran ejemplos no limitantes de invertasas adecuadas en la Tabla 5. Las secuencias de aminoácidos para cada invertasa enumerada se incluyen en el siguiente Listado de Secuencias. En algunos casos, el gen de utilización de sacarosa exógeno adecuado para utilizar en los métodos y vectores descritos en la presente codifica una sacarosa-invertasa con un porcentaje de identidad aminoacídica de al menos un 40, 50, 60, 75 o 90% o superior respecto a una sacarosa-invertasa seleccionada de la Tabla 5.

Tabla 5. Sacarosa-invertasas.

Descripción	Organismo	N.º de acceso a GenBank	SEQ ID NO:
Invertasa	<i>Chicorium intybus</i>	Y11124	SEQ ID NO:20
Invertasa	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	AB011433	SEQ ID NO:21
beta-fructofuranosidasa (invertasa)	<i>Pichia anomala</i>	X80640	SEQ ID NO:22
Invertasa	<i>Debaryomyces occidentalis</i>	X17604	SEQ ID NO:23
Invertasa	<i>Oryza sativa</i>	AF019113	SEQ ID NO:24
Invertasa	<i>Allium cepa</i>	AJ006067	SEQ ID NO:25
Invertasa	<i>Beta vulgaris</i> subsp. <i>Vulgaris</i>	AJ278531	SEQ ID NO:26
beta-fructofuranosidasa (invertasa)	<i>Bifidobacterium breve</i> UCC2003	AAT28190	SEQ ID NO:27
Invertasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NP_012104	SEQ ID NO:8 (nucleótido)
			SEQ ID NO:28 (aminoácido)
Invertasa A	<i>Zymomonas mobilis</i>	AA038865	SEQ ID NO:29

**[0231]** La secreción de una invertasa al medio de cultivo por parte de *Prototheca* permite a las células crecer además en molasas de desecho obtenidas durante el procesamiento de la caña de azúcar al igual que en glucosa de calidad de reactivo puro; el uso de este producto de desecho de escaso valor obtenido durante el procesamiento de la caña de azúcar puede proporcionar un ahorro significativo de costos en la producción de lípidos y otros aceites. Por lo tanto, los métodos descritos en la presente pueden implicar el uso de un cultivo microbiano que contiene una población de *Prototheca* u otros microorganismos microalgáceos y un medio de cultivo que comprende (i) sacarosa y (ii) una enzima de sacarosa-invertasa. En varias realizaciones, la sacarosa del cultivo proviene de sorgo, remolacha azucarera, caña de azúcar, molasas o material celulósico despolimerizado (que puede contener opcionalmente lignina). Aunque los microbios ejemplificados en la presente se alteren de modo que puedan utilizar sacarosa, los métodos y reactivos descritos en la presente se pueden aplicar de modo que las materias primas, tales como materiales celulósicos, puedan ser utilizadas por un microbio huésped modificado con la capacidad de secretar celulasas, pectinasas, isomerasas o similares, de tal forma que los productos de ruptura de las reacciones enzimáticas ya no sean simplemente tolerados sino que sean utilizados como fuente de carbono por el huésped.

## V. MODIFICACIÓN DE LA VÍA LIPÍDICA

**[0232]** Además de alterar la capacidad de *Prototheca* (u otras células microalgáceas u otras microbianas) para utilizar materias primas, tales como materias primas que contienen sacarosa, las *Prototheca* recombinantes (u otras células microalgáceas u otras microbianas) que han sido modificadas para alterar las propiedades y/o proporciones de lípidos producidos son útiles en los métodos descritos en la presente. La vía además, o como alternativa, se puede modificar para alterar las propiedades y/o proporciones de varias moléculas de lípidos producidas mediante el procesamiento enzimático de lípidos e intermedios en la vía de ácidos grasos. En varias realizaciones, las células recombinantes tienen, en comparación con sus homólogos no transformados, un rendimiento lipídico optimizado o mayor por unidad de volumen y/o por unidad de tiempo, longitud de la cadena carbonada (p. ej., para productos químicos industriales incluidos, sin carácter limitante, fluidos dieléctricos y otras aplicaciones que requieren materia prima lipídica), número reducido de dobles o triples enlaces, opcionalmente de hasta cero, y una mayor proporción de hidrógeno:carbono de una especie particular de lípido (ácido graso) o de una población lipídica diferente.

**[0233]** En realizaciones particulares, la expresión de una o más enzimas fundamentales que controlan los puntos de ramificación en el metabolismo de síntesis de ácidos grasos se ha incrementado o reducido para mejorar la producción de lípido. El incremento se puede conseguir, por ejemplo, transformando células con constructos de expresión en los que se expresa un gen que codifica la enzima de interés, p. ej., utilizando un promotor fuerte y/o elementos potenciadores que incrementan la transcripción. Estos constructos pueden incluir un marcador seleccionable de modo que los transformantes se puedan someter a selección, el cual también se puede utilizar para amplificar el constructo y para obtener un incremento concomitante en el nivel de expresión de la enzima codificada. Los ejemplos de enzimas adecuadas para dicho incremento de acuerdo con los métodos descritos en la presente incluyen la piruvato-deshidrogenasa, que desempeña una función en la conversión de piruvato en acetil-CoA (los ejemplos, algunos de microalgas, incluyen los números de acceso a Genbank NP\_415392; AAA53047; Q1XDM1; y CAF05587). El incremento de la piruvato-deshidrogenasa puede incrementar la producción de acetil-CoA y de este modo incrementar la síntesis de ácidos grasos. La acetil-CoA-carboxilasa cataliza el paso inicial de la síntesis de ácidos grasos. Por consiguiente, esta enzima se puede incrementar para aumentar la producción de ácidos grasos (los ejemplos, de algunas microalgas, incluyen los números de acceso a Genbank BAA94752; AAA75528; AAA81471; YP\_537052; YP\_536879; NP\_045833; y BAA57908). La producción de ácidos grasos también se puede aumentar incrementando la proteína portadora de acilo (ACP), que porta las cadenas de acilo en fase de crecimiento durante la síntesis de ácidos grasos (los ejemplos, algunos de microalgas, incluyen los números de acceso a Genbank AOT0F8; P51280; NP\_849041; YP\_874433). La glicerol-3-fosfato-aciltransferasa cataliza el paso limitante de la velocidad de síntesis de ácidos grasos. El incremento de esta enzima puede hacer que la producción de ácidos grasos aumente (los ejemplos, algunos de microalgas, incluyen los números de acceso a Genbank AAA74319; AAA33122; AAA37647; P44857; y ABO94442).

**[0234]** El aumento y la reducción de la expresión de genes se puede aplicar a reguladores globales que controlan la expresión de los genes de las vías biosintéticas de ácidos grasos. Por consiguiente, se pueden incrementar o reducir uno o más reguladores globales de la síntesis de ácidos grasos, según proceda, para inhibir o aumentar, respectivamente, la expresión de una pluralidad de genes sintéticos de ácidos grasos y, por último, para incrementar la producción de lípidos. Los ejemplos incluyen proteínas de unión a elementos reguladores de esterol (SREBP), tales como SREBP-1a y SREBP-1c (por ejemplo, consulte los números de acceso a Genbank NP\_035610 y Q9WTN3).

**[0235]** Los métodos descritos en la presente también se pueden llevar a la práctica con células de *Prototheca* recombinante (o de otras microalgas u otros microbios) que han sido modificadas para contener uno o más genes exógenos que codifican enzimas de modificación de lípidos tales como, por ejemplo, acil graso-ACP-tioesterasas (remítase a la Tabla 6), acil graso-CoA/aldehído-reductasas (remítase a la Tabla 8), acil graso-CoA-reductasas, aldehído graso-decarbonilasa, aldehído graso-reductasas, desaturasas (tales como desaturasas de estearoil-ACP-desaturasas y acil graso-desaturasas) y escualeno-sintasas (consulte el número de acceso a GenBank AF205791). En algunas realizaciones, los genes que codifican una acil graso-ACP-tioesterasa y una proteína portadora de acilo coexpresada de forma natural se transforman en una célula de *Prototheca* (o de otra microalga o de otro microbio),

opcionalmente con uno o más genes que codifican otras enzimas de modificación de lípidos. En otras realizaciones, la ACP y la acil graso-ACP-tioesterasa pueden presentar afinidad la una por la otra lo cual supone una ventaja cuando se utilizan las dos juntas en los microbios y los métodos descritos en la presente, independientemente de si se coexpresan o no de forma natural en un tejido u organismo particular. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la presente invención contempla tanto pares coexpresados de forma natural de estas enzimas así como también aquellas que comparten afinidad por interactuar entre sí para facilitar la escisión de una cadena carbonada de una longitud específica de la ACP.

**[0236]** En otras realizaciones más, un gen exógeno que codifica una desaturasa se transforma en la célula de *Prototheca* (o de otra microalga u otro microbio) en conjunción con uno o más genes que codifican otras enzimas de modificación de lípidos para proporcionar modificaciones con respecto a la saturación de los lípidos. En otra realización, se sobreexpresa un gen de desaturasa endógeno (p. ej., mediante la introducción de copias adicionales del gen) en una célula de *Prototheca* (o de otra microalga u otro microbio). La estearoil-ACP-desaturasa (consulte, p. ej., los números de acceso a GenBank AAF15308; ABM45911; y AAY86086), por ejemplo, cataliza la conversión de estearoil-ACP en oleoil-ACP. El incremento de la expresión de este gen puede aumentar la proporción de ácidos grasos monosaturados producidos por una célula; mientras que la reducción puede disminuir la proporción de monoinsaturados. A efectos ilustrativos, la estearoil-ACP-desaturasa (SAD) son responsables de la síntesis de ácidos grasos C18:1 a partir de precursores C18:0. Otra familia de desaturasa son las acil graso-desaturasa (FAD), incluidas ácido graso-desaturasa delta 12. Estas desaturasa también proporcionan modificaciones con respecto a la saturación de los lípidos. A efectos ilustrativos, las delta 12 ácido graso-desaturasa son responsables de la síntesis de ácidos grasos C18:2 a partir de precursores C18:1. De forma análoga, la expresión de uno o más glicerolípido-desaturasa se puede controlar para alterar la proporción de ácidos grasos insaturados respecto a saturados tales como  $\omega$ -6-ácido graso-desaturasa,  $\omega$ -3-ácido graso-desaturasa o  $\omega$ -6-oleato-desaturasa. En algunas realizaciones, la desaturasa se puede seleccionar con referencia a una longitud de la cadena carbonada deseada, de modo que la desaturasa sea capaz de realizar modificaciones en sitios específicos dentro de un sustrato con una longitud de carbonos específica o sustratos con una longitud de carbonos comprendida dentro de un rango específico. En otra realización, si el perfil de ácidos grasos deseados es un incremento de monoinsaturados (tales como C16:1 y/o C18:1), la sobreexpresión de una SAD o la expresión de una SAD heteróloga se puede acoplar con el silenciamiento o inactivación (p. ej., mediante mutación, ARNi, ARN horquillado, desactivación de un gen de desaturasa endógeno, etc.) de una acil graso-desaturasa (FAD). El Ejemplo 4 siguiente describe la ablación dirigida o desactivación de estearoil-ACP-desaturasa y delta 12-ácido graso-desaturasa y también describe el uso de constructos antisentido de ARN horquillado para reducir la expresión de un gen de desaturasa endógeno.

**[0237]** Por lo tanto, en realizaciones particulares, los microbios de la presente invención están modificados genéticamente para expresar uno o más genes exógenos seleccionados entre una acil-ACP-tioesterasa, una acil-CoA/aldehído-reductasa, una acil graso-CoA-reductasa, una aldehído graso-reductasa, una desaturasa, un aldehído graso-descarbonilasa o una proteína portadora de acilo coexpresada de forma natural. A continuación se describen métodos de expresión adecuados para la expresión de un gen de lipasa, incluidas, entre otras, la expresión inducible y la expresión compartimentada. Una acil graso-ACP-tioesterasa escinde un ácido graso de una proteína portadora de acilo (ACP) durante la síntesis de lípidos. Mediante procesamiento enzimático adicional, el ácido graso escindido se combina a continuación con una coenzima para obtener una molécula de acil-CoA. Esta acil-CoA es el sustrato de la actividad enzimática de una acil graso-CoA-reductasa para obtener un aldehído, así como también para una acil graso-CoA/aldehído-reductasa para obtener un alcohol. El aldehído producido por acción de la acil graso-CoA-reductasa identificada anteriormente es el sustrato de la actividad enzimática adicional ya sea por una aldehído graso-reductasa para obtener un alcohol o una aldehído graso-descarbonilasa para obtener un alcano o alqueno.

**[0238]** En algunas realizaciones, los ácidos grasos, glicerolípidos o los alcoholes primarios, aldehídos, alcanos o alquenos correspondientes generados por los métodos descritos en la presente contienen 16 o 18 átomos de carbono. Los ácidos grasos preferidos para la producción de fluidos dieléctricos o los alcoholes, aldehídos, alcanos y alquenos correspondientes contienen 16-18 átomos de carbono. En ciertas realizaciones, los ácidos grasos anteriores están saturados (sin ningún enlace carbono-carbono doble o triple); monoinsaturados (un único doble enlace); poliinsaturados (dos o más dobles enlaces; y pueden ser lineales (no cíclicos) o ramificados o una mezcla de los dos tipos. Para fluidos dieléctricos, se prefieren los ácidos grasos monoinsaturados, especialmente el ácido oleico (C18:1). Para incrementar la producción de lípidos con la longitud de cadena y/o el grado de saturación deseado, se puede modificar la célula microalgácea para sobreexpresar una tioesterasa con especificidad respecto a una longitud de cadena deseada, para desactivar la producción de tioesterasa con una especificidad respecto a una longitud de cadena más corta o para reducir la expresión de tales genes, y/o para desactivar genes de desaturasa responsables del grado de saturación en los lípidos deseados.

**[0239]** Varias enzimas descritas anteriormente tienen normalmente una especificidad preferencial por la hidrólisis de un sustrato que contiene un número específico de átomos de carbono. Por ejemplo, una acil graso-ACP-tioesterasa puede tener preferencia por escindir un ácido graso con 12 átomos de carbono de la ACP. En algunas realizaciones, la ACP y la tioesterasa de longitud específica pueden tener afinidad una por la otra, lo que hace que sean particularmente útiles como una combinación (p. ej., los genes exógenos de tioesterasa y ACP se pueden coexpresar de forma natural en un tejido u organismo particular del que se derivan). Por lo tanto, en varias realizaciones, la célula de *Prototheca* recombinante (o de otra microalga u otro microbio) de la invención puede contener un gen exógeno que

codifica una proteína con especificidad para la catálisis de una actividad enzimática (p. ej., escisión de un ácido graso de una ACP, reducción de una acil-CoA para obtener un aldehído o un alcohol, o conversión de un aldehído en un alcano) con respecto al número de átomos de carbono contenidos en el sustrato. La especificidad enzimática puede ser, en varias realizaciones, respecto a un sustrato con 8-34 átomos de carbono y preferentemente 16-18 átomos de carbono.

**[0240]** Otras acil graso-ACP-tioesterasas adecuadas para utilizar con los microbios y métodos descritos en la presente incluyen, sin carácter limitante, las enumeradas en la Tabla 6.

Tabla 6. Acil graso-ACP-tioesterasas y números de acceso a GenBank

Acil graso-ACP-tioesterasa de *Umbellularia californica* (# de GenBank AAC49001)

Acil graso-ACP-tioesterasa de *Cinnamomum camphora* (# de GenBank Q39473)

Acil graso-ACP-tioesterasa de *Umbellularia californica* (# de GenBank Q41635)

Acil graso-ACP-tioesterasa de *Myristica fragrans* (# de GenBank AAB71729)

Acil graso-ACP-tioesterasa de *Myristica fragrans* (# de GenBank AAB71730)

Acil graso-ACP-tioesterasa de *Elaeis guineensis* (# de GenBank ABD83939)

Acil graso-ACP-tioesterasa de *Elaeis guineensis* (# de GenBank AAD42220)

Acil graso-ACP-tioesterasa de *Populus tomentosa* (# de GenBank ABC47311)

Acil graso-ACP-tioesterasa de *Arabidopsis thaliana* (# de GenBank NP\_172327)

Acil graso-ACP-tioesterasa de *Arabidopsis thaliana* (# de GenBank CAA85387)

Acil graso-ACP-tioesterasa de *Arabidopsis thaliana* (# de GenBank CAA85388)

Acil graso-ACP-tioesterasa de *Gossypium hirsutum* (# de GenBank Q9SQI3)

Acil graso-ACP-tioesterasa de *Cuphea lanceolata* (# de GenBank CAA54060)

Acil graso-ACP-tioesterasa de *Cuphea hookeriana* (# de GenBank AAC72882)

Acil graso-ACP-tioesterasa de *Cuphea calophylla* subsp. *mesostemon* (# de GenBank ABB71581)

Acil graso-ACP-tioesterasa de *Cuphea lanceolata* (# de GenBank CAC19933)

Acil graso-ACP-tioesterasa de *Elaeis guineensis* (# de GenBank AAL15645)

Acil graso-ACP-tioesterasa de *Cuphea hookeriana* (# de GenBank Q39513)

Acil graso-ACP-tioesterasa de *Gossypium hirsutum* (# de GenBank AAD01982)

Acil graso-ACP-tioesterasa de *Vitis vinifera* (# de GenBank CAN81819)

Acil graso-ACP-tioesterasa de *Garcinia mangostana* (# de GenBank AAB51525)

Acil graso-ACP-tioesterasa de *Brassica juncea* (# de GenBank ABI18986)

Acil graso-ACP-tioesterasa de *Madhuca longifolia* (# de GenBank AAX51637)

Acil graso-ACP-tioesterasa de *Brassica napus* (# de GenBank ABH11710)

Acil graso-ACP-tioesterasa de *Oryza sativa* (grupo-cultivar *indica*) (# de GenBank EAY86877)

Acil graso-ACP-tioesterasa de *Oryza sativa* (grupo-cultivar *japonica*) (# de GenBank NP\_001068400)

(Continuado)

5 Acil graso-ACP-tioesterasa de *Oryza sativa* (grupo-cultivar *indica*) (# de GenBank EAY99617)

Acil graso-ACP-tioesterasa de *Cuphea hookeriana* (# de GenBank AAC49269)

10 Acil graso-ACP-tioesterasa de *Oryza sativa* (grupo-cultivar *japonica*) (# de GenBank NP\_001068400)

Acil graso-ACP-tioesterasa de *Oryza sativa* (grupo-cultivar *indica*) (# de GenBank EAY99617)

15 Acil graso-ACP-tioesterasa de *Cuphea hookeriana* (# de GenBank AAC49269)

Acil graso-ACP-tioesterasa de *Ulmus Americana* (# de GenBank AAB71731)

Acil graso-ACP-tioesterasa de *Cuphea lanceolata* (# de GenBank CAB60830)

20 Acil graso-ACP-tioesterasa de *Cuphea palustris* (# de GenBank AAC49180)

Acil graso-ACP-tioesterasa de *Iris germanica* (# de GenBank AAG43858)

Acil graso-ACP-tioesterasa de *Iris germanica* (# de GenBank AAG43858.1)

25 Acil graso-ACP-tioesterasa de *Cuphea palustris* (# de GenBank AAC49179)

Acil graso-ACP-tioesterasa de *Myristica fragrans* (# de GenBank AAB71729)

Acil graso-ACP-tioesterasa de *Myristica fragrans* (# de GenBank AAB717291.1)

30 Acil graso-ACP-tioesterasa de *Cuphea hookeriana* (# de GenBank U39834)

Acil graso-ACP-tioesterasa de *Umbellularia californica* (# de GenBank M94159)

35 Acil graso-ACP-tioesterasa de *Cinnamomum camphora* (# de GenBank U31813)

Acil graso-ACP-tioesterasa de *Ricinus communis* (# de GenBank ABS30422.1)

40

45 **[0241]** Los productos químicos a base de bioaceite, tales como fluidos dieléctricos, tienen composiciones de ácidos grasos con un alto contenido en ácido oleico (C18:1) que se originan a partir de ésteres naturales (es decir, aceites seminales) tal como aceite de girasol y aceite de canola. La Tabla 7 muestra los perfiles de ácidos grasos de aceites seminales comerciales comunes. Todos los datos de aceites seminales comerciales que se muestran a continuación se compilieron de los Códigos de las Farmacopeas de Productos Químicos y Alimentos, de EE. UU. 7.a Ed. 2010-2011.

50

55

60

65

Tabla 7. Perfiles lipídicos de aceites seminales comerciales

	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:0- diOH	C18:1- OH	C18:2	C18:3 $\alpha$	
5												
10	<i>R. communis</i> (aceite de ricino)	0	0	0	0	0.9-1.6	1.0-1.8	3.7-6.7	0.4-1.3	83.6-89.0	0	0.2-0.6
15	<i>C. nucifera</i> (aceite de coco)	5.0-9.0	4.0-8.0	44-52	15-21	8.0-11.0	1.0-4.0	5.0-8.0	0	0	0-2.5	0
20	<i>Z. mays</i> (aceite de maíz)	0	0	0	< 1.0	8.0-19.0	0.5-4.0	19-50	0	0	38-65	< 2.0
25	<i>G. barbadense</i> (aceite de semilla de algodón)	0	0	< 0.1	0.5-2.0	17-29	1.0-4.0	13-44	0	0	40-63	0.1-2.1
30	<i>B. rapa, B napus, B. juncea</i> (canola)	0	0	< 0.1	< 0.2	< 6.0	< 2.5	> 50	0	0	< 40	< 14
35	<i>O. europea</i> (oliva)	0	0	0	< 0.1	6.5-20.0	0.5-5.0	56-85	0	0	3.5-20.0	< 1.2
40	<i>A. hypogaea</i> (maní)	0	0	< 0.1	< 0.2	7.0-16.0	1.3-6.5	35-72	0	0	13.0-43	< 0.6
45	<i>E. guineensis</i> (palmiste)	3.0-5.0	2.5-6.0	40-52	14.0-18.0	7.0-10.0	1.0-3.0	11.0-19.0	0	0	0.5-4.0	0
50	<i>E. guineensis</i> (palma)	0	0	0	0.5-5.9	32.0-47.0	2.0-8.0	34-44	0	0	7.2-12.0	0
55	<i>C. tinctorus</i> (cártamo)	0	0	< 0.1	< 0.1	2.0-10.0	1.0-10.0	7.0-16.0	0	0	72-81	< 1.5
60	<i>H. annus</i> (girasol)	0	0	< 0.1	< 0.5	3.0-10.0	1.0-10.0	14-65	0	0	20-75	< 0.5
65	<i>G. max</i> (soja)	0	0	< 0.1	< 0.5	7.0-12.0	2.0-5.5	19-30	0	0	48-65	5.0-10.0

(Continuado)

5	<i>L. usitatissimum</i> (lino de Solin)	0	0	< 0.1	< 0.5	2.0-9.0	2.0-5.0	8.0-60	0	0	40-80	< 5.0
10	<i>B. parkii</i> (karité)	0	0	0	0	3.8-4.1	41.2- 56.8	34.0- 46.9	0	0	3.7-6.5	0

15 **[0242]** Las acil graso-CoA/aldehído-reductas adecuadas para utilizar con los microbios y métodos descritos en la presente incluyen, sin carácter limitante, las enumerados en la Tabla 8.

Tabla 8. Acil graso-CoA/aldehído-reductas enumeradas en los números de acceso a GenBank

20 AAC45217, YP\_047869, BAB85476, YP\_001086217, YP\_580344, YP\_001280274, YP\_264583, YP\_436109,  
 YP\_959769, ZP\_01736962, ZP\_01900335, ZP\_01892096, ZP\_01103974, ZP\_01915077, YP\_924106,  
 YP\_130411, ZP\_01222731, YP\_550815, YP\_983712, YP\_001019688, YP\_524762, YP\_856798,  
 25 ZP\_01115500, YP\_001141848, NP\_336047, NP\_216059, YP\_882409, YP\_706156, YP\_001136150,  
 YP\_952365, ZP\_01221833, YP\_130076, NP\_567936, AAR88762, ABK28586, NP\_197634, CAD30694,  
 NP\_001063962, BAD46254, NP\_001030809, EAZ10132, EAZ43639, EAZ07989, NP\_001062488, CAB88537,  
 NP\_001052541, CAH66597, CAE02214, CAH66590, CAB88538, EAZ39844, AAZ06658, CAA68190,  
 CAA52019 y BAC84377

30 **[0243]** Las acil-ACP-tioesterasas son los terminadores de la biosíntesis de ácidos grasos de plantas superiores (y algunas especies de microalgas) y, en la mayoría de las especies vegetales, esto es realizado por miembros de la familia de genes FatA, cuya función es detener la elongación en la etapa de C16:0 a C18:0. En especies que sintetizan ácidos grasos de cadena más corta (tales como Cuphea, Elaeis, Myristica o Umbellularia), un grupo diferente de acil-ACP-tioesterasas codificadas por genes FatB lleva a cabo este paso de terminación.

35 **[0244]** ej., escisión de un ácido graso de una proteína portadora de acilo, reducción de una acil-CoA a un aldehído o un alcohol, o conversión de un aldehído en un alcano). En realizaciones adicionales, la actividad enzimática está presente en una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 75%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 85%, al menos aproximadamente un 90%, al menos aproximadamente un 95% o al menos aproximadamente un 99% de identidad respecto a una de las secuencias descritas anteriormente, todas las cuales se incorporan a la presente por referencia.

40 **[0245]** Seleccionando la combinación deseada de genes exógenos que se han de expresar (o genes endógenos que se han de inactivar o ambas), se puede modificar el aceite generado por el microbio, el cual se puede extraer posteriormente de la biomasa acuosa. Por ejemplo, el microbio puede contener: (i) un gen exógeno que codifica una acil graso-ACP-tioesterasa; (ii) opcionalmente, una proteína portadora de acilo coexpresada de forma natural o una proteína portadora de acilo con afinidad por la acil graso-ACP-tioesterasa; (iii) un gen de desaturasa endógeno mutado, donde la mutación desactiva el gen de desaturasa o proteína desaturasa, tal como una desactivación de desaturasa; (iv) sobreexpresión de una esteroil-proteína portadora de acilo-desaturasa endógena o la expresión de una SAD heteróloga; y (v) cualquier combinación de lo anterior.

45 **[0246]** Los genes que codifican estas enzimas, tales como acil graso-ACP-tioesterasas, se pueden obtener a partir de células de las que ya hay constancia de que exhiben una producción de lípidos significativa tal como Chlorella protothecoides. Los genes de los que hay constancia de que desempeñan una función en la producción de lípidos, p. ej., un gen que codifica a una enzima que satura dobles enlaces, se pueden transformar de forma individual en células receptoras. Los métodos para identificar genes que pueden alterar (mejorar) la producción de lípidos en microalgas se describen en la publicación de PCT N.o 2008/151149, incorporada a la presente por referencia.

50 **[0247]** Por lo tanto, en ciertas realizaciones, la práctica de la presente invención puede utilizar una célula de Prototheca o de otra microalga u otro microbio que ha sido modificada genéticamente para expresar una enzima de la vía lipídica en un nivel alterado en comparación con una célula natural de la misma especie. En algunos casos, la célula produce más lípido en comparación con la célula natural cuando ambas células se cultivan en las mismas condiciones. En algunos casos, la célula ha sido modificada genéticamente y/o seleccionada para expresar una enzima de la vía lipídica en un nivel superior que la célula natural. En algunos casos, la enzima de la vía lipídica se selecciona del grupo

constituido por piruvato-deshidrogenasa, acetil-CoA-carboxilasa, proteína portadora de acilo y glicerol-3-fosfato-aciltransferasa. En algunos casos, la célula ha sido modificada genéticamente y/o seleccionada para expresar una enzima de la vía lipídica en un nivel inferior que la célula natural. En una realización en la que la célula expresa la enzima de la vía lipídica en un nivel inferior, la enzima de la vía lipídica comprende citrato-sintasa.

5 **[0248]** En algunas realizaciones, la célula ha sido modificada genéticamente y/o seleccionada para expresar un regulador global de la síntesis de ácidos grasos en un nivel alterado en comparación con la célula natural, de modo que los niveles de expresión de una pluralidad de genes sintéticos de ácidos grasos se alteran en comparación con la célula natural. En algunos casos, la enzima de la vía lipídica comprende una enzima que modifica un ácido graso. En  
10 algunos casos, la enzima de la vía lipídica se selecciona entre una esteroil-ACP-desaturasa y una glicerolípido-desaturasa. En algunos casos, la célula ha sido modificada genéticamente y/o seleccionada para expresar un nivel inferior de una enzima de la vía lipídica o para no expresar en absoluto una enzima de la vía lipídica específica (es decir, donde una enzima de la vía lipídica que ha sido desactivada o reemplazada con un gen exógeno).

15 **[0249]** En otras realizaciones, la práctica de la presente invención utiliza un microbio que produce aceite el cual contiene uno o más genes exógenos y/o uno o más genes endógenos inactivados, donde los genes exógenos o endógenos codifican una o más proteínas seleccionadas del grupo constituido por una acil graso-ACP-tioesterasa, una acil graso-CoA-reductasa, una aldehído graso-reductasa, una acil graso-CoA/aldehído-reductasa, un aldehído graso-descarbonilasa, una desaturasa y una proteína portadora de acilo. En otra realización, un gen de desaturasa  
20 endógeno se sobreexpresa en un microbio que contiene uno o más de los genes exógenos anteriores. En una realización, el gen exógeno está en unión operable con un promotor, que se puede inducir o reprimir en respuesta a un estímulo. En algunos casos, el estímulo se selecciona del grupo constituido por una molécula pequeña proporcionada de forma exógena, calor, frío y una cantidad limitada de nitrógeno o en ausencia de este en los medios de cultivo. En algunos casos, el gen exógeno se expresa o se dirige a un compartimento celular. En algunas  
25 realizaciones, el compartimento celular se selecciona del grupo constituido por un cloroplasto, un plástido y una mitocondria. En algunas realizaciones, el microbio es *Prototheca moriformis*, *Prototheca krugani*, *Prototheca stagnora* o *Prototheca zopfii*.

30 **[0250]** En una realización, el gen exógeno o gen endógeno inactivado codifica una acil graso-ACP-tioesterasa. En algunos casos, la tioesterasa codificada por el gen exógeno o endógeno inactivado cataliza la escisión de un ácido graso de 8-18 carbonos de una proteína portadora de acilo (ACP). En algunos casos, la tioesterasa codificada por el gen exógeno o endógeno inactivado cataliza la escisión de un ácido graso de 10-14 carbonos de una ACP. En una realización, la tioesterasa codificada por el gen exógeno o endógeno inactivado cataliza la escisión de un ácido graso de 12 carbonos de una ACP. En algunas realizaciones, la tioesterasa codificada por el gen exógeno cataliza la escisión  
35 de un ácido graso de 16-18 carbonos de una ACP.

40 **[0251]** En una realización, el gen exógeno codifica una acil graso CoA/aldehído-reductasa. En algunos casos, la reductasa codificada por el gen exógeno cataliza la reducción de una acil graso-CoA de 8-18 carbonos para obtener el alcohol primario correspondiente. En algunos casos, la reductasa codificada por el gen exógeno o gen endógeno inactivado cataliza la reducción de una acil graso-CoA de 10-14 carbonos para obtener el alcohol primario correspondiente. En una realización, la reductasa codificada por el gen exógeno o endógeno inactivado cataliza la reducción de una acil graso-CoA de 12 carbonos para obtener dodecanol.

45 **[0252]** La práctica de los métodos descritos en la presente puede utilizar una célula de *Prototheca* recombinante (o de otra microalga o microbio) que contiene dos genes exógenos (o dos genes endógenos inactivados), donde un primer gen exógeno o endógeno inactivado codifica una acil graso-ACP-tioesterasa y un segundo gen exógeno o endógeno inactivado codifica una proteína seleccionada del grupo constituido por una acil graso-CoA-reductasa, una acil graso-CoA/aldehído-reductasa y una proteína portadora de acilo. En algunos casos, los dos genes exógenos están  
50 cada uno en unión operable con un promotor, que se puede inducir en respuesta a un estímulo. En algunos casos, cada promotor se puede inducir en respuesta a un estímulo idéntico, tal como una cantidad limitada de nitrógeno o en ausencia de este en los medios de cultivo. La limitación o la ausencia total de nitrógeno en los medios de cultivo estimula la producción de aceite en algunos microorganismos, tales como *Prototheca* y otras especies de microalgas y microbios, y se puede utilizar como desencadenante para inducir la producción de aceite (lípidos) hasta niveles altos. Cuando se utiliza combinado con los métodos de ingeniería genética descritos en la presente, la cantidad de lípidos en  
55 porcentaje de peso celular seco se puede incrementar hasta niveles altos tales como al menos un 30%, al menos un 40%, al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70% y al menos un 75%.

60 **[0253]** Los aceites (lípidos) novedosos y fluidos dieléctricos derivados de estos descritos en la presente son diferentes de otros aceites naturales con un alto contenido de ácidos grasos C16 y C18, tales como aceite de girasol y canola.

**[0254]** Además, en las realizaciones en las que se desean aceites con una longitud de cadena más larga, la expresión de uno o más genes TE con una longitud de cadena más corta (es decir, menor de C14, tal como C12, C10 y/o C8) y/o ACP correspondientes se reduce (alterando su expresión) o se elimina (mediante una desactivación, por ejemplo).

65 **[0255]** En las diferentes realizaciones descritas anteriormente, la célula de *Prototheca* (o de otra microalga u otro microbio) puede contener al menos un gen exógeno o al menos un gen endógeno inactivado (o modificado para reducir

la expresión) que codifica una enzima de la vía lipídica. En algunos casos, la enzima de la vía lipídica se selecciona del grupo constituido por una esteroil-ACP-desaturasa, una ácido graso-desaturasa, una glicerolípido-desaturasa, una piruvato-deshidrogenasa, una acetil-CoA-carboxilasa, una proteína portadora de acilo y una glicerol-3-fosfato-aciltransferasa. En otros casos, la célula de *Prototheca* u otra célula contiene una enzima de modificación de lípidos seleccionada del grupo constituido por una acil graso-ACP-tioesterasa, una acil graso-CoA/aldehído-reductasa, un acil graso-CoA-reductasa, un aldehído graso-reductasa, un aldehído graso-descarbonilasa y/o una proteína portadora de acilo.

## VI. PRODUCCIÓN DE ACEITE MICROBIANO Y PRODUCTOS DERIVADOS DE ESTE

### 1. Producción de aceite microbiano

**[0256]** Para producir aceite microbiano de acuerdo con los métodos descritos en la presente, el aceite bruto no procesado (lípidos) producido por células microbianas se cosecha o se recoge mediante cualquier método conveniente. El aceite se puede aislar mediante extracción celular total, por ejemplo. En este método, las células se someten primero a disrupción y después se pueden separar los lípidos asociados con la pared celular/membrana celular e intracelular y ácidos grasos así como también hidrocarburos extracelulares de la masa celular, tal como mediante el uso de centrifugación descrito anteriormente. Los lípidos intracelulares producidos en microorganismos, en muchas realizaciones, se extraen después o durante el proceso de lisis de las células microbianas.

**[0257]** Más específicamente, una vez finalizado el cultivo, los microorganismos se separan normalmente del caldo de fermentación. Habitualmente, la separación se efectúa mediante centrifugación para generar una pasta concentrada de biomasa microbiana. A continuación, la biomasa se puede lavar opcionalmente con una solución de lavado (p. ej., agua DI) para eliminar el caldo de fermentación y los desechos. Opcionalmente, la biomasa microbiana lavada se podría secar también (secado en el horno, liofilizado, etc.) antes de la disrupción celular. Por otra parte, las células se pueden lisar sin separarlas de parte o todo el caldo de fermentación cuando la fermentación haya finalizado. Por ejemplo, las células pueden estar en una proporción inferior a 1:1 (V:V) de células respecto al líquido extracelular cuando las células se lisan.

**[0258]** Los microorganismos que contienen un lípido se pueden lisar para producir un lisado. Tal como se indica en la presente, el paso de lisis de un microorganismo (denominado también lisis celular) se puede conseguir mediante cualquier método conveniente, incluidas la lisis termoinducida, adición de una base, adición de un ácido, utilizando enzimas tales como proteasas y enzimas de degradación de polisacáridos, tales como amilasas, utilizando ultrasonidos, lisis mecánica, utilizando choque osmótico, infección con un virus lítico y/o expresión de uno o más genes líticos. La lisis se lleva a cabo para liberar moléculas intracelulares que han sido producidas por el microorganismo. Cada uno de estos métodos para la lisis de un microorganismo se puede usar como método único o en combinación simultánea o secuencial. El alcance de la disrupción celular se puede observar por análisis microscópico. Mediante uno o más de los métodos descritos anteriormente, se observa normalmente más de un 70% de ruptura celular. Preferentemente, la ruptura celular es superior a un 80%, más preferentemente superior a un 90% y aún más preferentemente aproximadamente un 100%.

**[0259]** En realizaciones particulares, el microorganismo se lisa después del cultivo, por ejemplo, para incrementar la exposición del aceite microbiano para la extracción o procesamiento posterior. Si se utiliza un gen de lipasa exógeno, el momento de la expresión de la lipasa (p. ej., a través de un promotor inducible) o lisis celular se puede ajustar para optimizar el rendimiento de lípidos y/o hidrocarburos. A continuación, se describen varias técnicas de lisis. Estas técnicas se pueden usar individualmente o en cualquier combinación.

**[0260]** En una realización de la presente invención, el paso de lisis de un microorganismo comprende calentar una suspensión celular que contiene el microorganismo. En esta realización, el caldo de fermentación que contiene los microorganismos (o una suspensión de microorganismos aislada del caldo de fermentación) se calienta hasta que los microorganismos, es decir, las paredes y membranas celulares de microorganismos, se degradan o rompen. Normalmente, las temperaturas aplicadas son de al menos 50 oC. Se utilizan temperaturas superiores, tales como de al menos 30 oC, al menos 60 oC, al menos 70 oC, al menos 80 oC, al menos 90 oC, al menos 100 oC, al menos 110 oC, al menos 120 oC o al menos 130 oC o superiores, para una lisis celular más eficiente. La lisis celular por tratamiento térmico se puede realizar hirviendo el microorganismo. Como alternativa, el tratamiento término (sin hervir) se puede realizar en un autoclave. El lisado termotratado se puede enfriar para el tratamiento posterior. La disrupción celular también se puede realizar mediante un tratamiento con vapor, es decir, mediante la adición de vapor presurizado. Por ejemplo, en la patente de EE. UU. N.º 6.750.048 se describe el tratamiento con vapor de microalgas para la disrupción celular. En algunas realizaciones, el tratamiento con vapor se puede conseguir inyectando vapor en el fermentador y manteniendo el caldo a una temperatura deseada durante menos de aproximadamente 90 minutos, preferentemente menos de aproximadamente 60 minutos y más preferentemente menos de aproximadamente 30 minutos.

**[0261]** En otra realización de la presente invención, el paso de lisis de un microorganismo comprende añadir una base

a una suspensión celular que contiene el microorganismo. La base debe ser suficientemente fuerte para hidrolizar al menos una porción de los compuestos proteicos de los microorganismos utilizados. Las bases que son útiles para solubilizar proteínas se conocen en la técnica de la química. Las bases ilustrativas que son útiles en realizaciones de los métodos de la presente invención incluyen, sin carácter limitante, hidróxidos, carbonatos y bicarbonatos de litio, sodio, potasio, calcio y mezclas de estos. Una base preferida es KOH. Por ejemplo, en la patente de EE. UU. N.º 6.750.048 se describe el tratamiento con base de microalgas para la disrupción celular.

**[0262]** En otra realización de la presente invención, el paso de lisis de un microorganismo comprende añadir un ácido a una suspensión celular que contiene el microorganismo. La lisis ácida se puede conseguir utilizando un ácido en una concentración de 10-500 mN o preferentemente 40-160 nM. La lisis ácida se realiza preferentemente a una temperatura superior a la temperatura ambiente (p. ej., a 40-160 °C, es decir, una temperatura de 50-130 °C). Para temperaturas moderadas (p. ej., de temperatura ambiente a 100 °C y particularmente de temperatura ambiente a 65 °C), el tratamiento ácido se puede combinar de forma útil con sonicación u otros métodos de disrupción celular.

**[0263]** En otra realización de la presente invención, el paso de lisis de un microorganismo comprende lisar el microorganismo utilizando una enzima. Las enzimas preferidas para lisar un microorganismo son proteasas y enzimas que degradan polisacáridos tales como hemicelulasa (p. ej., hemicelulasa de *Aspergillus niger*; Sigma Aldrich, St. Louis, MO; #H2125), pectinasa (p. ej., pectinasa de *Rhizopus* sp.; Sigma Aldrich, St. Louis, MO; #P2401), Mannaway 4.0 L (Novozymes), celulasa (p. ej., celulasa de *Trichoderma viride*; Sigma Aldrich, St. Louis, MO; #C9422) y driselasa (p. ej., driselasa de *Basidiomycetes* sp.; Sigma Aldrich, St. Louis, MO; #D9515).

**[0264]** En otras realizaciones de la presente invención, la lisis se consigue utilizando una enzima tal como, por ejemplo, una celulasa tal como una enzima que degrada polisacáridos, opcionalmente de *Chlorella* o un virus de *Chlorella*, y/o una proteasa, tal como proteasa de *Streptomyces griseus*, quimotripsina, proteinasa K, proteasas enumeradas en *Degradation of Polylactide by Commercial Proteases*, Oda Y et al., *Journal of Polymers and the Environment*, Volumen 8, Número 1, enero de 2000, págs. 29-32(4), Alcalase 2.4 FG (Novozymes) y Flavourzyme 100 L (Novozymes). También se puede utilizar cualquier combinación de una proteasa y una enzima que degrada polisacáridos, incluida cualquier combinación de las proteasas precedentes y enzimas que degradan polisacáridos.

**[0265]** En otra realización, la lisis se puede realizar utilizando una prensa de tornillo. En este proceso, la biomasa se impulsa a través de un dispositivo de tipo tornillo a una presión elevada, lisando las células, y haciendo que el lípido intracelular se libere y se separe de la proteína y fibra (y el resto de los componentes) de la célula.

**[0266]** En otra realización de la presente invención, el paso de lisis de un microorganismo se realiza utilizando ultrasonidos, es decir, sonicación. Por lo tanto, las células también se pueden lisar con sonidos de alta frecuencia. Los sonidos se pueden producir electrónicamente y transportar a través de un ápice metálico hasta una suspensión celular concentrada de forma apropiada. Esta sonicación (o ultrasonificación) provoca la disrupción de la integridad celular debido a la creación de cavidades en la suspensión celular.

**[0267]** En otra realización de la presente invención, el paso de lisis de un microorganismo se realiza mediante lisis mecánica. Las células se pueden lisar mecánicamente y opcionalmente homogeneizar para facilitar la separación de los hidrocarburos (p. ej., lípido). Por ejemplo, se puede emplear un desestabilizador de la presión para bombear una célula que contiene la suspensión a través de una válvula con un orificio restringido. Se aplica alta presión (de hasta 1500 bares), seguida por una expansión instantánea a través de una boquilla de salida. La disrupción celular se consigue mediante tres mecanismos diferentes: el impacto sobre la válvula, la alta tensión de cizalla del líquido en el orificio y la reducción repentina de la presión durante la descarga, lo cual hace que la célula reviente. El método libera moléculas intracelulares. Como alternativa, se puede usar un molino de bolas. En un molino de bolas, las células se agitan en suspensión con partículas abrasivas pequeñas, tales como microesferas. Las células se rompen debido a fuerzas de cizalla, molienda entre las microesferas y colisiones con las microesferas. Las microesferas rompen las células para que se libere el contenido celular. Las células también se pueden romper por acción de fuerzas de cizalla, tal como empleando un mezclador (tal como, por ejemplo, una licuadora Waring o de alta velocidad), una prensa francesa o incluso con centrifugación, cuando las paredes celulares sean débiles, para romper las células.

**[0268]** En otra realización de la presente invención, el paso de lisis de un microorganismo se realiza aplicando un choque osmótico (es decir, suspendiendo las células del microorganismo en una solución hipotónica).

**[0269]** En otra realización de la presente invención, el paso de lisis de un microorganismo comprende infectar el microorganismo con un virus lítico. Se conocen una amplia gama de virus que lisan microorganismos adecuados para utilizar los métodos descritos en la presente, y la selección y el uso de un virus lítico particular para un microorganismo particular entra dentro de las competencias de la técnica. Por ejemplo, el virus de *paramecium bursaria chlorella* (PBCV-1) es el prototipo de un grupo (familia Phycodnaviridae, género Chlorovirus) de virus con ADN bicatenario, formadores de placas, icosaédricos y grandes que lisan y se replican en ciertas algas verdes similares a *Chlorella* eucariotas e unicelulares. Por consiguiente, cualquier microalga sensible se puede lisar infectando el cultivo con un virus de *Chlorella* adecuado. Se conocen métodos para infectar especies de *Chlorella* con un virus de *Chlorella*. Remítase, por ejemplo, a *Adv. Virus Res.* 2006;66:293-336; *Virology*, 25 de abril de 1999;257(1):15-23; *Virology*, 5 de enero de 2004;318(1):214-23; *Nucleic Acids Symp. Ser.* 2000;(44):161-2; *J. Virol.* marzo de 2006;80(5):2437-44; y

Annu. Rev. Microbiol. 1999;53:447-94.

**[0270]** En otra realización de la presente invención, el paso de lisis de un microorganismo comprende la autólisis. En esta realización, un microorganismo se modifica genéticamente para que produzca una proteína lítica que lisará el microorganismo. Este gen lítico se puede expresar utilizando un promotor inducible, de modo que las células se pueden cultivar primero hasta una densidad deseada en un fermentador y a continuación se induce el promotor para expresar el gen lítico que lisará las células. En una realización, el gen lítico codifica una enzima que degrada polisacáridos. En ciertas realizaciones diferentes, el gen lítico es un gen que proviene de un virus lítico. Así pues, por ejemplo, un gen lítico de un virus de *Chlorella* se puede expresar en una célula algácea; remítase a *Virology* 260, 308-315 (1999); *FEMS Microbiology Letters* 180 (1999) 45-53; *Virology* 263, 376-387 (1999); y *Virology* 230, 361-368 (1997). La expresión de genes líticos se realiza preferentemente utilizando un promotor inducible, tal como un promotor activo en microalgas el cual se induce mediante un estímulo tal como la presencia de una pequeña molécula, luz, calor y otros estímulos.

**[0271]** Se dispone de varios métodos para separar lípidos de lisados celulares producidos mediante los métodos anteriores. Por ejemplo, se pueden extraer lípidos y derivados de lípidos, tales como aldehídos grasos, alcoholes grasos e hidrocarburos, tales como alcanos, con un disolvente hidrófobo tal como hexano (remítase a Frenz et al. 1989, *Enzyme Microb. Technol.*, 11:717). También se pueden extraer lípidos y derivados de lípidos utilizando licuación (remítase, por ejemplo, a Sawayama et al. 1999, *Biomass and Bioenergy* 17:33-39 e Inoue et al. 1993, *Biomass Bioenergy* 6(4):269-274); licuación de aceite (remítase, por ejemplo, a Minowa et al. 1995, *Fuel* 74(12):1735-1738); y extracción de CO<sub>2</sub> supercrítico (remítase, por ejemplo, a Mendes et al. 2003, *Inorganica Chimica Acta* 356:328-334). Miao y Wu describen un protocolo para la recuperación de lípidos microalgáceos a partir de un cultivo de *Chlorella protothecoides*, en el que las células se cosecharon por centrifugación, se lavaron con agua destilada y se secaron por liofilización. El polvo celular resultante se pulverizó en un mortero y después se extrajo con n-hexano. Miao y Wu, *Biosource Technology* (2006) 97:841-846.

**[0272]** Por lo tanto, se pueden recuperar lípidos, derivados de lípidos e hidrocarburos generados por los microorganismos descritos en la presente extrayendo con un disolvente orgánico. En algunos casos, el disolvente orgánico preferido es hexano. Normalmente, el disolvente orgánico se añade directamente al lisado sin separar previamente los componentes del lisado. En una realización, el lisado generado mediante uno o más de los métodos descritos anteriormente se pone en contacto con un disolvente orgánico durante un período de tiempo suficiente para permitir que los componentes lipídicos y/o hidrocarbonados formen una solución con el disolvente orgánico. En algunos casos, además la solución se puede refinar posteriormente para recuperar de manera específica los componentes lipídicos o hidrocarbonados deseados. Los métodos de extracción con hexano son muy conocidos en la técnica.

**[0273]** Otros métodos para extraer lípidos de microorganismos se describen en la solicitud de patente N.o US10/031108, incorporada a la presente por referencia.

**[0274]** Los lípidos y derivados de lípidos, tales como aldehídos grasos, alcoholes grasos e hidrocarburos, tales como alcanos, producidos por las células tal como se describe en la presente se pueden modificar utilizando una o más enzimas, incluida una lipasa. Cuando los hidrocarburos están en el entorno extracelular de las células, la enzima o las enzimas se pueden añadir al entorno en condiciones en las que la enzima modifique el hidrocarburo o complete su síntesis a partir de un precursor de hidrocarburos. Como alternativa, los hidrocarburos se pueden aislar parcial o completamente del material celular antes de añadir uno o más catalizadores tales como enzimas. Tales catalizadores se añaden exógenamente y su actividad ejerce en el exterior de la célula o in vitro.

## **2. Procesamiento posterior del aceite microbiano**

**[0275]** Así pues, los lípidos o hidrocarburos producidos por las células in vivo o modificados enzimáticamente in vitro, tal como se describe en la presente, opcionalmente se pueden procesar posteriormente de un modo convencional. El procesamiento puede incluir "craqueo" para reducir el tamaño e incrementar de este modo la proporción de hidrógeno:carbono de las moléculas hidrocarbonadas. Los métodos de craqueo catalítico y térmico se utilizan habitualmente en el procesamiento de aceites triglicéridos e hidrocarbonados. Los métodos catalíticos implican el uso de un catalizador, tal como un catalizador ácido sólido. El catalizador puede ser sílice-alúmina o una zeolita, que produce la ruptura asimétrica o heterolítica de un enlace carbono-carbono para dar como resultado un carbocatión y un anión hidruro. Estos intermedios reactivos experimentan posteriormente una transposición o transferencia de hidruro con otro hidrocarburo. Las reacciones pueden regenerar de este modo los intermedios para dar como resultado un mecanismo de cadena autopropagante. Los hidrocarburos también se pueden procesar para reducir, opcionalmente hasta cero, el número de dobles o triples enlaces carbono-carbono que estos contengan. Los hidrocarburos también se pueden procesar para eliminar o retirar un anillo o estructura cíclica que estos contengan. Los hidrocarburos también se pueden procesar para incrementar la proporción de hidrógeno:carbono. Esto puede incluir la de la adición de hidrógeno ("hidrogenación") y/o el "craqueo" de hidrocarburos para obtener hidrocarburos más pequeños.

**[0276]** Una vez que se han extraído los lípidos, estos se pueden someter, de acuerdo con los métodos descritos en la

presente, a uno o más pasos de procesamiento. Estos pasos de procesamiento son diferentes de los pasos de refinación que se realizan sobre el crudo (p. ej., petróleo y otras fuentes) en la producción de combustibles. Estos pasos de procesamiento en algunos aspectos son comparables con los que se realizan sobre los aceites seminales durante la producción de aceite apto para el consumo humano. En algunas realizaciones, los lípidos extraídos se desgoman para extraer lecitina y otros fosfolípidos. En otras realizaciones, los lípidos extraídos se refinan utilizando una base o un metal alcalino. En otras realizaciones más, los lípidos extraídos se hacen pasar a través de arcilla decolorante, normalmente una arcilla ácida. En otras realizaciones, los lípidos extraídos se desodorizan para eliminar o reducir las impurezas volátiles tales como aldehídos y cetonas. En otras realizaciones más, los lípidos extraídos se winterizan para eliminar o reducir las ceras o grasas saturadas. Los pasos de procesamiento anteriores se pueden realizar combinados de cualquier forma sobre los lípidos extraídos, dependiendo de las características del producto deseado. Los lípidos extraídos que han sido refinados (p. ej., con una base o un metal alcalino), decolorados (p. ej., con una arcilla decolorante) y/o desodorizados se suelen denominar aceite RBD. El aceite RBD producido a partir de lípidos extraídos de microalgas y/o levaduras oleaginosas descritas en la presente es útil en diversas aplicaciones industriales, incluida la producción de fluidos dieléctricos.

**[0277]** En algunas realizaciones, la desgomación se realiza para eliminar contaminantes, tales como fosfolípidos, del aceite. En algunas realizaciones de la invención, la desgomación del aceite extraído forma parte de la refinación, decoloración y desodoración (o RBD). El proceso RBD elimina o reduce el olor, color y/o sabor del aceite extraído. En algunas realizaciones, el proceso de refinación normalmente consiste en dos etapas: desgomación y un paso de neutralización que elimina los ácidos grasos libres (FFA, por sus siglas en inglés) del aceite mediante separación cáustica con hidróxido de sodio. El paso de decoloración puede implicar mezclar el aceite con varias arcillas decolorantes para que absorban color, metales traza y compuestos de azufre. El paso de desodorización puede ser un proceso de destilación que tiene lugar a baja presión y temperatura elevada. En un proceso de destilación ilustrativo, el aceite se somete a vacío y se calienta con una corriente para eliminar cualquier sabor u olor residual y FFA. La desodorización también se puede conseguir por tratamiento con carbón activo.

**[0278]** Los pasos enumerados anteriormente pueden servir para reducir el punto de fluidez. En varias realizaciones, el punto de fluidez del aceite microbiano (lípido) se puede reducir hasta aproximadamente -10 oC, aproximadamente -15 oC, aproximadamente -20 oC, aproximadamente -25 oC, aproximadamente 30 oC, aproximadamente -35 oC o aproximadamente -40 oC. Además, el punto de fluidez del aceite microbiano puede estar comprendido dentro de cualquier rango limitado por cualquiera de estos valores, p. ej., de aproximadamente -10 oC a -40 oC o de aproximadamente -15 oC a aproximadamente -35 oC, etc. La reducción del punto de fluidez se puede producir porque estos pasos reducen la proporción relativa de la fracción saturada, que consiste fundamentalmente en triglicéridos palmíticos y esteáricos, conocidos como la fracción estearínica. El fraccionamiento del aceite reduce la concentración de triglicéridos saturados del aceite. El fraccionamiento se puede realizar mediante fraccionamiento en seco, como en el proceso de winterización conocido en la industria del aceite vegetal. En este proceso, el aceite microbiano (p. ej., algáceo) primero se refina, decolora y desodoriza mediante métodos similares a los utilizados en la industria del aceite vegetal. De este modo se obtiene aceite con un punto de fluidez comprendido en el rango de -5 a -10 oC, por ejemplo, -8 oC.

**[0279]** Posteriormente se puede reducir la temperatura del aceite RBD de una forma controlada hasta que se forman núcleos cristalinos. A continuación, el aceite se mantiene a esta temperatura de cristalización durante varias horas para fomentar el crecimiento de cristales. Los cristales se retiran posteriormente mediante filtración para obtener dos fracciones: una fase sólida que contiene parte o gran parte de la fracción estearínica y una fase líquida que contiene la mayor parte de la fracción oleínica. De este modo se obtiene aceite con un punto de fluidez comprendido en el rango de -8 a -15 oC, por ejemplo, -11 oC. La fase líquida se puede someter de nuevo a fraccionamiento hasta una temperatura de cristalización menor para obtener una eliminación adicional de estearina. La fracción líquida purificada resultante, equivalente a una superoleína, nombre con el que se le conoce habitualmente en la industria del aceite vegetal, tiene unas propiedades térmicas mejores que las del aceite microbiano nativo. Por ejemplo, un segundo fraccionamiento puede dar como resultado un aceite con un punto de fluidez comprendido en el rango de -15 oC a -25 oC, por ejemplo, -20 oC. El aceite resultante es excepcionalmente útil en varias aplicaciones.

### 3. Productos derivados de aceites microbianos

**[0280]** Los aceites microbianos descritos en la presente también se pueden utilizar para producir productos, tales como lubricantes, fluidos hidráulicos, aceites industriales o fluidos dieléctricos. Los aceites industriales comunes incluyen lubricantes para barras de motosierras, fluidos de metalistería, lubricantes aptos para el uso alimentario, aceites para engranajes, aceites marinos, lubricantes para motores, aceites para tractores, lubricantes para maquinaria agrícola, aceites para elevadores, aceites desmoldantes y similares. Los fluidos dieléctricos se utilizan habitualmente para enfriar y/o aislar eléctricamente componentes eléctricos (especialmente en equipo de distribución de energía eléctrica de alto voltaje), tales como, por ejemplo, autorreconectores, condensadores, disyuntores, cables de transmisión rellenos de fluido de alto voltaje, componentes de distribución de potencia, conmutador (p. ej., un disyuntor automático de alto voltaje, tal como los descritos en USPN 6.797.909), transformadores, componentes de transmisión y reguladores del voltaje.

**[0281]** Los fluidos dieléctricos tradicionales incluyen los lubricantes a base de aceite mineral. Estos incluyen aceites base del Grupo 1, II y II+, que son aceites base de petróleo que han sido refinados de forma convencional o hidrotratados ligeramente y tienen un índice de viscosidad (IV) inferior a 120. Estos también incluyen aceites base del Grupo III (incluido el "aceite de motor sintético" en los EE. UU.) que son productos oleosos convencionales muy refinados. Los aceites base del Grupo III se pueden preparar mediante hidroprocesamiento (hidrocraqueo y/o hidroisomerización) de aceites base del Grupo 1 o Grupo II/II+, y contienen menos saturados, azufre, y nitrógeno que los aceites base del Grupo I, II o II+, y tienen un IV superior a 120. La Sociedad Estadounidense para Pruebas de Materiales (ASTM, por sus siglas en inglés) establece especificaciones para fluidos dieléctricos y otras composiciones hidrocarbonadas (tales como combustible diésel (D975 de la ASTM), turbosina (D1655 de la ASTM) y biodiésel (D6751 de la ASTM)) de acuerdo con cualquiera de varios factores, tales como el punto de ebullición, índice de cetano, punto de enturbiamiento, punto de inflamación, viscosidad, punto de anilina, contenido de azufre, contenido de agua, contenido de cenizas, corrosión en lámina de cobre y residuo carbonoso.

**[0282]** Los fluidos dieléctricos de origen biológico se pueden preparar mediante diversos procesos. Por ejemplo, un proceso, que parte de aceite vegetal crudo implica el paso de desgomación, refinación alcalina, decoloración, desodorización, hidrogenación, winterización (para obtener aceite vegetal RBD), tratamiento con una arcilla para eliminar compuestos polares traza y materiales ácidos (remítase a la patente de EE. UU. N.º 6.274.067) y combinación con aditivos para producir fluidos dieléctricos de origen biológico.

**[0283]** Las propiedades fundamentales de los fluidos dieléctricos incluyen: viscosidad, inflamabilidad, reactividad, miscibilidad, capacidad de aislamiento eléctrico, biodegradabilidad y costos de fabricación. Aunque estas y otras propiedades se revisen a continuación, el lector podrá apreciar mejor algunas de las ventajas de ciertas realizaciones de la presente invención comprendiendo algunas de las ventajas y desventajas de fluidos dieléctricos de origen biológico tradicionales frente a fluidos dieléctricos a base de aceite mineral. Para la viscosidad, los fluidos dieléctricos de origen biológico generalmente tienen una viscosidad y un punto de fluidez superiores y, por lo tanto, peores propiedades a temperaturas bajas en comparación con los fluidos dieléctricos a base de aceite mineral. Sin embargo, la viscosidad de estos últimos puede variar de lote a lote debido a la incoherencia entre los compuestos en diferentes fuentes de aceite mineral y debido a su complejidad. Los fluidos dieléctricos de origen biológico por lo general tienen puntos de inflamación y combustión superiores (de al menos el doble) en comparación con los fluidos dieléctricos a base de aceite mineral. Los fluidos dieléctricos de origen biológico por lo general tienen una estabilidad hidrolítica, térmica y oxidativa inferior, y un índice de acidez superior (de al menos el doble) en comparación con los fluidos dieléctricos a base de aceite mineral. Los fluidos dieléctricos de origen biológico son por lo general más biodegradables y tienen una toxicidad inferior en comparación con los fluidos dieléctricos a base de aceite mineral, y están hechos de una fuente renovable, en vez de perecedera. La producción de fluidos dieléctricos de origen biológico generalmente es más costosa y requiere más aditivos en comparación con los fluidos dieléctricos a base de aceite mineral.

**[0284]** Los métodos de la presente invención proporcionan nuevos fluidos dieléctricos que, en ciertas realizaciones, tienen todas las ventajas de los fluidos dieléctricos de origen biológico tradicionales con menos, y en algunas realizaciones con ninguno, de los inconvenientes. Estas y otras ventajas de los presentes métodos se podrán apreciar mejor teniendo en cuenta la siguiente discusión de las propiedades generales de los fluidos dieléctricos.

**[0285]** Idealmente, la viscosidad de un fluido dieléctrico debería variar lo menos posible con la temperatura. La viscosidad es una medida de la resistencia de un fluido a fluir o a esfuerzos de cizalla ("espesor") y se mide como viscosidad cinemática (kv) y absoluta (dinámica) (cSt o mm<sup>2</sup>/s a 40 y 100 °C). (D2270-04 de la ASTM; D445 de la ASTM; D88 de la ASTM). En general, se prefiere el lubricante menos viscoso que separe de forma adecuada dos superficies en movimiento. La viscosidad se considera a veces la característica más importante de un fluido hidráulico. Si la viscosidad es demasiado elevada, entonces la fricción, la caída de presión, el consumo de energía y la generación de calor aumentan. Si la viscosidad es demasiado baja, entonces puede que como resultado de esto las fugas internas aumenten a temperaturas operacionales superiores. La película oleosa puede ser insuficiente para prevenir el desgaste excesivo o el posible agarramiento de las partes móviles. Las viscosidades ilustrativas (en unidades cSt) de fluidos dieléctricos derivados de diversas fuentes son: derivados de aceite mineral: 20 a 40 °C y 4 a 100 °C; derivados de aceite de soja: 30 a 40 °C y 7.6 a 100 °C; derivados de aceite de girasol: 40 a 40 °C y 8.7 a 100 °C; y derivados de aceite de colza (canola): 33 a 40 °C. (Siniawski et al.; J. Synthetic Lubrication; 24, 101-110 (2007); Schneider; J. Sci. Food Agric., 86, 1769-1780 (2006)). Los métodos de la presente invención pueden, en realizaciones particulares, proporcionar fluidos dieléctricos con viscosidades similares a las de los fluidos dieléctricos derivados de las fuentes precedentes. En realizaciones ilustrativas, el fluido dieléctrico tiene una viscosidad a 40 °C menor de aproximadamente 110 cSt, p. ej., comprendida en el rango de 20 a 30 cSt, y/o una viscosidad a 100 °C comprendida en el rango de aproximadamente 2 a aproximadamente 15 cSt, p. ej., 4-8 cSt.

**[0286]** El índice de viscosidad (IV, un número sin unidades) es una medida de la variación de la viscosidad con la variación de temperatura. Para IV, se compara la kv del aceite a 40°C con dos aceites de referencia (con IV de 0 y 100), donde todos los aceites tienen la misma kv a 100 °C (D2270 de la ASTM). El valor de IV generalmente debe ser lo mayor posible. Unos valores de IV altos indican que la viscosidad del aceite cambia poco con la temperatura. En general: un IV bajo es inferior a 35; un IV medio está comprendido entre 35 y 80; un IV alto está comprendido entre 80 y 110; un IV muy alto está comprendido entre 110 y 125; un IV super alto está comprendido entre 125 y 160; y un IV superalto es mayor o igual a 160. Los IV de fluidos dieléctricos derivados de diversos materiales de partida incluyen:

derivados de aceite mineral: 103; derivados de aceite de soja: 246 y derivados de aceite de girasol: 206. (Siniawski et al.; J. Synthetic Lubrication; 24, 101-110 (2007)). Los métodos de la presente invención pueden, en realizaciones particulares, proporcionar fluidos dieléctricos con IV similares a los de los fluidos dieléctricos derivados de las fuentes precedentes.

5  
10  
15  
[0287] El punto de fluidez es la temperatura más baja a la que un líquido fluirá o se podrá verter (°C) (D97 de la ASTM). El punto de fluidez debe ser al menos 10 °C inferior a la temperatura ambiente menor anticipada a la que se utilizará el fluido dieléctrico. Los puntos de fluidez de fluidos dieléctricos derivados de diversos materiales de partida incluyen: derivados de aceite mineral: -50 °C; derivados de aceite de soja: -9 °C; derivados de aceite de girasol: -12 °C y derivados de aceite de colza (canola): -21 °C. (Siniawski et al.; J. Synthetic Lubrication; 24, 101-110 (2007)). Los métodos de la presente invención pueden, en realizaciones particulares, proporcionar fluidos dieléctricos con puntos de fluidez similares a los de los fluidos dieléctricos derivados de las fuentes precedentes. En varias realizaciones, el punto de fluidez de un fluido dieléctrico a base de aceite microbiano puede ser de aproximadamente -10 oC, aproximadamente -15 oC, aproximadamente -20 oC, aproximadamente -25 oC, aproximadamente 30 oC, aproximadamente -35 oC o aproximadamente -40 oC. Además, el punto de fluidez del fluido dieléctrico a base de aceite microbiano puede estar comprendido dentro de cualquier rango limitado por cualquiera de estos valores, p. ej., de aproximadamente -10 oC a -40 oC o de aproximadamente -15 oC a aproximadamente -35 oC, etc.

20  
25  
30  
35  
[0288] Por ejemplo y tal como se describió anteriormente, el aceite RBD producido de acuerdo con los métodos descritos en la presente se puede producir fácilmente con puntos de fluidez menores o iguales a aproximadamente -8 oC. Este punto de fluidez se puede reducir aún más mezclando el aceite RBD con un depresor del punto de fluidez para obtener aceites con puntos de fluidez comprendidos en el rango de -15 a -20 oC o inferiores en función de la cantidad de depresor del punto de fluidez que se añada al aceite. La fracción oleínica obtenida de un único fraccionamiento produce fácilmente aceite con un punto de fluidez de aproximadamente -11 °C, que se puede reducir mezclando la fracción oleínica con un depresor del punto de fluidez para obtener aceites con puntos de fluidez comprendidos en el rango de -16 a -20 oC o inferiores en función de la cantidad de depresor del punto de fluidez añadido al aceite. La fracción oleínica obtenida de un segundo fraccionamiento ("superoleína") produce fácilmente aceite con un punto de fluidez de aproximadamente -20°C, que se puede reducir mezclando la fracción superoleínica con un depresor del punto de fluidez para obtener aceites con puntos de fluidez inferiores a -20 oC, es decir, de -26 °C o inferiores, en función de la cantidad de depresor del punto de fluidez añadido al aceite. Se dispone de una amplia gama de depresores del punto de fluidez comercializados por Chevron, Oronite, Infineum, General Electric, RohmMax Evonik y otras empresas. Los depresores del punto de fluidez ilustrativos para utilizar con los aceites microbianos (lípidos) descritos en la presente incluyen VISCOPLEX® 10-310 o 1-133 (Rohmax-Evonik Additives GmbH), u otros poli(alquíl)acrilatos y poli(metil)acrilatos tales como INFINEUM® V-351 (Infineum UK limited), PMA-D110 y PMA D.

40  
[0289] La lubricidad (propiedades antidesgaste) de un fluido dieléctrico es importante, ya que se produce un desgaste prematuro cuando la viscosidad del fluido es insuficiente y la película del fluido no evita el contacto con la superficie (D2882 de la ASTM). En algunas realizaciones, los métodos de la presente invención proporcionan fluidos dieléctricos con una lubricidad buena (equivalente o mejor a D2882 de la ASTM).

45  
[0290] La volatilidad o la tendencia de un aceite a vaporizarse (atm de vapor frente a oC) también es importante para un fluido dieléctrico. En general, se prefiere una volatilidad baja. En algunas realizaciones, los métodos de la presente invención pueden proporcionar fluidos dieléctricos con una volatilidad tan baja como la de los fluidos dieléctricos a base de aceite mineral y de origen biológico tradicionales o incluso inferior.

50  
[0291] La inflamabilidad del fluido dieléctrico es importante. En general, se prefiere una inflamabilidad baja (remítase a "Bio-Based Lubricants: A Market Opportunity Study Update" United Soybean Board, noviembre de 2008, Omni Tech International, Ltd., [www.soynewuses.org/downloads/reports/BioBasedLubricantsMarketStudy.pdf](http://www.soynewuses.org/downloads/reports/BioBasedLubricantsMarketStudy.pdf)). Los métodos de la presente invención pueden, en realizaciones particulares, proporcionar fluidos dieléctricos con una inflamabilidad tan baja como la de los fluidos dieléctricos a base de aceite mineral y de origen biológico tradicionales o incluso inferior.

55  
60  
[0292] El punto de inflamación es la temperatura más baja (°C) a la que un aceite se vaporiza para formar una mezcla inflamable en el aire. D3278, D3828, D56 y D93 de la ASTM describen las especificaciones del punto de inflamación adecuadas para los fluidos dieléctricos. Para prevenir la ignición del aceite, el punto de inflamación generalmente debe ser lo mayor posible. Los puntos de inflamación de fluidos dieléctricos derivados de diversas fuentes incluyen: derivados de aceite mineral: 147 °C; y derivados de TAG (típicos): 324 °C. (New Safety Dielectric Coolants for Distribution and Power Transformers, [www.cooperpower.com/Library/pdf/00048.pdf](http://www.cooperpower.com/Library/pdf/00048.pdf)). En algunas realizaciones, los métodos de la presente invención pueden proporcionar fluidos dieléctricos con puntos de inflamación similares a los de fluidos dieléctricos derivados de las fuentes anteriores, y mayores o iguales a los de las especificaciones de D1310 de la ASTM y D92 de la ASTM.

65  
[0293] El punto de combustión es la menor temperatura (°C) a la que un aceite continuará quemándose durante al menos cinco segundos tras la ignición con una llama abierta. D1310 de la ASTM y D92 de la ASTM describen las especificaciones del punto de combustión adecuadas para los fluidos dieléctricos. Para prevenir la ignición del aceite, el punto de combustión debe ser lo mayor posible. Los puntos de combustión de fluidos dieléctricos derivados de diversas fuentes incluyen: derivados de aceite mineral: 165 °C; y derivados de TAG (típicos): 360 °C. (New Safety

Dielectric Coolants for Distribution and Power Transformers, [www.cooperpower.com/Library/pdf/00048.pdf](http://www.cooperpower.com/Library/pdf/00048.pdf)). En algunas realizaciones, los métodos de la presente invención pueden proporcionar fluidos dieléctricos con puntos de combustión similares a los de fluidos dieléctricos derivados de las fuentes anteriores, y mayores o iguales a los de las especificaciones de D1310 de la ASTM y D92 de la ASTM. En algunas realizaciones, dicho punto de combustión es superior a 300 °C, p. ej., entre 300 °C y 450 °C.

**[0294]** La reactividad de un fluido dieléctrico es importante; el fluido dieléctrico no debe reaccionar (o debe tener una reactividad baja) con ácidos/bases, calor y aire.

**[0295]** La reactividad hidrolítica se refiere a la tendencia de un fluido a descomponerse en presencia de ácidos o bases. D2619 de la ASTM y D943 de la ASTM describen las especificaciones de la reactividad hidrolítica adecuadas para los fluidos dieléctricos. En TAG, los grupos funcionales sensibles son los ésteres y grupos funcionales sensibles a ácidos/bases. Los métodos de la presente invención pueden, en realizaciones particulares, proporcionar fluidos dieléctricos con una reactividad hidrolítica baja (equivalente o mejor a D2619 de la ASTM y/o D943 de la ASTM).

**[0296]** Estabilidad térmica se refiere a la tendencia de un fluido dieléctrico a la descomposición térmica. En fluidos dieléctricos derivados de aceite de origen biológico, la inestabilidad térmica habitualmente se debe a los hidrógenos  $\beta$  del glicerol, que al final da como resultado productos de eliminación. Los métodos de la presente invención pueden, en realizaciones particulares, proporcionar fluidos dieléctricos con una estabilidad térmica alta (mayor o igual a la de los fluidos dieléctricos derivados de aceite de origen biológico tradicionales).

**[0297]** La sensibilidad oxidativa se refiere a la tendencia de un fluido dieléctrico a reaccionar con oxígeno para formar productos de oxidación. D943 de la ASTM y D2272 de la ASTM describen la estabilidad oxidativa adecuada para los fluidos dieléctricos. Se prefiere una sensibilidad oxidativa baja; los valores superiores indican más lubricantes oxidativos. En ciertas realizaciones, los métodos de la presente invención pueden, en realizaciones particulares, proporcionar fluidos dieléctricos con una sensibilidad oxidativa baja (p. ej., D943 de la ASTM o D2272 de la ASTM).

**[0298]** El índice de neutralización (índice de acidez/número de ácido) es una medida de la cantidad de ácido contenida en un aceite o fluido dieléctrico. Los ácidos se forman como aceites (o fluidos dieléctricos) oxidados con el paso del tiempo y el uso. Los ácidos se originan en lubricantes de origen biológico a partir de la oxidación, termólisis de ésteres o hidrólisis ácida/básica. D947 de la ASTM, D3487 de la ASTM y D6871 de la ASTM describen los índices de neutralización adecuados para fluidos dieléctricos. En general, el índice de acidez debe ser lo menor posible. El número de ácido para aceite mineral estándar es de 0.03 y para aceite de origen biológico es de 0.06. (Ester Transformer Fluids, IEEE/PES Transformer Committee Meeting, 7 de octubre de 2003, [www.transformerscommittee.org/info/F03/F03-EsterFluids.pdf](http://www.transformerscommittee.org/info/F03/F03-EsterFluids.pdf)). Los métodos de la presente invención pueden, en realizaciones particulares, proporcionar fluidos dieléctricos con números de ácido bajos (p. ej., D947 de la ASTM, D3487 de la ASTM o D6871 de la ASTM).

**[0299]** El término "miscibilidad" se refiere a la capacidad de un fluido para mezclarse con otros fluidos. Idealmente, un fluido dieléctrico se debería mezclar bien con otros lubricantes, fluidos y aditivos pero no con agua. El término "demulsibilidad" se refiere a lo bien que un fluido hidráulico resiste a mezclarse con agua. La demulsibilidad es óptima en un fluido dieléctrico. La miscibilidad con lubricantes y aditivos deseados es óptima en un fluido dieléctrico. En ciertas realizaciones, los métodos de la presente invención pueden, en realizaciones particulares, proporcionar fluidos dieléctricos con una miscibilidad y una demulsibilidad buenas.

**[0300]** Los fluidos dieléctricos deben tener buenas propiedades de aislamiento eléctrico, es decir, deben evitar que la corriente eléctrica se disipe. Se realizan pruebas de determinación del factor de potencia de aislamiento en transformadores para medir las pérdidas dieléctricas (medidas en %). Este valor indica el estado del transformador - humedad, sequedad, deterioro del aislamiento, el estado de los devanados, barreras, conmutadores de tomas, bujes y aceite. Los valores del factor de potencia asociados con un fluido dieléctrico deben ser lo menor posible, normalmente menores o iguales a un 0.5%. Por ejemplo, el factor de potencia de un aceite nuevo enviado desde una refinería no debe ser superior a un 0.05% a 25 °C y no debe ser superior a un 0.3% a 100 °C. (Directriz C57 del IEEE, 106-1991 tal como se cita en [www.nttworldwide.com/tech2209.htm](http://www.nttworldwide.com/tech2209.htm)). Para el nuevo aceite en un equipo nuevo que opera a 69 kV o menos, el factor de potencia no debe ser superior a un 0.15% a 25 °C y no debe ser superior a un 1.5% a 100 °C; que opera a 69 kV o a 288 kV o menos, el factor de potencia no debe ser superior a un 0.10% a 25 °C y no debe ser superior a un 1.0% a 100 °C; que opera a 345 kV o más, el factor de potencia no debe ser superior a un 0.05% a 25 °C y no debe ser superior a un 0.3% a 100 °C. El nuevo aceite para disyuntores debe tener un factor de potencia que no sea superior a un 0.05% a 25 °C y que no sea superior a un 0.3% a 100 °C. El aceite utilizado en los disyuntores no debe tener un factor de potencia superior a un 1.0% a 25 °C. Ciertas realizaciones de los métodos de la presente invención proporcionan fluidos dieléctricos con propiedades referentes al factor de potencia favorables.

**[0301]** La resistencia dieléctrica se refiere a la intensidad de campo eléctrico máxima que el fluido dieléctrico (aislante eléctrico) puede resistir antes de descomponerse. La resistencia dieléctrica se mide en unidades de MV/m (relativas a la permitividad) y D877 de la ASTM proporciona especificaciones adecuadas para fluidos dieléctricos. Para utilizar un aislante eléctrico, la resistencia dieléctrica del lubricante debe ser tan elevada como sea posible. Los métodos de la presente invención pueden, en realizaciones particulares, proporcionar fluidos dieléctricos con resistencias

dieléctricas mayores o iguales a las especificadas por D877 de la ASTM.

**[0302]** El factor de disipación es una medida de la pérdida eléctrica debida al fluido dieléctrico cuando se utiliza como aislante dieléctrico, y se mide en unidades porcentuales a 25 oC. D924 de la ASTM proporciona especificaciones adecuadas para fluidos dieléctricos. Como aislante eléctrico, el valor del factor de disipación debe ser lo menor posible. En ciertas realizaciones, los métodos de la presente invención proporcionan fluidos dieléctricos con factores de disipación mayores o iguales a los especificados por D924 de la ASTM.

**[0303]** La conductividad eléctrica es una medida de la capacidad de un fluido dieléctrico, cuando se utiliza como aislante eléctrico, para conducir corriente eléctrica y se mide en unidades de S·m<sup>-1</sup>. D2624 de la ASTM proporciona especificaciones adecuadas para fluidos dieléctricos. Como aislante, el valor de la conductividad eléctrica del fluido dieléctrico debe ser lo menor posible. Las realizaciones de los métodos de la presente invención proporcionan fluidos dieléctricos con una conductividad eléctrica favorable en comparación con la especificada por D2624 de la ASTM.

**[0304]** Para el uso en transformadores eléctricos y otras aplicaciones, las propiedades térmicas del fluido dieléctrico deben ser tales que se transfiera calor de forma eficiente. La expresión "calor específico" se refiere a la capacidad térmica de una sustancia y se mide en unidades de cal/g·oC. D2766 de la ASTM proporciona especificaciones adecuadas para fluidos dieléctricos. Unos valores de calor específico superiores permiten una transferencia de calor y un enfriamiento más eficientes. Los valores del calor específico para fluidos dieléctricos derivados de aceite mineral son generalmente de aproximadamente 0.39 y para fluidos dieléctricos derivados de TAG de aproximadamente 0.45. (Safety Dielectric Coolants for Distribution and Power Transformers, [www.cooperpower.com/Library/pdf/00048.pdf](http://www.cooperpower.com/Library/pdf/00048.pdf)). Los métodos de acuerdo con realizaciones de la presente invención pueden proporcionar fluidos dieléctricos con unos valores de calor específico mayores o iguales a 0.39 y/o que se ajustan a las especificaciones de D2624 de la ASTM.

**[0305]** Las propiedades medioambientales de un fluido dieléctrico son importantes. En general, se deberían emplear fluidos dieléctricos seleccionados para mitigar así los efectos medioambientales de un derrame u otro accidente. El término "biodegradabilidad" se refiere a la capacidad de un fluido dieléctrico para descomponerse en forma de dióxido de carbono y agua en el medioambiente y generalmente se mide en unidades porcentuales cada 28 días. 301B de la OECD y D-6046 de la ASTM proporcionan especificaciones de la biodegradabilidad adecuadas para fluidos dieléctricos. Los valores de biodegradabilidad para los fácilmente biodegradables son generalmente de aproximadamente un 100%; los valores de biodegradabilidad para los inherentemente biodegradables generalmente están comprendidos entre un 20 y un 70%; y los valores de biodegradabilidad para los no biodegradables generalmente están comprendidos entre un valor despreciable y un 0%. Los fluidos dieléctricos derivados de aceite mineral generalmente tienen unos valores de biodegradabilidad comprendidos en el rango de un 15 a un 35%, y los fluidos dieléctricos derivados de aceite de origen biológico generalmente tienen valores de biodegradabilidad comprendidos en el rango de un 70 a un 100%. Ciertas realizaciones de los métodos de la presente invención pueden proporcionar fluidos dieléctricos con valores de biodegradabilidad comprendidos en el rango de un 70 a un 100% (remítase a Renewable Lubricants Manual: Biobased Oils, Fluids, & Greases [www.renewablelubricants.com/RenewableLubricantsManual\\_Biodegradable.html#Introduction](http://www.renewablelubricants.com/RenewableLubricantsManual_Biodegradable.html#Introduction)).

**[0306]** El índice de yodo (o el número de yodo) es una medida del grado de insaturación de un aceite. Más específicamente, el índice de yodo es la masa de yodo que consumen los enlaces insaturados en un aceite. Los aceites de secado tienen índices de yodo relativamente altos mayores o iguales a aproximadamente 175. Los aceites de soja tienen índices de yodo de aproximadamente 130 y los aceites de oliva de aproximadamente 80. Los índices de yodo se determinan de forma rutinaria en la técnica. Los métodos estándar para determinar los índices de yodo incluyen D5768-02(2006) de la ASTM y 53241 del DIN. En varias realizaciones, un aceite microbiano es un producto a base de aceite microbiano, p. ej., un fluido dieléctrico, puede tener un índice de yodo comprendido entre aproximadamente 25 y aproximadamente 200, por ejemplo, aproximadamente 50, aproximadamente 75, aproximadamente 100, aproximadamente 125, aproximadamente 150 o aproximadamente 175. Además, el índice de yodo puede estar comprendido en cualquier rango limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo, entre aproximadamente 25 y aproximadamente 175, entre aproximadamente 50 y aproximadamente 200, entre aproximadamente 50 y aproximadamente 175, etc.

**[0307]** También se puede alterar la insaturación de los ácidos grasos. Al aumentar la insaturación se reducen los puntos de fluidez/congelación. En la actualidad la monoinsaturación, tal como en el caso de los biolubricantes con un alto contenido de ácido oleico, es óptima y representa un equilibrio entre el punto de fluidez y la reactividad oxidativa. Los aceites monoinsaturados reaccionan con el aire pero mucho más despacio que los FA o PUFA poliinsaturados. Los ejemplos de PUFA incluyen el ácido araquidónico (ARA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA). Los FA di- y poliinsaturados son muy sensibles a la oxidación y no son adecuados para las aplicaciones eléctricas. Un problema con los fluidos dieléctricos derivados de aceites vegetales es la presencia de FA poliinsaturados (p. ej., ácido linoleico y ácido linolénico). Una ventaja de los fluidos dieléctricos de algunas de las realizaciones de la presente invención es que el aceite microbiano que comprenden (o del que se derivan) contiene menos FA di- y poliinsaturados que los fluidos dieléctricos derivados de otros bioaceites, y en algunas realizaciones ninguno.

**[0308]** El perfil lipídico del fluido dieléctrico normalmente es muy similar al perfil lipídico del aceite utilizado como

materia prima. Para el uso como fluidos dieléctricos se prefieren cantidades altas de ácidos grasos monoinsaturados de cadena más larga (C16-C18). Los ácidos grasos poliinsaturados (tales como C18:2, C18:3, ARA, EPA y DHA) no se prefieren debido a la oxidación de la producción de productos de oxidación. Los ácidos grasos saturados tienden a ser sólidos o líquidos con un punto de congelación alto, lo cual hace que los ácidos grasos saturados no sean deseables en grandes cantidades en fluidos dieléctricos. En varias realizaciones, el aceite microbiano (lípidos) útil en fluidos dieléctricos contiene al menos aproximadamente un 50% de C18:1, p. ej., al menos aproximadamente un 55%, al menos aproximadamente un 60%, al menos aproximadamente un 65%, al menos aproximadamente un 70%, al menos aproximadamente un 75%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 85% y al menos aproximadamente un 90% de C18:1. En estas u otras realizaciones, el aceite microbiano (lípidos) contiene menos de aproximadamente un 10% de C18:2, p. ej., menos de aproximadamente un 7.5%, menos de aproximadamente un 5%, menos de aproximadamente un 2.5% y menos de aproximadamente un 1% de C18:2. El aceite microbiano puede contener cualquier combinación de porcentajes de C18:1 y C18:2 que ascienda a un 100% o menos. Por ejemplo, el aceite microbiano puede contener al menos un 50% de C18:1 y menos de un 10% de C18:2 o al menos un 80% de C18:1 y menos de un 5% de C18:2.

**[0309]** A efectos ilustrativos, se proporcionan en la presente aceites TAG de microbios oleaginosos que contienen menos de un 2% de C18:2 (remítase al Ejemplo 4), en comparación con un 20-75% en el aceite de girasol y un 48-65% en el aceite de soja. También se proporcionan aceites TAG con menos de un 0.5% de C18:3, en comparación con un 5-10% en el aceite de soja.

**[0310]** Estas y otras propiedades de un fluido dieléctrico se pueden conseguir, manipular y/o variar de acuerdo con los métodos descritos en la presente para obtener así un producto, tal como un lubricante, un fluido hidráulico, un aceite industrial o un fluido dieléctrico, adecuado para cualquier aplicación. Por ejemplo, se puede realizar una manipulación genética de microbios oleaginosos, tal como se describe anteriormente, para alterar la longitud de la cadena, la saturación y/o la composición de los diferentes ácidos grasos en el lípido. En ciertas realizaciones, un aceite microbiano útil como el descrito en la presente es producido por un microbio modificado genéticamente que ha sido modificado para expresar uno o más genes exógenos. Por ejemplo, el microbio modificado genéticamente puede ser *Prototheca* (p. ej., *Prototheca moriformis*) o *Chlorella*. Los genes exógenos ilustrativos incluyen los que codifican sacarosa-invertasa y/o acil graso-ACP-tioesterasa.

**[0311]** Además, el lípido extraído de una levadura oleaginosa o microalgácea se puede someter a varias modificaciones químicas para conseguir una propiedad deseada en un fluido dieléctrico. Las alteraciones típicas incluyen alterar la longitud de la cadena de ácidos grasos (FA). Los FA de cadena más corta tienen puntos de fluidez menores. Las modificaciones químicas también se pueden utilizar de acuerdo con realizaciones de los métodos de la invención para reducir la insaturación e incluyen alquilación, adición radicalaria, acilación, reacciones eno, hidroformilación, hidrogenación selectiva, oligomerización, hidroaminometilación, aciloxilación y epoxidación. Además, o como alternativa, un aditivo, tal como un depresor del punto de fluidez, se puede mezclar con el aceite microbiano procesado para conseguir una propiedad deseada, p. ej., punto de fluidez. Los aditivos ilustrativos se discuten más detalladamente a continuación.

**[0312]** Tal como se discutió anteriormente, en realizaciones particulares, el aceite microbiano crudo extraído de un microbio oleaginoso normalmente está "enriquecido" antes de incorporarlo en un producto de la invención. Por ejemplo, pueden existir contaminantes en los lípidos microbianos que pueden cristalizar y/o precipitar, y separarse de la solución como un sedimento. La formación de sedimentos supone un problema especialmente cuando se utiliza un fluido dieléctrico a temperaturas bajas. El sedimento o los precipitados pueden provocar problemas tales como reducción del flujo, obstrucciones, etc. En la técnica se dispone de procesos específicos para la eliminación de estos contaminantes y sedimentos con el fin de producir un producto de mayor calidad. Los ejemplos de tales procesos incluyen, sin carácter limitante, el pretratamiento del aceite para eliminar los contaminantes tales como fosfolípidos y ácidos grasos libres (p. ej., desgomación, refinación cáustica y filtración por adsorción sobre sílice).

**[0313]** De acuerdo con realizaciones de los métodos de la invención se puede emplear la winterización para enriquecer el aceite microbiano. Existen varias estrategias para winterizar un fluido dieléctrico de acuerdo con realizaciones de la presente invención. Una estrategia consiste en mezclar el fluido con otros fluidos dieléctricos. Otra estrategia consiste en utilizar aditivos que pueden reducir el punto de congelación. También se puede emplear el fraccionamiento en seco para reducir la proporción relativa de la fracción saturada (la fracción estearínica). Al enfriar el aceite, se puede inducir la cristalización de los compuestos saturados y a continuación se filtran los cristales. El fraccionamiento separa selectivamente un fluido en sus componentes o fracciones individuales para poder eliminar o incluir fracciones específicas. Otros métodos de fraccionamiento incluyen el fraccionamiento con urea, fraccionamiento con disolventes y destilación térmica.

**[0314]** A continuación, se puede añadir diatomita u otro material filtrante, tal como arcilla decolorante, al líquido enfriado para formar una suspensión, que posteriormente se puede filtrar a través de un filtro de hojas a presión u otro tipo de filtro para eliminar las partículas. A continuación, el líquido filtrado se puede hacer pasar por un filtro de fieltro para eliminar cualesquiera sedimentos y diatomita remanentes y producir de este modo un producto final. Como alternativa, o además, este producto, o el aceite microbiano producido al final de cualquiera de los pasos de proceso anteriores, se puede mezclar con un depresor del punto de fluidez para producir un producto de la invención, tal como

un fluido dieléctrico.

**[0315]** En una realización de la presente invención, se proporciona un método para producir un aceite lubricante o un fluido dieléctrico que comprende los pasos de (a) cultivar un microorganismo que contiene lípido utilizando métodos descritos en la presente, (b) lisar un microorganismo que contiene lípido para producir un lisado, (c) aislar la composición lipídica del microorganismo lisado y (d) enriquecer la composición lipídica aislada, mediante el cual se produce un aceite lubricante o un fluido dieléctrico. Normalmente, el paso (d) incluirá uno o más pasos de refinamiento, decoloración y/o desodorización, y uno o más pasos de fraccionamiento para reducir la proporción relativa de la fracción saturada mediante la eliminación de triglicéridos palmíticos y/o esteáricos. En otra realización, el aceite lubricante o fluido dieléctrico resultante del paso (d) se mezcla con un depresor del punto de fluidez.

**[0316]** Opcionalmente, otros aditivos para incrementar la estabilidad oxidativa de los lípidos aislados se pueden mezclar con el aceite microbiano, lubricante o fluido dieléctrico producido mediante estos métodos. Los ejemplos de tales aditivos incluyen antioxidantes tales como tocoferoles (vitamina E, p. ej., alfa-, beta- y/o delta-tocoferol) y ácido ascórbico (vitamina C). Los antioxidantes adecuados se pueden adquirir de proveedores comerciales. La empresa BASF comercializa una gama de antioxidantes a base de fenoles y a base de aminas adecuados con el nombre comercial IRGANOX®. IRGANOX L109, IRGANOX L64, IRGANOX L57, otros antioxidantes de tipo IRGANOX y otros compuestos a base de fenoles y a base de aminas son adecuados como aditivos antioxidantes para los aceites y productos, incluidos los fluidos dieléctricos. Otros ejemplos no limitantes de antioxidantes incluyen hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), mono-tert-butilhidro quinona (TBHQ), hidroanisol butilado, tetrahidrobutrofenona, palmitato de ascorbilo y galato de propilo. En ciertas realizaciones, un producto a base de aceite microbiano, p. ej., un fluido dieléctrico, incluye además un antioxidante en una concentración comprendida entre un 0.1% y un 5% en peso, y preferentemente entre un 0.5% y un 2%.

**[0317]** Otros aditivos que se pueden añadir opcionalmente a los lípidos aislados para utilizar como productos, tales como fluidos dieléctricos, son desactivadores de iones metálicos, inhibidores de la corrosión, aditivos antidesgaste y/o protectores contra la hidrólisis. Algunos aditivos de uso común en fluidos dieléctricos se describen en Schneider, 2006, J Science Food and Agriculture; 86: 1769-1780). Los desactivadores de iones metálicos tienen dos funciones principales. Suprimen el ataque químico sobre la superficie del metal y también pasivan la superficie metálica para suprimir cualesquiera residuos que puedan actuar como catalizadores para la formación de radicales (electrón desapareado). Los desactivadores de metales se pueden adquirir de proveedores comerciales. Por ejemplo, la empresa BASF proporciona una gama de desactivadores de metales que incluye la gama IRGAMET® de desactivadores de metales. La empresa RTVANDERBILT vende la gama CUVAN® de desactivadores de metales. Otros ejemplos de desactivadores de metales incluyen triazoles derivatizados incluidos 1-(diisooctilaminometil)-1,2,4-triazol, 1-(2-metoxiprop-2-il)toliltriazol, 1-(1-ciclohexiloxipropil)toliltriazol, 1-(1-ciclohexiloxiheptil)toliltriazol, 1-(1-ciclohexiloxibutil)toliltriazol, 1-[bis(2-etilhexil)aminometil-4-metilbenzotriazol, borones derivatizados incluidos borato de trietilo, borato de tripropilo, borato de triisopropilo, borato de tributilo, borato de tripentilo, borato de trihexilo, borato de triciclohexilo, borato de trioctilo, borato de triisooctilo y otros desactivadores de metales hidrazínicos derivatizados, p. ej., 2',3-bis[[3-[3,5-di-tert-butil-4-hidroxifenil]propionil]]proponiohidrazina y similares. ). En ciertas realizaciones, un producto a base de aceite microbiano, p. ej., un fluido dieléctrico, incluye además uno o más desactivadores de metales en una concentración comprendida entre un 0.1% y un 5% en peso, y preferentemente entre un 0.5% y un 2%.

**[0318]** Por lo tanto, los fluidos dieléctricos preparados de acuerdo con los métodos descritos en la presente pueden contener varios aditivos incluidos, sin carácter limitante, uno o más de los siguientes aditivos: (a) un antioxidante, incluidos, sin carácter limitante, BHT y otros fenoles; (b) un desactivador de iones metálicos tales como Cu, Zn y similares, incluido, sin carácter limitante, el benzotriazol; (c) inhibidores de la corrosión, incluidos, sin carácter limitante, los ésteres de tipo sulfonato y ésteres del ácido succínico; (d) desemulsionantes; (e) aditivos antidesgaste, incluido, sin carácter limitante, el ditiofosfato de zinc; (f) aditivos para reducir el punto de fluidez, incluidos, sin carácter limitante, los copolímeros de malan-estireno y poli(alquilacrilatos), incluidos, sin carácter limitante, los polimetacrilatos; y (g) compuestos que protegen contra la hidrólisis, incluidas, sin carácter limitante, las carbodiimidias.

**[0319]** En ciertas realizaciones, un método de la invención produce un producto, incluido un aceite microbiano, con un punto de fluidez comprendido entre aproximadamente -10 °C y aproximadamente -40 °C, y en este la composición de ácidos grasos del aceite microbiano es de al menos un 50% de C18:1 y menos de un 10% de C18:2. El método incluye cultivar un microbio transgénico modificado genéticamente para que exprese uno o más genes exógenos hasta que el microbio contenga al menos un 10% de aceite en peso seco. Los microbios modificados genéticamente ilustrativos incluyen Prototheca (p. ej, Prototheca moriformis) o Chlorella. Los genes exógenos ilustrativos incluyen los que codifican sacarosa-invertasa y/o acil graso-ACP-tioesterasa. En algunas realizaciones, el microbio modificado genéticamente expresa al menos dos genes exógenos, p. ej., que codifican sacarosa-invertasa y acil graso-ACP-tioesterasa, que codifican dos acil graso-ACP-tioesterasas diferentes o que codifican sacarosa-invertasa y dos acil graso-ACP-tioesterasas diferentes. Una vez que el microbio contenga al menos un 10% de aceite en peso seco, el aceite se separa del microbio y se somete a refinamiento, decoloración, desodorización o desgomación para producir aceite RBD. Opcionalmente, se puede añadir un antioxidante, un desactivador de iones metálicos, un inhibidor de la corrosión, desemulsionante, aditivo antidesgaste, depresor del punto de fluidez y/o compuesto antihidrólisis al aceite RBD para producir un producto deseado.

**[0320]** En realizaciones particulares, un método de fraccionamiento de la invención produce un aceite microbiano adecuado para ser incorporado en productos (por ejemplo, un fluido dieléctrico) con un punto de fluidez comprendido entre aproximadamente -10 °C y aproximadamente -40 °C, y en este la composición de ácidos grasos del aceite microbiano es de al menos un 50% de C18:1 y menos de un 10% de C18:2. El método incluye someter un aceite microbiano de partida (es decir, "primer aceite") a refinamiento, decoloración, desodorización o desgomación para producir aceite RBD, donde el aceite RBD se caracteriza por un punto de fluidez inicial y una primera temperatura; reducir la temperatura del aceite RBD hasta una segunda temperatura; y filtrar el aceite RBD a la segunda temperatura para proporcionar un segundo aceite microbiano caracterizado por un segundo punto de fluidez que es menor que el punto de fluidez inicial, donde el segundo punto de fluidez está comprendido entre aproximadamente -10 °C y aproximadamente -40 °C, y donde la composición de ácidos grasos del segundo aceite microbiano es de al menos un 50% de C18:1 y menos de un 10% de C18:2. Una primera temperatura ilustrativa está comprendida entre más de 15 °C y aproximadamente 50 °C, y una segunda temperatura ilustrativa está comprendida entre aproximadamente -15 °C y aproximadamente 15 °C. Opcionalmente, se puede añadir un antioxidante, un desactivador de iones metálicos, un inhibidor de la corrosión, desemulsionante, aditivo antidesgaste, depresor del punto de fluidez y/o compuesto antihidrólisis al segundo aceite microbiano para producir un producto deseado. En variaciones de estas realizaciones, el primer aceite microbiano se produce cultivando un microbio transgénico modificado genéticamente para que exprese uno o más genes exógenos hasta que el microbio contenga al menos un 10% de aceite en peso seco y a continuación separar el aceite del microbio para producir el primer aceite microbiano. Este método se puede emplear para producir, p. ej., un lubricante, un fluido hidráulico, un aceite industrial o un fluido dieléctrico. En ciertas realizaciones, en las que el producto es un fluido dieléctrico, el fluido incluye uno o más de los siguientes: un antioxidante, un desactivador de iones metálicos, un inhibidor de la corrosión, un desemulsionante, un aditivo antidesgaste, un depresor del punto de fluidez o un compuesto antihidrólisis.

**[0321]** En una realización de la invención, se produce un fluido dieléctrico mezclando aceites y/o fluidos dieléctricos derivados de microbios oleaginosos con aceites o fluidos dieléctricos existentes. Los aceites y fluidos dieléctricos existentes pueden ser de origen vegetal o animal (o ambos, es decir, petróleo).

**[0322]** Por lo tanto, la presente invención incluye una diversidad de métodos en los que el lípido procedente de microbios oleaginosos se procesa con el fin de obtener fluidos dieléctricos y otros productos útiles en diversas aplicaciones industriales y de otros tipos. Los ejemplos de procesos para modificar aceite producido mediante los métodos descritos en la presente incluyen, sin carácter limitante, la hidrólisis del aceite, el hidroprocesamiento del aceite y la esterificación del aceite. Otras modificaciones químicas de lípidos microalgáceos incluyen, sin carácter limitante, epoxidación, oxidación, hidrólisis, sulfataciones, sulfonación, etoxilación, propoxilación, amidación y saponificación. La modificación del aceite de microalgas produce compuestos oleoquímicos básicos que se pueden modificar posteriormente para obtener compuestos oleoquímicos derivados seleccionados para una función deseada. De una forma similar a la descrita anteriormente con respecto a los procesos de producción de combustible, estas modificaciones químicas también se pueden llevar a cabo sobre aceites generados a partir de los cultivos microbianos descritos en la presente.

**[0323]** En ciertas realizaciones, se emplea un fluido dieléctrico descrito en la presente en un sistema eléctrico, tal como un transformador, incluido un tanque en el que está contenido un montaje de núcleo/bobinas del transformador, donde el fluido dieléctrico rodea el montaje de núcleo/bobinas. En variaciones de estas realizaciones, el tanque también incluye un material que absorbe oxígeno que está en contacto con gases dentro del tanque, pero aislado sin contacto con el fluido aislante dieléctrico. Los materiales que absorben oxígenos adecuados son aquellos que son capaces de reducir la concentración de oxígeno libre en la atmósfera que rodea al fluido dieléctrico dentro del tanque y que a su vez reducen la presencia de oxígeno disuelto en el propio fluido. Tales compuestos se pueden denominar compuestos captadores de oxígeno. Los compuestos captadores de oxígeno útiles incluyen aquellos que se emplean habitualmente en la industria del embalaje de alimentos. Los compuestos captadores de oxígeno representativos útiles en la práctica de la invención incluyen los siguientes: sulfito de sodio; sulfato de cobre pentahidratado; una combinación de carbón y hierro activo en polvo; mezclas de hidrosulfito, hidróxido de calcio, bicarbonato de sodio y carbón activo; un haluro metálico en polvo aplicado como recubrimiento sobre la superficie de un polvo metálico; y combinaciones de compuestos alcalinos, tales como hidróxido de calcio, con carbonato de sodio o bicarbonato de sodio. Las mezclas y combinaciones de una o más de las composiciones anteriores también se consideran útiles. También son útiles como compuestos captadores de oxígeno las composiciones proporcionadas de acuerdo con la patente de EE. UU. N.o 2.825.651, que se incorpora por referencia, incluida una composición depuradora de oxígenos que comprende una intermezcla de una sal de sulfito y un acelerador tal como sulfato de cobre hidratado, cloruro estannoso u óxido cobaltoso. Otra clase útil de compuestos captadores de oxígeno incluye aquellas composiciones que comprenden una sal de manganeso, hierro, cobalto o níquel, un compuesto alcalino y un sulfito o compuesto delicuescente, tal como se describe en la patente de EE. UU. N.o 4.384.972, que también se incorpora por referencia. Los compuestos captadores de oxígeno preferidos incluyen (o incluyen como componente principal) al menos un óxido de hierro básico, tal como óxido de hierro ferroso, o están compuestos por mezclas de materiales de óxido de hierro. Las composiciones que contienen óxido de hierro útiles se pueden adquirir de proveedores comerciales, por ejemplo, con el nombre comercial "Ageless" de la empresa Mitsubishi Gas Chemical Company de Duncan, Carolina del Sur, y con el nombre comercial "Freshmax" de Multisorb Technologies, Inc. of Buffalo, N.Y. También son útiles los agentes que absorben oxígeno que comprenden una mezcla de sales ferrosas y un modificador de la oxidación y/o un compuesto de tipo sulfito o sulfato metálico.

[0324] La invención, habiéndose descrito detalladamente anteriormente, se ejemplifica en los siguientes ejemplos, que se presentan para ilustrar, pero no limitar, la invención reivindicada

## 5 VII. EJEMPLOS

### EJEMPLO 1: Métodos para cultivar Prototheca

[0325] Se cultivaron cepas de Prototheca para obtener un porcentaje elevado de aceite en peso seco celular. Las células conservadas criológicamente se descongelaron a temperatura ambiente y se añadieron 500 uL de células a 4.5 mL de medio (4.2 g/L de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3.1 g/L de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.24 g/L de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.25 g/L de ácido cítrico monohidratado, 0.025 g/L de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 2 g/L de extracto de levadura) junto con un 2% de glucosa y se cultivaron durante 7 días a 28 °C con agitación (200 rpm) en una placa de 6 pocillos. Los pesos secos celulares se determinaron por centrifugación de 1 mL de cultivo a 14 000 rpm durante 5 minutos en un tubo eppendorf prepesado. El sobrenadante de cultivo se descartó y el sedimento celular resultante se lavó con 1 mL de agua desionizada. El cultivo se centrifugó de nuevo, el sobrenadante se descartó y los sedimentos celulares se mantuvieron a -80 °C hasta su congelación. A continuación, las muestras se liofilizaron durante 24 horas y se calcularon los pesos secos celulares. Para la determinación del contenido lipídico total en los cultivos, se extrajeron 3 mL del cultivo y se sometieron a un análisis mediante un sistema de Ankom (Ankom Inc., Macedonia, Nueva York), de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las muestras se sometieron a extracción con disolvente en un extractor Amkom XT10 de acuerdo con el protocolo del fabricante. El contenido lipídico total se determinó como la diferencia másica entre las muestras secas hidrolizadas con ácido y las extraídas con disolvente. Las mediciones del porcentaje del aceite en peso seco celular se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Porcentaje de aceite en peso seco celular

Especie	Cepa	% de aceite
Prototheca stagnora	UTEX 327	13.14
Prototheca moriformis	UTEX1441	18.02
Prototheca moriformis	UTEX1435	27.17

[0326] Se determinó el genotipo de muestras de microalgas para múltiples cepas del género Prototheca. Se aisló ADN genómico de la biomasa algácea como se indica a continuación. Se centrifugaron células (aproximadamente 200 mg) de cultivos líquidos 5 minutos a 14 000 x g. Las células se resuspendieron después en agua destilada estéril, se centrifugaron 5 minutos a 14 000 x g y se desechó el sobrenadante. Se añadió una única microesfera de cristal con un diámetro de ~ 2 mm a la biomasa y los tubos se trataron a -80 °C durante al menos 15 minutos. Se retiraron las muestras y se añadieron 150 µL de tampón de trituración (1% de Sarkosil, sacarosa 0.25 M, NaCl 50 mM, EDTA 20 mM, Tris-HCl 100 mM, pH de 8.0, 0.5 µg/µL de ARNasa A). Se volvieron a suspender los pellets agitando brevemente con un vórtex y a continuación se añadieron 40 µL de NaCl 5 M. Las muestras se agitaron brevemente con un vórtex, a continuación se añadieron 66 µL de CTAB al 5% (bromuro de cetiltrimetilamonio) y se agitó brevemente por última vez con un vórtex. Posteriormente, las muestras se incubaron a 65 °C durante 10 minutos y después se centrifugaron a 14 000 x g durante 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se extrajo una vez con 300 µL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 12:12:1, a continuación se centrifugó durante 5 minutos a 14 000 x g. La fase acuosa resultante se transfirió a un tubo nuevo que contenía 0.7 volúmenes de isopropanol (~ 190 µL), se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos o durante toda la noche a 4 °C. El ADN se obtuvo por centrifugación a 14 000 x g durante 10 minutos. A continuación, el pellet resultante se lavó dos veces con etanol al 70% y después se realizó un lavado final con etanol al 100%. Los pellets se secaron al aire durante 20-30 minutos a temperatura ambiente, y después se volvieron a suspender en 50 µL de TrisCl 10 mM, EDTA 1 mM (pH de 8.0).

[0327] Se diluyeron cinco µL de ADN total de algas, preparado como se ha descrito anteriormente, con un factor de 1:50 en Tris 10 mM, pH de 8.0. Las reacciones de PCR, con un volumen final de 20 µL, se llevaron a cabo como se indica a continuación. Se añadieron diez µL de mezcla patrón 2 x iProof HF (Bio-Rad) a 0.4 µL del cebador SZ02613 (5'-TGTTGAAGAATGAGCCGCGAC-3' (SEQ ID NO:9) con una concentración estándar de 10 mM). Esta secuencia de cebador comprende desde la posición 567 a 588 en el número de acceso a GenBank L43357 y está altamente conservada en genomas plastídicos de algas y plantas superiores. A continuación, se añadieron 0.4 µL del cebador SZ02615 (5'-CAGTGAGCTATTACGCACTC-3' (SEQ ID NO:10) con una concentración estándar de 10 mM). Esta secuencia de cebador es complementaria con la posición 1112-1093 en el número de acceso a GenBank L43357 y está altamente conservada en genomas plastídicos de algas y plantas superiores. A continuación, se añadieron 5 µL de ADN total diluido y 3.2 µL de dH<sub>2</sub>O. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo como se indica a continuación: 98 °C, 45"; 98 °C, 8"; 53 °C, 12"; 72 °C, 20" durante 35 ciclos seguidos de 72 °C durante 1 minuto y manteniéndose a 25

°C. Para la purificación de los productos de PCR, se añadieron 20 µL de Tris 10 mM, pH de 8.0, a cada reacción, a continuación se extrajo con 40 µL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 12:12:1, se agitó con vórtex y se centrifugó a 14 000 x g durante 5 minutos. Las reacciones de PCR se trataron en columnas S-400 (GE Healthcare) y se centrifugaron durante 2 minutos a 3000 x g. Posteriormente, los productos purificados de PCR se sometieron a clonación TOPO en PCR8/GW/TOPO y se seleccionaron los clones positivos para placas de LB/Spec. El ADN del plásmido purificado se secuenció en ambas direcciones utilizando cebadores M13 directos e inversos. En total, se seleccionaron doce cepas de Prototheca para secuenciar el ADN de ARNr 23S y las secuencias se enumeran en el Listado de Secuencias. A continuación se incluye un resumen de las cepas y los números del Listado de Secuencias. Se analizaron las secuencias para determinar la divergencia total respecto a la secuencia UTEX 1435 (SEQ ID NO:15). Se detectaron dos pares (UTEX 329/UTEX 1533 y UTEX 329/UTEX 1440) como las más divergentes. En ambos casos, el alineamiento de pares de bases dio como resultado un 75.0% de identidad secuencial de pares de bases. A continuación, también se incluye el porcentaje de identidad secuencial respecto a UTEX 1435:

Especie	Cepa	% de identidad de nt	SEQ ID NO.
Prototheca kruegani	UTEX 329	75.2	SEQ ID NO:11
Prototheca wickerhamii	UTEX 1440	99	SEQ ID NO:12
Prototheca stagnora	UTEX 1442	75.7	SEQ ID NO:13
Prototheca moriformis	UTEX 288	75.4	SEQ ID NO:14
Prototheca moriformis	UTEX 1439, 1441, 1435, 1437	100	SEQ ID NO:15
Prototheca wickerhamii	UTEX 1533	99.8	SEQ ID NO:16
Prototheca moriformis	UTEX 1434	75.9	SEQ ID NO:17
Prototheca zopfii	UTEX 1438	75.7	SEQ ID NO:18
Prototheca moriformis	UTEX 1436	88.9	SEQ ID NO:19

[0328] Las muestras lipídicas de un subconjunto de las cepas enumeradas anteriormente se analizaron para determinar el perfil lipídico mediante HPLC. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 10.

Tabla 10. Diversidad de las cadenas lipídicas en especies de Prototheca

Cepa	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1
UTEX 327	0	12.01	0	0	50.33	17.14	0	0	0
UTEX 1441	1.41	29.44	0.70	3.05	57.72	12.37	0.97	0.33	0
UTEX 1435	1.09	25.77	0	2.75	54.01	11.90	2.44	0	0

**[0329]** El aceite extraído de UTEX 1435 de *Prototheca moriformis* (mediante extracción con disolvente o utilizando una prensa de tornillo) se analizó para determinar el contenido de carotenoides, clorofila, tocoferoles, otros esteroides y tocotrienoles. Los resultados se resumen a continuación en la Tabla 11.

Tabla 11. Análisis de carotenoides, clorofila, tocoferol/esteroides y tocotrienol en aceite extraído de *Prototheca moriformis* (UTEX 1435).

	Aceite prensado (mcg/mL)	Aceite extraído con disolvente (mcg/mL)
cis-Luteína	0.041	0.042
trans-Luteína	0.140	0.112
trans-Zeaxantina	0.045	0.039
cis-Zeaxantina	0.007	0.013
t-alfa-Critoxantina	0.007	0.010
t-beta-Critoxantina	0.009	0.010
t-alfa-Caroteno	0.003	0.001
c-alfa-Caroteno	no se detectó	no se detectó
t-beta-Caroteno	0.010	0.009
9-cis-beta-Caroteno	0.004	0.002
Lycopeno	no se detectó	no se detectó
Carotenoides totales	0.267	0.238
Clorofila	< 0.01 mg/kg	< 0.01 mg/kg
Tocoferoles y esteroides		
	Aceite prensado (mg/100 g)	Aceite extraído con disolvente (mg/100 g)
gamma-Tocoferol	0.49	0.49
Campesterol	6.09	6.05
Stigmasterol	47.6	47.8
beta-Sitosterol	11.6	11.5
Otros esteroides	445	446
Tocotrienoles		
	Aceite prensado (mg/g)	Aceite extraído con disolvente (mg/g)
alfa-Tocotrienol	0.26	0.26
beta-Tocotrienol	< 0.01	< 0.01
gamma-Tocotrienol	0.10	0.10
delta-Tocotrienol	< 0.01	< 0.01
Tocotrienoles totales	0.36	0.36

**[0330]** El aceite extraído de *Prototheca moriformis*, de cuatro lotes diferentes, se refinó y decoloró utilizando métodos de procesamiento de aceites vegetales estándares. Resumiendo, el aceite crudo extraído de *Prototheca moriformis* se clarificó en un decantador horizontal, donde se separaron los sólidos del aceite. A continuación, el aceite clarificado se transfirió a un tanque con ácido cítrico y agua, y se dejó que sedimentara durante aproximadamente 24 horas. Después de 24 horas, la mezcla del tanque formó dos fases diferentes. La fase inferior estaba compuesta por agua y productos gomosos, que posteriormente se eliminaron por decantación antes de transferir el aceite desgomado a un tanque de decoloración. A continuación, el aceite se calentó junto con otra dosis de ácido cítrico. Después se añadió arcilla decolorante al tanque de decoloración y la mezcla se calentó adicionalmente al vacío para evaporar cualquier resto de agua que estuviera presente. A continuación, la mezcla se bombeó a través de un filtro de hojas para eliminar la arcilla decolorante. Después el aceite filtrado se hizo pasar a través de un filtro pulidor final de 5 µm y a continuación se recolectó para almacenarlo hasta su uso. Después el aceite refinado y decolorado (RB) se analizó para determinar el contenido de carotenoides, clorofila, esteroides, tocotrienoles y tocoferoles. Los resultados de estos análisis se resumen en la Tabla 12 a continuación. "Nd" significa no detectado y la sensibilidad de la detección se especifica a continuación:

#### Sensibilidad de la detección

**[0331]** Carotenoides (mcg/g); nd = < 0.003 mcg/g

Clorofila (mcg/g); nd = < 0.03 mcg/g

Esteroides (%); nd = 0.25%

Tocoferoles (mcg/g); nd = 3 mcg/g

Tabla 12. Análisis de carotenoides, clorofila, esteroides, tocotrienoles y tocoferol de aceite refinado y decolorado de *Prototheca moriformis*.

5

	Lote A	Lote B	Lote C	Lote D	
	Carotenoides (mcg/g)				
10	Luteína	0.025	0.003	nd	0.039
	Zeaxantina	nd	nd	nd	nd
	cis-Luteína/Zeaxantina	nd	nd	nd	nd
	trans-alfa-Criptoxantina	nd	nd	nd	nd
15	trans-beta-Criptoxantina	nd	nd	nd	nd
	trans-alfa-Caroteno	nd	nd	nd	nd
	cis-alfa-Caroteno	nd	nd	nd	nd
	trans-beta-Caroteno	nd	nd	nd	nd
	cis-beta-Caroteno	nd	nd	nd	nd
20	Lycopeno	nd	nd	nd	nd
	No identificado	0.219	0.066	0.050	0.026
	Carotenoides totales	0.244	0.069	0.050	0.065
	Clorofila (mcg/g)				
25	Clorofila A	0.268	0.136	0.045	0.166
	Clorofila B	nd	nd	nd	nd
	Clorofila total	0.268	0.136	0.045	0.166
	Esteroides (%)				
30	Brasicasterol	nd	nd	nd	nd
	Campesterol	nd	nd	nd	nd
	Estigmasterol	nd	nd	nd	nd
	beta-Sitosterol	nd	nd	nd	nd
	Esteroides totales	nd	nd	nd	nd
	Tocoferoles (mcg/g)				
35	alfa-Tocoferol	23.9	22.8	12.5	8.2
	beta-Tocoferol	3.72	nd	nd	nd
	gamma-Tocoferol	164	85.3	43.1	38.3
	delta-Tocoferol	70.1	31.1	18.1	14.3
	Tocoferoles totales	262	139.2	73.7	60.8
	Tocotrienoles (mcg/g)				
40	alfa-Tocotrienol	190	225	253	239
	beta-Tocotrienol	nd	nd	nd	nd
	gamma-Tocotrienol	47.3	60.4	54.8	60.9
	delta-Tocotrienol	12.3	16.1	17.5	15.2
45	Tocotrienoles totales	250	302	325	315

**[0332]** Los mismos cuatro lotes de aceite de *Prototheca moriformis* también se analizaron para determinar los elementos traza y los resultados se resumen a continuación en la Tabla 13.

50

55

60

65

Tabla 13. Análisis elemental de aceite refinado y decolorado de *Prototheca moriformis*.

	Lote A	Lote B	Lote C	Lote D	
	Análisis elemental (ppm)				
5	Calcio	0.08	0.07	< 0.04	0.07
	Fósforo	< 0.2	0.38	< 0.2	0.33
10	Sodio	< 0.5	0.55	< 0.5	< 0.5
	Potasio	1.02	1.68	< 0.5	0.94
	Magnesio	< 0.04	< 0.04	< 0.04	0.07
	Manganeso	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
	Hierro	< 0.02	< 0.02	< 0.02	< 0.02
15	Zinc	< 0.02	< 0.02	< 0.02	< 0.02
	Cobre	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
	Azufre	2.55	4.45	2.36	4.55
	Plomo	< 0.2	< 0.2	< 0.2	< 0.2
	Silicio	0.37	0.41	0.26	0.26
20	Níquel	< 0.2	< 0.2	< 0.2	< 0.2
	Cloruro orgánico	< 1.0	< 1.0	< 1.0	2.2
	Cloruro inorgánico	< 1.0	< 1.0	< 1.0	< 1.0
	Nitrógeno	4.4	7.8	4.2	6.9
25	Litio	< 0.02	< 0.02	< 0.02	< 0.02
	Boro	0.07	0.36	0.09	0.38
	Aluminio	--	< 0.2	< 0.2	< 0.2
	Vanadio	< 0.05	< 0.05	< 0.05	< 0.05
	Color Lovibond (°L)				
30	Rojo	5.0	4.3	3.2	5.0
	Amarillo	70.0	70.0	50.0	70.0
	Mono- y diglicéridos por HPLC (%)				
35	Diglicéridos	1.68	2.23	1.25	1.61
	Monoglicéridos	0.03	0.04	0.02	0.03
	Ácidos grasos libres (FFA)	1.02	1.72	0.86	0.83
	Jabones	0	0	0	
	Triglicéridos oxidados y polimerizados				
40	Triglicéridos oxidados (%)	3.41	2.41	4.11	1.00
	Triglicéridos polimerizados (%)	1.19	0.45	0.66	0.31
45	Índice de peróxidos (meg/kg)	0.75	0.80	0.60	1.20
	Índice de p-anisidina (sin dimensión)	5.03	9.03	5.44	20.1
	Agua y otras impurezas (%)				
50	Humedad de Karl Fisher	0.8	0.12	0.07	0.18
	Compuestos polares totales	5.02	6.28	4.54	5.23
	Materia no saponificable	0.92	1.07	0.72	1.04
	Impurezas insolubles	< 0.01	< 0.01	0.01	< 0.01
	Aceite total (%)				
55	Aceite neutro	98.8	98.2	99.0	98.9

**EJEMPLO 2: Métodos generales para la transformación biolística de *Prototheca***

[0333] Se prepararon microportadores de oro de Seashell de 550 nanómetros de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se mezcló plásmido (20 µg) con 50 µL de tampón aglutinante y 60 µL (30 mg) de portadores de oro S550d y se incubó en hielo durante 1 min. Se añadió tampón de precipitación (100 µL) y la mezcla se incubó durante 1 min más. Después de agitar con vórtex, se formaron pellets de las partículas recubiertas con ADN centrifugándolas a 10 000 rpm en una microcentrífuga Eppendorf 5415C durante 10 segundos. El pellet de oro se lavó una vez con 500

µL de etanol al 100% frío, se formaron pellets por centrifugación breve en la microcentrífuga y se volvieron a suspender con 50 µL de etanol enfriado con hielo. Después de una breve sonicación (1-2 s), se transfirieron inmediatamente 10 µL de partículas recubiertas con ADN a la membrana portadora.

5 **[0334]** Se cultivaron cepas de *Prototheca* en medio Proteosa (2g/L de extracto de levadura, NaNO<sub>3</sub> 2.94 mM, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.17 mM, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.3 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.4 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.28 mM, NaCl 0.43 mM) con un 2% de glucosa en un agitador giratorio hasta que se obtuvo una densidad celular de 2 x 10<sup>6</sup> células/mL. Las células se recolectaron, se lavaron una vez con agua destilada estéril y se volvieron a suspender en 50 µL de medio. Se esparcieron 1 x 10<sup>7</sup> células en el tercer centro de una placa de medio Proteosa no selectivo. Las células se  
10 bombardearon con el sistema biolístico de suministro de partículas PDS-1000/He (Bio-Rad). Se utilizaron discos de ruptura (1350 psi) y las placas se colocaron 6 cm por debajo del montaje de macroportador/pantalla. Se dejó que las células se recuperasen a 25 °C durante 12–24 h. Tras la recuperación, se rasparon las células de las placas con una espátula de goma, se mezclaron con 100 µL de medio y se esparcieron en placas que contenían la selección adecuada de antibióticos. Después de 7-10 días de incubación a 25 °C, se pudieron observar colonias que representaban células  
15 transformadas en las placas. Las colonias se seleccionaron y se colocaron en placas de agar (con fuente de antibiótico o de carbón) para una segunda ronda de selección.

### EJEMPLO 3: Expresión de genes heterólogos de acil graso-ACP-tioesterasas en células de microalgas

20 **[0335]** Los métodos para la expresión de genes heterólogos de tioesterasas en células de microalgas, incluida la especie *Prototheca*, y sus resultados se han descrito previamente en la Solicitud de PCT N.º PCT/US2009/66412, que se incorpora a la presente por referencia. Este ejemplo describe los resultados obtenidos utilizando otros productos génicos/genes de tioesterasas de especies de plantas superiores.

25 **[0336]** Se introdujo una acil graso-ACP-tioesterasa de *Ricinus communis* en un entorno genético UTEX 1435 de *Prototheca moriformis*; la secuencia de ADNc con codones optimizados (SEQ ID NO:87) y las secuencias de aminoácidos (con N.º de acceso a GenBank ABS30422.1)(SEQ ID NO:88) se enumeran en la Lista de secuencias. El constructo de expresión contenía secuencias de modificación dirigida por recombinación homóloga 5' (SEQ ID NO:100) y 3' (SEQ ID NO:101) (flanqueando el constructo) para la región genómica 6S para la integración en el  
30 genoma nuclear y una región codificante de la sacarosa-invertasa de *S. cerevisiae* suc2 bajo el control del promotor/5'UTR de β-tubulina de *C. reinhardtii* y 3' UTR de la nitrato-reductasa de *Chlorella vulgaris*. Este casete de expresión de *S. cerevisiae* suc2 se enumera como la SEQ ID NO:78 y actuó como un marcador de selección. La región codificante de *R. communis* estaba bajo el control del promotor Amt03/5'UTR de *Prototheca moriformis* (SEQ ID NO:84) y 3'UTR de la nitrato-reductasa de *C. vulgaris* (SEQ ID NO:85). El péptido de tránsito nativo de *Ricinus communis* también se reemplazó por el péptido de tránsito de la estearoil-desaturasa de *C. protothecoides* (SEQ ID NO:86) y la secuencia de ADNc de la tioesterasa con el péptido de tránsito reemplazado se enumera como la SEQ ID NO:87. El casete de expresión entero de *Ricinus communis* se denominó pSZ1375 y se transformó en un entorno genético de *Prototheca moriformis*. Los clones positivos se evaluaron en placas con sacarosa como única fuente de  
40 carbono. Se seleccionó un subconjunto de los clones positivos, se cultivaron en condiciones de producción de lípidos y se determinaron los perfiles lipídicos (ácidos grasos) utilizando métodos de transesterificación directa según se ha descrito anteriormente. Los perfiles de ácidos grasos de los clones seleccionados se resumen en la Tabla 14 a continuación.

45 Tabla 14. Perfiles de ácidos grasos de células de *Prototheca* transgénicas con ACP-tioesterasa de *Ricinus communis*.

Cepa	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
50 natural	0.01	0.03	0.98	24.65	3.68	62.48	6.26
clon A de pSZ1375	0.01	0.03	0.91	18.34	2.55	67.93	8.35
55 clon B de pSZ1375	0.01	0.03	0.97	18.51	2.47	67.83	8.25
clon C de pSZ1375	0.01	0.03	0.93	18.65	2.84	67.58	7.90
60 clon D de pSZ1375	0.01	0.03	0.92	18.90	2.30	67.48	8.37

65

[0337] Los resultados indican que los transformantes con el transgén de tioesterasa de *Ricinus communis* presentan niveles modificados de ácidos grasos C16:0 y, en menor grado, de ácidos grasos C18:0, en comparación con la cepa natural. Además, se observó un aumento concomitante del nivel de ácidos grasos C18:1 en comparación con el nivel natural.

**EJEMPLO 4: Modificación de los niveles de ácidos grasos saturados en las microalgas *Prototheca moriformis***

**A.Reducción de la expresión de la estearoil-ACP-desaturasa y la delta 12-ácido graso-desaturasa mediante una estrategia de desactivación génica**

[0338] Como parte de un análisis genómico utilizando una estrategia bioinformática basada en ADNc, el transcriptoma de Illumina y la secuenciación de Roche 454 del ADN genómico de *Prototheca moriformis* (UTEX 1435), se identificaron dos grupos específicos de genes implicados en la desaturación de ácidos grasos: estearoil-ACP-desaturasas (SAD) y delta 12-ácido graso-desaturasas ( $\Delta 12$  FAD). Las enzimas estearoil-ACP-desaturasas son parte de la vía de síntesis de lípidos y actúan introduciendo dobles enlaces en las cadenas de los ácidos grasos, por ejemplo, la síntesis de ácidos grasos C18:1 a partir de ácidos grasos C18:0. Las delta 12-ácido graso-desaturasas también son parte de la vía de síntesis de lípidos y actúan introduciendo dobles enlaces en los ácidos grasos ya insaturados, por ejemplo, la síntesis de ácidos grasos C18:2 a partir de ácidos grasos C18:1. Los análisis de inmunotransferencia de Southern utilizando sondas basadas en las dos clases de genes de desaturasas de ácidos grasos identificadas durante los estudios bioinformáticos indicaron que cada clase de genes de desaturasas comprendía probablemente múltiples miembros de la familia. Además, los genes que codificaban estearoil-ACP-desaturasas pertenecían a dos familias distintas. Basándose en estos resultados, se diseñaron tres constructos de alteración génica para alterar múltiples miembros de la familia de genes mediante la modificación dirigida de regiones codificantes más altamente conservadas en cada familia de enzimas desaturasas.

[0339] Se diseñaron tres constructos de modificación dirigida recombinantes homólogos utilizando: (1) porciones altamente conservadas de la secuencia codificante de los miembros de la familia de delta 12-ácido graso-desaturasas (d12FAD) y (2) dos constructos que tenían como diana cada una de las dos familias diferentes de SAD, cada uno de ellos con regiones conservadas de las secuencias codificantes de cada familia. Esta estrategia está diseñada para embeber un gen marcador seleccionable (el casete de la sacarosa-invertasa *suc2* de *S. cerevisiae* que confiere la capacidad para hidrolizar sacarosa) en estas regiones codificantes altamente conservadas (que tienen múltiples miembros de la familia como diana), en lugar de una estrategia clásica de reemplazo de genes en la que la recombinación homóloga tendría como diana regiones flanqueantes del gen diana.

[0340] Todos los constructos se introdujeron en las células mediante una transformación biolística utilizando los métodos descritos anteriormente y los constructos se linealizaron antes de ser bombardeados en las células. Los transformantes se seleccionaron en medios/placas que contenían sacarosa y los cambios en el perfil de ácidos grasos se analizaron utilizando el método descrito anteriormente. A continuación se enumeran las secuencias relevantes de cada uno de los tres constructos de modificación dirigida.

Descripción	SEQ ID NO:
Secuencia 5' del constructo de modificación dirigida a d12FAD	SEQ ID NO:30
Secuencia 3' del constructo de modificación dirigida a d12FAD	SEQ ID NO:31
Secuencia de ADNc del constructo de modificación dirigida a d12FAD	SEQ ID NO:32
Secuencia 5' del constructo de modificación dirigida a SAD2A	SEQ ID NO:33
Secuencia 3' del constructo de modificación dirigida a SAD2A	SEQ ID NO:34
Secuencia de ADNc del constructo de modificación dirigida a SAD2A	SEQ ID NO:35
Secuencia 5' del constructo de modificación dirigida a SAD2B	SEQ ID NO:36
Secuencia 3' del constructo de modificación dirigida a SAD2B	SEQ ID NO:37
Secuencia de ADNc del constructo de modificación dirigida a SAD2B	SEQ ID NO:38

[0341] Se seleccionaron los clones positivos representativos de las transformaciones con cada uno de los constructos y se determinaron los perfiles de ácidos grasos para estos clones (expresados en % de área), los cuales se resumen en la Tabla 15 a continuación.

Tabla 15. Perfiles de ácidos grasos para las desactivaciones de desaturasas.

Ácido graso	Desactivación de $\Delta 12$ FAD	Desactivación de SAD2A	Desactivación de SAD2B	peso de UTEX 1435
C8:0	0	0	0	0
C10:0	0.01	0.01	0.01	0.01
C12:0	0.03	0.03	0.03	0.03
C14:0	1.08	0.985	0.795	1.46
C16:0	24.42	25.335	23.66	29.87
C18:0	6.85	12.89	19.555	3.345
C18:1	58.35	47.865	43.115	54.09
C18:2	7.33	10.27	9.83	9.1
C18:3 alfa	0.83	0.86	1	0.89
C20:0	0.48	0.86	1.175	0.325

[0342] Cada uno de los constructos presentó un efecto considerable sobre la clase deseada de ácido graso y en los tres casos los niveles de C18:0 aumentaron de forma significativa, particularmente con las desactivaciones de las dos SAD. Una comparación adicional de múltiples clones de las desactivaciones de SAD indicó que las líneas de desactivación de SAD2B presentaban unas reducciones significativamente mayores de los niveles de ácidos grasos C18:1 que de los ácidos grasos C18:1 observados con las líneas de desactivación de SAD2A.

[0343] Se generaron desactivaciones adicionales de  $\Delta 12$ -ácido graso-desaturasa (FAD) en un entorno de *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) utilizando los métodos descritos anteriormente. Para identificar homólogos potenciales de  $\Delta 12$ FAD, se utilizaron los siguientes cebadores para amplificar una región genómica codificante de un FAD putativo:

Cebador 1: 5'-TCACTTCATGCCGCGGTCC-3'

SEQ ID NO:74

Cebador 2: 5'- GCGCTCCTGCTTGCTCGAA-3'

SEQ ID NO:75

[0344] Las secuencias resultantes de la amplificación genómica del ADN genómico de *Prototheca moriformis* utilizando los cebadores anteriores fueron muy similares, pero indicaron que existen múltiples genes o alelos de  $\Delta 12$ FADs en *Prototheca moriformis*.

[0345] Basándose en este resultado, se diseñaron dos constructos de alteración de genes para suprimir uno o más genes de  $\Delta 12$ FAD. La estrategia consistía en embeber un casete de sacarosa-invertasa (*suc2* de *S. cerevisiae*), de este modo se conferiría la capacidad para hidrolizar sacarosa como un marcador seleccionable en regiones codificantes altamente conservadas en lugar de utilizar una estrategia clásica de reemplazamiento de genes. El primer constructo, denominado pSZ1124, contenía secuencias de modificación dirigida genómica 5' y 3' flanqueando un promotor de  $\beta$ -tubulina de *C. reinhardtii* que dirige la expresión del gen *suc2* de *S. cerevisiae* y una 3'UTR de la nitrato-reductasa de *Chlorella vulgaris* (casete *suc2* de *S. cerevisiae*). El segundo constructo, denominado pSZ1125, contenía secuencias de modificación dirigida genómica 5' y 3' flanqueando un promotor de  $\beta$ -tubulina de *C. reinhardtii* que dirige la expresión del gen *suc2* de *S. cerevisiae* y una 3'UTR de nitrato-reductasa de *Chlorella vulgaris*. Las secuencias relevantes de los constructos se enumeran en el Listado de Secuencias:

Secuencia 5' de modificación dirigida genómica para pSZ1124 (FAD2B)	SEQ ID NO:76
Secuencia 3' de modificación dirigida genómica para pSZ1124 (FAD2B)	SEQ ID NO:77
Casete <i>suc2</i> de <i>S. cerevisiae</i>	SEQ ID NO:78
Secuencia 5' de modificación dirigida genómica para pSZ1125 (FAD2C)	SEQ ID NO:79
Secuencia 3' de modificación dirigida genómica para pSZ1125 (FAD2C)	SEQ ID NO:80

[0346] pSZ1124 y pSZ1125 se introdujeron, cada uno de ellos, en un entorno de *Prototheca moriformis* y se seleccionaron los clones positivos basándose en la capacidad para hidrolizar sacarosa. La Tabla 16 resume los perfiles de ácidos grasos (en % de área, que se generó utilizando los métodos descritos anteriormente) obtenidos en dos líneas transgénicas en las que se utilizaron los vectores de modificación dirigida pSZ1124 y pSZ1125.

Tabla 16. Perfiles de ácidos grasos para las desactivaciones de  $\Delta 12$ -FAD.

	C10: 0	C12: 0	C14: 0	C16: 0	C16: 1	C18: 0	C18: 1	C18: 2	C18: 3 $\alpha$
original	0.01	0.03	1.15	26.13	1.32	4.39	57.20	8.13	0.61
FAD2B	0.02	0.03	0.80	12.84	1.92	0.86	74.74	7.08	0.33
FAD2C	0.02	0.04	1.42	25.85	1.65	2.44	66.11	1.39	0.22

**[0347]** Las líneas transgénicas que contenían el constructo de FAD2B (pSZ1124) presentaron un resultado inesperado y muy interesante en el perfil lipídico, ya que los niveles de C18:2, que cabría esperar que se hubieran reducido, solo disminuyeron aproximadamente un 1% de área. Sin embargo, los niveles de ácidos grasos C18:1 aumentaron significativamente, casi exclusivamente a costa de los niveles de C16:0, que se redujeron significativamente. Las líneas transgénicas que contenían el constructo de FAD2C (pSZ1125) también presentaron un cambio en el perfil de ácidos grasos: los niveles de C18:2 se redujeron significativamente, junto con un aumento correspondiente de los niveles de C18:1.

#### **B.Estrategia de ARN horquillado para reducir la expresión de delta 12-desaturasa (FADc) en células de Prototheca**

**[0348]** Se introdujeron vectores que reducen la expresión génica de FADc (gen de delta 12-desaturasa) mediante ARN horquillados en un entorno genético UTEX 1435 de *Prototheca moriformis*. El gen de la sacarosa-invertasa suc2 de *Saccharomyces cerevisiae* se utilizó como un marcador seleccionable, que confiere capacidad para crecer en sacarosa como única fuente de carbono para obtener clones positivos, y se utilizaron dos tipos de constructos. El primer tipo de constructo utilizó una porción del primer exón de la región codificante de FADc unida en cis a su primer intrón, seguida de una unidad de repetición del primer exón en orientación inversa. Este tipo de constructo se diseñó para que forme una horquilla cuando se exprese como ARNm. Se crearon dos constructos de este primer tipo, uno dirigido por el promotor Amt03 de *Prototheca moriformis* (SEQ ID NO:84), denominado pSZ1468, y un segundo dirigido por el promotor de  $\beta$ -tubulina de *Chlamydomonas reinhardtii* (SEQ ID NO:89), denominado pSZ1469. El segundo tipo de constructo utilizó el exón 2 grande de FADc en la orientación antisentido dirigido por el promotor Amt03 de *Prototheca moriformis* (SEQ ID NO:84), denominado pSZ1470, o dirigido por el promotor de  $\beta$ -tubulina de *Chlamydomonas reinhardtii* (SEQ ID NO:89), denominado pSZ1471. Los cuatro constructos tenían un casete de sacarosa-invertasa suc2 de *S. cerevisiae* (SEQ ID NO:78) y secuencias de modificación dirigida por recombinación homóloga 5' (SEQ ID NO:100) y 3' (SEQ ID NO:101) (flanqueando el constructo) para la región genómica 6S para la integración en el genoma nuclear. Las secuencias de las porciones de FADc de cada constructo de ARN horquillado, junto con las porciones relevantes de cada constructo, se enumeran en el Listado de Secuencias como se indica a continuación:

Descripción	SEQ ID NO:
Casete de ARN horquillado para FADc pSZ1468	SEQ ID NO:90
Porciones relevantes del constructo pSZ1468	SEQ ID NO:91
Casete de ARN horquillado para FADc pSZ1469	SEQ ID NO:92
Porciones relevantes del constructo pSZ1469	SEQ ID NO:93
Exón 2 de FADc de un casete de ARN horquillado pSZ1470	SEQ ID NO:94
Porciones relevantes del constructo pSZ1470	SEQ ID NO:95
Exón 2 de FADc de un casete de ARN horquillado pSZ1471	SEQ ID NO:96
Porciones relevantes del constructo pSZ1471	SEQ ID NO:97

**[0349]** Cada uno de los cuatro constructos se transformó en un entorno de *Prototheca moriformis* y los clones positivos se evaluaron utilizando placas con sacarosa como única fuente de carbono. Se seleccionaron los clones positivos de cada transformación y se seleccionó un subconjunto para determinar el efecto de los casetes de tipo antisentido y horquillado contenidos en pSZ1468, pSZ1469, pSZ1470 y pSZ1471 sobre los perfiles de ácidos grasos. Los clones seleccionados de cada transformación se cultivaron en condiciones de producción de lípidos y se determinaron los perfiles de ácidos grasos utilizando métodos de transesterificación directa según se ha descrito anteriormente. Los perfiles de ácidos grasos representativos de cada una de las transformaciones se resumen a continuación en la Tabla 17. Las células de origen natural 1 y 2 eran células de *Prototheca moriformis* no transformadas que se analizaron con cada uno de los transformantes como control negativo

Tabla 17. Perfiles de ácidos grasos de células de *Prototheca moriformis* que contenían constructos de ARN horquillado para reducir la expresión del gen de delta 12-desaturasa (FADc).

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

Cepa	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
origen natural 1	0.01	0.03	1.20	27.08	4.01	57.58	7.81
clon A de pSZ1468	0.01	0.04	1.33	25.95	3.68	65.60	1.25
clon B de pSZ1468	0.01	0.03	1.18	23.43	2.84	65.32	4.91
clon C de pSZ1468	0.01	0.04	1.34	23.18	4.27	63.65	5.17
clon D de pSZ1468	0.01	0.03	1.24	23.00	3.85	61.92	7.62
clon A de pSZ1470	0.01	0.03	1.23	24.79	4.33	58.43	8.92
clon B de pSZ1470	0.01	0.03	1.26	24.91	4.14	57.59	9.64
clon C de pSZ1470	0.01	0.03	1.21	23.35	4.75	58.52	9.70
origen natural 2	0.01	0.03	0.98	24.65	3.68	62.48	6.26
clon A de pSZ1469	0.01	0.03	1.05	21.74	2.71	71.33	1.22
clon B de pSZ1469	0.01	0.03	1.01	22.60	2.98	70.19	1.27
clon C de pSZ1469	0.01	0.03	1.03	19.82	2.38	72.95	1.82
clon D de pSZ1469	0.01	0.03	1.03	20.54	2.66	70.96	2.71
clon A de pSZ1471	0.01	0.03	1.03	18.42	2.63	66.94	8.55
clon B de pSZ1471	0.01	0.03	0.94	18.61	2.58	67.13	8.66
clon C de pSZ1471	0.01	0.03	1.00	18.31	2.46	67.41	8.71
clon D de pSZ1471	0.01	0.03	0.93	18.82	2.54	66.84	8.77

[0350] Los resultados anteriores indican que los constructos de horquilla pSZ1468 y pSZ1469 presentaron los fenotipos esperados: una reducción de los niveles de ácidos grasos C18:2 y un aumento de los niveles de ácidos grasos C18:1, en comparación con los de origen natural 1 y origen natural 2, respectivamente. Los constructos antisentido, pSZ1470 y pSZ1471, no dieron como resultado ninguna reducción de los niveles de ácidos grasos C18:2, pero en su lugar presentaron un ligero aumento en comparación con los de origen natural 1 y origen natural 2, respectivamente, y una ligera reducción de los niveles de ácidos grasos C16:0.

### C. Expresión de una esteroil-ACP-desaturasa exógena

[0351] Se introdujo esteroil-ACP-desaturasa de *Olea europaea* (N.o de acceso a GenBank AAB67840.1) en un entorno genético UTEX1435 de *Prototheca moriformis*. El constructo de expresión contenía secuencias de modificación dirigida por recombinación homóloga 5' (SEQ ID NO:100) y 3' (SEQ ID NO:101) (flanqueando el constructo) para la región genómica 6S para la integración en el genoma nuclear y una región codificante de la sacarosa-invertasa de *S. cerevisiae* suc2 bajo el control del promotor de  $\beta$ -tubulina/5'UTR de *C. reinhardtii* y 3' UTR de la nitrato-reductasa de *Chlorella vulgaris*. Este casete de expresión de *S. cerevisiae* suc2 se enumera como la SEQ ID NO:78 y actuó como un marcador de selección. La región codificante de la esteroil-ACP-desaturasa de *Olea europaea* estaba bajo el control del promotor Amt03/5'UTR de *Prototheca moriformis* (SEQ ID NO:84) y 3'UTR de la nitrato-reductasa de *C. vulgaris*, y el péptido de tránsito nativo se reemplazó por el péptido de tránsito de la esteroil-ACP-desaturasa de *Chlorella protothecoides* (SEQ ID NO:86). Las secuencias de ADNc con codones optimizados y las secuencias de aminoácidos (con el péptido de tránsito reemplazado) se enumeran en el Listado de Secuencias como SEQ ID NO:98 y SEQ ID NO:99, respectivamente. El casete de expresión entero de SAD de *O. europaea* se denominó pSZ1377 y se transformó en un entorno genético de *Prototheca moriformis*. Los clones positivos se evaluaron en placas con sacarosa como única fuente de carbono. Se seleccionó un subconjunto de los clones positivos, se cultivaron en condiciones de producción de lípidos y se determinaron los perfiles de ácidos grasos utilizando métodos de transesterificación directa según se ha descrito anteriormente. Los perfiles de ácidos grasos de los clones seleccionados se resumen en la Tabla 18 a continuación.

Tabla 18. Perfil de ácidos grasos de células de *Prototheca moriformis* transgénicas con esteroil-ACP-desaturasa de *Olea europaea*.

Cepa	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
natural	0.88	22.82	3.78	64.43	6.54
clon A de pSZ1377	0.94	18.60	1.50	69.45	7.67
clon B de pSZ1377	0.93	18.98	1.35	69.12	7.67
clon C de pSZ1377	0.93	19.01	2.31	68.56	7.43

[0352] Los resultados anteriores demuestran que la introducción de una desaturasa heteróloga, en este caso una esteroil-ACP-desaturasa de *Olea europaea*, puede dar como resultado unos niveles más elevados de ácidos grasos C18:1 y una reducción concomitante de los niveles de ácidos grasos C18:0 y C16:0.

### EJEMPLO 5: Cultivo de levadura oleaginosa

[0353] Las cepas de levadura oleaginosa utilizadas en este ejemplo y en los ejemplos posteriores se obtuvieron de Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), situado en Inhoffenstrabe 7B, 38124 Braunschweig, Alemania, o de Centraalbureau voor Schimmelscultures (CBS) Fungal Biodiversity Centre situado en P.O. Box 85167, 3508 Utrecht, Holanda. Se analizaron ciento ochenta y cinco cepas de levadura oleaginosa para determinar su tasa de crecimiento y producción de lípidos.

[0354] Todas las cepas se volvieron axénicas mediante siembra en estrías para obtener colonias únicas en placas de agar YPD (medio YPD según se describe a continuación con un 2% de agar añadido). Se seleccionaron colonias únicas de las placas de YPD de cada cepa y se cultivaron hasta la fase logarítmica tardía en medio YPD (10 g de

extracto de bacto-levadura, 20 g de bacto-peptona y 20 g de glucosa/1 L de volumen final en agua destilada) en un agitador rotatorio a 200 rpm y 30 °C.

5 **[0355]** Para evaluar la productividad de lípidos, se añadieron 2 mL de medio YPD a un tubo de biorreactor tarado de 50 mL (MidSci, Inc.) y se inoculó un estándar congelado de cada cepa. A continuación, los tubos se introdujeron en una incubadora a 30 °C y se cultivaron durante 24 horas, agitando a 200 rpm para generar un cultivo de siembra. Después de 24 horas, se añadieron 8 mL de medio Y1 (base de nitrógeno para levaduras sin aminoácidos, Difco) que contenía tampón de ftalato 0.1 M, pH de 5.0, y se mezcló debidamente pipeteando cuidadosamente. El cultivo resultante se dividió por igual en un segundo tubo de biorreactor tarado. A continuación, los cultivos duplicados resultantes de 5 mL cada uno se introdujeron en una incubadora a 30 °C con agitación de 200 rpm durante 5 días. A continuación, se recolectaron las células para determinar la productividad de lípidos y el perfil lipídico. Se utilizaron 3 mL del cultivo para determinar el peso seco de las células y el contenido lipídico total (productividad de lípidos) y se utilizó 1 mL para determinar el perfil de ácidos grasos. En cada caso, los cultivos se introdujeron en tubos y se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 minutos para formar pellets a partir de las células. Después de decantar el sobrenadante, se añadieron 2 mL de agua desionizada a cada tubo y se utilizaron para lavar el pellet celular resultante. Los tubos se volvieron a centrifugar a 3500 rpm durante 10 minutos para formar pellets a partir de las células lavadas, a continuación se decantó el sobrenadante y los pellets celulares se guardaron en un congelador a -70 °C durante 30 minutos. A continuación, los tubos se transfirieron a un liofilizador durante toda la noche para secarlos. Al día siguiente, se registró el peso del tubo cónico más la biomasa seca resultante de los 3 mL de cultivo y el pellet celular resultante se sometió a una extracción lipídica total utilizando un sistema de hidrólisis ácida de Ankom (de acuerdo con las instrucciones del fabricante) para determinar el contenido lipídico total.

20 **[0356]** De las 185 cepas analizadas, se seleccionaron 30 cepas basándose en la tasa de crecimiento y la productividad de lípidos. La productividad de lípidos (expresada como el porcentaje de lípidos respecto el peso seco de las células) de estas 30 cepas se resume a continuación en la Tabla 19.

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabla 19. Productividad de lípidos de las cepas de levadura oleaginosas.

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

<b>Especie</b>	<b>N.º de colección</b>	<b>% de lípidos (PSC)</b>
<i>Rhodotorula terpenoidalis</i>	CBS 8445	27
<i>Rhodotorula glutinus</i>	DSMZ 70398	53.18
<i>Lipomyces tetrasporous</i>	CBS 1810	51
<i>Lipomyces tetrasporous</i>	CBS 7656	17.63
<i>Lipomyces tetrasporous</i>	CBS 8724	18
<i>Cryptococcus curvatus</i>	CBS 5324	53
<i>Cryptococcus curvatus</i>	CBS 2755	48
<i>Rhodospiridium sphaerocarpum</i>	CBS 2371	43
<i>Rhodotorula glutinus</i>	CBS 4476	30.97
<i>Lipomyces tetrasporous</i>	CBS 1808	29
<i>Trichosporon domesticum</i>	CBS 8111	35.16
<i>Trichosporon sp.</i>	CBS 7617	40.09
<i>Lipomyces tetrasporous</i>	CBS 5911	27.63
<i>Lipomyces tetrasporous</i>	CBS 5607	12.81
<i>Cryptococcus curvatus</i>	CBS 570	38.64
<i>Cryptococcus curvatus</i>	CBS 2176	40.57
<i>Cryptococcus curvatus</i>	CBS 5163	35.26
<i>Torulaspora delbruekii</i>	CBS 2924	40.00
<i>Rhodotorula toruloides</i>	CBS 8761	36.52
<i>Geotrichum histeridarum</i>	CBS 9892	33.77
<i>Yarrowia lipolytica</i>	CBS 6012	29.21
<i>Geotrichum vulgare</i>	CBS 10073	28.04
<i>Trichosporon montevidense</i>	CBS 8261	25.60
<i>Lipomyces starkeyi</i>	CBS 7786	25.43
<i>Trichosporon behrend</i>	CBS 5581	23.93
<i>Trichosporon loubieri var. loubieri</i>	CBS 8265	22.39
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	CBS 14	21.03
<i>Trichosporon brassicae</i>	CBS 6382	20.34
<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	CBS 317	17.51
<i>Sporobolomyces alborubescens</i>	CBS 482	10.09

[0357] Los pellets celulares resultantes de 1 mL de cultivo se sometieron a transesterificación directa y análisis de GC para determinar el perfil de ácidos grasos. En la Tabla 20 a continuación se indica un resumen de los perfiles de ácidos grasos para 17 de las cepas de levadura anteriores.

5 Tabla 20. Perfiles de ácidos grasos para las cepas de levadura oleaginosas.

Especie	N.º de colección	C12:0	C14:0	C15:0	C16:0	C16:1	C17:0	C17:1	C18:0	C18:1	C18:2	> C20
10 <i>Rhodotorula terpenoidalis</i>	CBS 8445	0.06	0.8	0.02	27.44	0.67	0.03	0.03	5.6	59.44	3.37	2.13
15 <i>Rhodotorula glutinus</i>	DSMZ 70398	0.05	1.55	0.09	27.34	0.34	0.23	0.08	10.47	44.68	11.65	2.23
<i>Lipomyces tetrasporous</i>	CBS 1810	nd	0.26	0.08	24.22	2.13	0.28	0.30	9.93	55.04	4.48	3.01
20 <i>Lipomyces tetrasporous</i>	CBS 76556	nd	0.293	0.212	28.14	4.24	0.37	0.66	6.61	48.48	8.33	1.178
<i>Lipomyces tetrasporous</i>	CBS 8724	nd	0.27	0.08	30.69	2.12	0.27	0.24	11.8	46.71	4.36	2.89
25 <i>Cryptococcus curvatus</i>	CBS 5324	nd	0.27	0.22	23.31	0.49	0.12	0.09	11.55	50.78	10.80	1.61
<i>Cryptococcus curvatus</i>	CBS 27556	nd	0.62	0.03	25.07	0.31	0.05	0.03	17.07	45.74	14.60	2.01
30 <i>Rhodosporidium sphaerocarpum</i>	CBS 2371	0.03	0.68	0.03	17.86	0.13	0.54	0.17	10.4	51.01	14.60	1.82
<i>Rhodotorula glutinus</i>	CBS 4476	0.021	0.47	0.02	24.64	0.16	0.064	0.27	13.73	42.46	16.29	1.642
35 <i>Lipomyces tetrasporous</i>	CBS 1808	0.01	0.40	0.12	26.64	3.11	0.25	0.39	7.39	54.15	3.96	2.34
<i>Trichosporon domesticum</i>	CBS 8111	0.066	0.486	0.10	23.19	0.11	0.37	0.033	30.65	29.75	11.66	3.414
40 <i>Trichosporon sp.</i>	CBS 7617	0.046	0.527	0.063	24.26	0.187	0.171	0.026	19.61	41.95	9.97	2.61
<i>Lipomyces tetrasporous</i>	CBS 5911	0.017	0.45	0.16	30.79	3.56	0.29	0.48	7.77	49.99	4.40	1.433
45 <i>Lipomyces tetrasporous</i>	CBS 5607	nd	0.35	0.17	37.56	3.0	0.328	0.40	9.31	42.36	4.28	1.376
<i>Cryptococcus curvatus</i>	CBS 570	0.017	0.21	0.09	12.78	0.13	0.147	0.09	19.6	53.17	8.42	4.01
50 <i>Cryptococcus curvatus</i>	CBS 2176	0.02	0.31	0.09	19.0	0.87	0.08	0.10	7.24	60.51	9.26	2.154
<i>Cryptococcus curvatus</i>	CBS 5163	0.019	0.34	0.06	22.7	0.70	0.13	0.10	10.65	51.36	10.34	2.24
55	nd significa no detectado.											

60 [0358] El análisis del perfil de ácidos grasos se realizó en cepas adicionales de levadura oleaginosas y se observó que varias cepas producían un porcentaje elevado de ácidos grasos C16:1, incluida la cepa CBS 2924 de *Torulasporea delbruekii*. Esta cepa de levadura oleaginosas presentó una productividad de lípidos de aproximadamente un 40% de lípidos como porcentaje respecto al PSC y un perfil de ácidos grasos de: C12:0 (0.36%); C14:0 (1.36%); C15:0 (0.16%); C16:0 (10.82%); C 16:1 (42.9%); C17:0 (0.11%); C18:0 (2.1%); C18:1 (35.81%); C18:2 (4.62%). Se observó que esta cepa presentaba un porcentaje particularmente elevado de C16:1 (ácido palmitoleico) como parte de su perfil de ácidos grasos. Se identificaron cuatro cepas más que producían un porcentaje elevado de 16:1: CBS 6012 de *Yarrowia*

lipolytica (10.10%); CBS 6331 de *Yarrowia lipolytica* (14.80%), CBS 10144 de *Yarrowia lipolytica* (12.90%) y CBS 5589 de *Yarrowia lipolytica* (14.20%).

#### EJEMPLO 6: Genotipado de las cepas de levadura oleaginosa

**[0359]** Se realizó el genotipado de 48 cepas diferentes de levadura oleaginosa. El ADN genómico se aisló a partir de cada una de las 48 cepas diferentes de biomasa de levadura oleaginosa como se indica a continuación. Se centrifugaron células (aproximadamente 200 mg) de cultivos líquidos 5 minutos a 14 000 x g. Las células se resuspendieron después en agua destilada estéril, se centrifugaron 5 minutos a 14 000 x g y se desechó el sobrenadante. Se añadió una única microesfera de cristal con un diámetro de ~ 2 mm a la biomasa y los tubos se trataron a -80 °C durante al menos 15 minutos. Se retiraron las muestras y se añadieron 150 µL de tampón de trituración (1% de Sarkosil, sacarosa 0.25 M, NaCl 50 mM, EDTA 20 mM, Tris-HCl 100 mM, pH de 8.0, 0.5 µg/µL de ARNasa A). Se volvieron a suspender los pellets agitando brevemente con un vórtex y a continuación se añadieron 40 µL de NaCl 5 M. Las muestras se agitaron brevemente con un vórtex, a continuación se añadieron 66 µL de CTAB al 5% (bromuro de cetiltrimetilamonio) y se agitó brevemente por última vez con un vórtex. Posteriormente, las muestras se incubaron a 65 °C durante 10 minutos y después se centrifugaron a 14 000 x g durante 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se extrajo una vez con 300 µL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 12:12:1, a continuación se centrifugó durante 5 minutos a 14 000 x g. La fase acuosa resultante se transfirió a un tubo nuevo que contenía 0.7 volúmenes de isopropanol (~ 190 µL), se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos o durante toda la noche a 4 °C. El ADN se obtuvo por centrifugación a 14 000 x g durante 10 minutos. A continuación, el pellet resultante se lavó dos veces con etanol al 70% y después se realizó un lavado final con etanol al 100%. Los pellets se secaron al aire durante 20-30 minutos a temperatura ambiente, y después se volvieron a suspender en 50 µL de TrisCl 10 mM, EDTA 1 mM (pH de 8.0).

**[0360]** Se diluyeron cinco µL de ADN total de algas, preparado como se ha descrito anteriormente, con un factor de 1:50 en Tris 10 mM, pH de 8.0. Las reacciones de PCR, con un volumen final de 20 µL, se llevaron a cabo como se indica a continuación. Se añadieron diez µL de mezcla patrón 2 x iProof HF (Bio-Rad) a 0.4 µL del cebador directo SZ5434 (5' GTCCCTGCCCTTTGTACACAC -3' (SEQ ID NO:39) con una concentración estándar de 10 mM) y 0.4 µL del cebador inverso SZ5435 (5'- ttgatgcttaagttcagcggg -3' (SEQ ID NO:40) con una concentración estándar de 10 mM). Los cebadores se seleccionaron basándose en la conservación de la secuencia entre tres regiones principales de 18S y cinco regiones principales de genes de ARNr 26S fúngicos. El cebador directo es idéntico a los nucleótidos 1632-1652 del N.o de acceso a Genbank AY550243 y el cebador inverso es idéntico a los nucleótidos 464271-464293 del N.o de acceso a Genbank NC\_001144. A continuación, se añadieron 5 µL de ADN total diluido y 3.2 µL de dH<sub>2</sub>O. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo como se indica a continuación: 98 °C, 45"; 98 °C, 8"; 53 °C, 12"; 72 °C, 20" durante 35 ciclos seguidos de 72 °C durante 1 minuto y manteniéndose a 25 °C. Para la purificación de los productos de PCR, se añadieron 20 µL de Tris 10 mM, pH de 8.0, a cada reacción, a continuación se extrajo con 40 µL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 12:12:1, se agitó con vórtex y se centrifugó a 14 000 x g durante 5 minutos. Las reacciones de PCR se trataron en columnas S-400 (GE Healthcare) y se centrifugaron durante 2 minutos a 3000 x g. Los productos purificados de PCR resultantes se clonaron y transformaron en *E. coli* utilizando el kit del vector ZeroBlunt PCR4Blunt-TOPO (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo directamente en colonias resistentes a ampicilina. El ADN del plásmido purificado se secuenció en ambas direcciones utilizando cebadores M13 directos e inversos. Posteriormente, los productos purificados de PCR se sometieron a clonación TOPO en PCR8/GW/TOPO y se seleccionaron los clones positivos para placas de LB/Spec. El ADN del plásmido purificado se secuenció en ambas direcciones utilizando cebadores M13 directos e inversos.

**[0361]** En la Tabla 21 se indica una lista de las 48 cepas de levadura oleaginosa que fueron genotipadas, junto con las SEQ ID NO correspondientes

Tabla 21. Cepas de levadura oleaginosas genotipadas.

5	Nombre de la cepa	Número de la cepa	SEQ ID NO
	<i>Rhodotorula glutinis</i>	DSMZ-DSM 7098	SEQ ID NO:41
	<i>Lipomyces tetrasporus</i>	CBS 5911	SEQ ID NO:41
10	<i>Rhodotorula glutinis</i> var. <i>glutinis</i>	CBS 3044	SEQ ID NO:42
	<i>Lipomyces tetrasporus</i>	CBS 8664	SEQ ID NO:42
	<i>Lipomyces tetrasporus</i>	CBS 1808	SEQ ID NO:43
15	<i>Lipomyces tetrasporus</i>	CBS 1810	SEQ ID NO:43
	<i>Lipomyces starkeyi</i>	CBS 1809	SEQ ID NO:44
	<i>Trichosporon montevidense</i>	CBS 8261	SEQ ID NO:44
	<i>Yarrowia lipolytica</i>	CBS 6331	SEQ ID NO:45
20	<i>Cryptococcus curvatus</i>	CBS 5324	SEQ ID NO:46
	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> var. <i>mucilaginosa</i>	CBS 316	SEQ ID NO:46
25	<i>Cryptococcus curvatus</i>	CBS 570	SEQ ID NO:46
	<i>Cryptococcus curvatus</i>	CBS 2176	SEQ ID NO:46
	<i>Cryptococcus curvatus</i>	CBS 2744	SEQ ID NO:46
30	<i>Cryptococcus curvatus</i>	CBS 2754	SEQ ID NO:46
	<i>Cryptococcus curvatus</i>	CBS 2829	SEQ ID NO:46
	<i>Cryptococcus curvatus</i>	CBS 5163	SEQ ID NO:46
	<i>Cryptococcus curvatus</i>	CBS 5358	SEQ ID NO:46
35	<i>Trichosporon</i> sp.	CBS 7617	SEQ ID NO:47
	<i>Spororobolomyces alborubescens</i>	CBS 482	SEQ ID NO:48
	<i>Rhodotorula glutinis</i> var. <i>glutinis</i>	CBS 324	SEQ ID NO:49
40	<i>Rhodotorula glutinis</i> var. <i>glutinis</i>	CBS 4476	SEQ ID NO:50
	<i>Trichosporon behrend</i>	CBS 5581	SEQ ID NO:51
	<i>Geotrichum histeridarum</i>	CBS 9892	SEQ ID NO:52
45	<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	CBS 8411	SEQ ID NO:53
	<i>Cryptococcus curvatus</i>	CBS 8126	SEQ ID NO:53
	<i>Trichosporon domesticum</i>	CBS 8111	SEQ ID NO:54
	<i>Rhodotorula toruloides</i>	CBS 8761	SEQ ID NO:55
50	<i>Rhodotorula terpendoidalis</i>	CBS 8445	SEQ ID NO:56
	<i>Yarrowia lipolytica</i>	CBS 10144	SEQ ID NO:57
	<i>Rhodotorula glutinis</i> var. <i>glutinis</i>	CBS 5805	SEQ ID NO:58
55	<i>Yarrowia lipolytica</i>	CBS 10143	SEQ ID NO:59
	<i>Lipomyces tetrasporus</i>	CBS 5607	SEQ ID NO:60
	<i>Yarrowia lipolytica</i>	CBS 5589	SEQ ID NO:61
60	<i>Lipomyces tetrasporus</i>	CBS 8724	SEQ ID NO:62
	<i>Rhodospidium sphaerocarpum</i>	CBS 2371	SEQ ID NO:63
	<i>Trichosporon brassicae</i>	CBS 6382	SEQ ID NO:64
	<i>Cryptococcus curvatus</i>	CBS 2755	SEQ ID NO:65
65			

(Continuado)

	Lipomyces tetrasporus	CBS 7656	SEQ ID NO:65
5	Lipomyces starkeyi	CBS 7786	SEQ ID NO:66
	Yarrowia lipolytica	CBS 6012	SEQ ID NO:67
	Trichosporon loubieri var. loubieri	CBS 8265	SEQ ID NO:68
10	Geotrichum vulgare	CBS 10073	SEQ ID NO:69
	Rhodosporidium toruloides	CBS 14	SEQ ID NO:70
	Rhodotorula glutinis var. glutinis	CBS 6020	SEQ ID NO:71
15	Lipomyces orientalis	CBS 10300	SEQ ID NO:71
	Rhodotorula aurantiaca	CBS 317	SEQ ID NO:72
	Torulaspora delbrueckii	CBS 2924	SEQ ID NO:73

20

**EJEMPLO 7: Cultivo de Rhodococcus opacus para obtener un contenido elevado de aceite**

25 **[0362]** Se generó un cultivo de siembra de *Rhodococcus opacus* PD630 (DSM 44193, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) utilizando 2 mL de un estándar conservado criológicamente inoculado en 50 mL de medio MSM con un 4% de sacarosa (remítase a Schlegel et al., (1961) Arch Mikrobiol 38, 209-22) en un matraz deflectado de 250 mL. El cultivo de siembra se cultivó a 30 °C con agitación de 200 rpm hasta que alcanzó una densidad óptica de 1.16 a 600 nm. Se utilizaron 100 mL del cultivo del matraz de siembra para inocular cultivos con el fin de producir lípidos en dos condiciones diferentes de nitrógeno: NH<sub>4</sub>Cl 10 mM y NH<sub>4</sub>Cl 18.7 mM (cada uno por duplicado). Los cultivos en crecimiento se cultivaron a 30 °C con agitación de 200 rpm durante 6 días. Las células cultivadas utilizando NH<sub>4</sub>Cl 10 mM alcanzaron un contenido lipídico máximo de un 57.2% (promedio) en PSC después de 6 días de cultivo. Las células cultivadas utilizando NH<sub>4</sub>Cl 18.7 mM alcanzaron un contenido lipídico máximo de un 51.8% (promedio) en PSC después de 5 días de cultivo.

35 **[0363]** Una muestra de la biomasa de *Rhodococcus opacus* se sometió a transesterificación directa y se analizó mediante GC/FID para determinar el perfil de ácidos grasos. Los resultados fueron los siguientes: C14:0 (2.33); C15:0 (9.08); C16:0 (24.56); C16:1 (11.07); C17:0 (10.50); especies C17 equivalentes con 2 dobles enlaces (E2DE) (19.90); C18:0 (2.49); C18:1 (17.41); C18:2 (0.05); C19:0 (0.75) y especies C19 E2DE (1.87).

40

**EJEMPLO 8: Extracción de aceite a partir de microorganismos****A. Extracción de aceite a partir de microalgas utilizando una prensa de tornillo y un adyuvante de prensado**

45 **[0364]** Se secó biomasa de microalgas que contenía un 38% de aceite en PSC utilizando una secadora de tambor, lo cual dio como resultado un contenido de humedad resultante de un 5-5.5%. La biomasa se introdujo en una prensa francesa L250. Se introdujeron 30.4 kg (67 lb) de biomasa en la prensa y no se obtuvo nada de aceite. Se introdujo en la prensa la misma biomasa microbiana seca combinada con varios porcentajes de pasto varilla como adyuvante de prensado. La combinación de biomasa microbiana seca y un 20% p/p de pasto varilla proporcionó el mejor porcentaje global de recuperación de aceite. A continuación, la masa prensada se sometió a una extracción con hexano y el rendimiento final para el uso de un 20% de pasto varilla fue de un 61.6% del aceite disponible total (calculado en peso). La biomasa con más de un 50% de aceite en peso seco de las células no requirió el uso de un adyuvante de prensado, tal como el pasto varilla, para extraer el aceite. Otros métodos para extraer aceite de microalgas utilizando una prensa de tornillo se describen en la Solicitud de PCT N.º PCT/US2010/31108, incorporada a la presente por referencia.

55

**B. Extracción de aceite a partir de levadura oleaginosa utilizando una prensa de tornillo**

60 **[0365]** Se obtuvo una cepa de levadura de *Rhodotorula glutinis* (DSMZ-DSM 70398) de Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares, Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig, Alemania). Las células conservadas criológicamente se descongelaron, se añadieron a 50 mL de medio YPD (descrito anteriormente) con 1x solución de vitaminas DAS (1000x: 9 g/L de tricina; 0.67 g/L de tiamina-HCl; 0.01 g/L de d-biotina; 0.008 de cianocobalamina; 0.02 de pantotenato de calcio; y 0.04 g/L de ácido p-aminobenzoico) y se cultivaron a 30 °C con agitación de 200 rpm durante 18-24 horas hasta que la lectura de la DO fue superior a una DO de 5 (A600). A continuación, el cultivo se transfirió a fermentadores de 7 L y el medio se cambió por YP1 (8.5 g/L de base de nitrógeno para levaduras Difco sin aminoácidos ni sulfato de amonio, 3 g/L de

65

sulfato de amonio, 4 g/L de extracto de levadura) con 1x solución de vitaminas DAS. Se tomaron muestras de los cultivos dos veces al día y se analizaron para determinar la DO (A600), el peso seco de las células (PSC) y la concentración de lípidos. Cuando los cultivos llegaron a un PSC de 50 g/L, estos se recolectaron. Basándose en el peso seco de las células, la biomasa de levadura contenía aproximadamente un 50% de aceite. Dos muestras de la biomasa de levadura se sometieron a transesterificación directa y se analizaron mediante GC/FID para determinar el perfil de ácidos grasos. Los resultados se expresan en porcentaje de área y se muestran en la Tabla 12 a continuación.

Tabla 22. Perfil de ácidos grasos de las muestras de biomasa de levadura transesterificadas

	C10:0	C12:0	C14:0	C15:0	C16:0	C16:1	C17:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3α	≥C:20
Muestra 1	0.03	0.21	3.36	0.25	33.26	0.76	0.20	6.88	42.68	9.28	1.33	1.1
Muestra 2	0.02	0.10	2.18	0.12	29.94	0.49	0.16	8.17	48.12	7.88	0.84	1.45

[0366] El caldo de levadura obtenido se secó utilizando tres métodos diferentes para establecer una comparación: (1) secado en una bandeja en un horno de aire forzado a 75 °C durante toda la noche; (2) secado en una secadora de tambor sin concentración; y (3) se concentró el caldo de levadura hasta un 22% de sólidos y a continuación la suspensión se secó en una secadora de tambor. El material de cada una de las tres condiciones de secado diferentes se acondicionó por calentamiento y se introdujo en una prensa de tornillo para la extracción del aceite. La temperatura de la prensa era de 150 °F y la biomasa de levadura seca acondicionada se mantuvo a aproximadamente 190 °F hasta que estuvo a punto para ser introducida en la prensa.

[0367] El contenido de humedad de la levadura secada en bandeja fue de un 1.45% y a continuación la levadura seca se acondicionó en un horno a 90 °C durante 10 minutos. El contenido de humedad después del acondicionamiento fue de un 0.9%. A continuación, el material secado en bandeja y acondicionado se introdujo en una prensa de tornillo Taby de laboratorio (prensa de aceite Taby Pressen de tipo 70 con un motor de 2.2 Hp y un diámetro de tornillo de 70 mm) para extraer el aceite. Este material no proporcionó ninguna cantidad significativa de aceite y se observó bastante sedimentación en la prensa.

[0368] El contenido de humedad del caldo de levadura secado en un tambor sin concentración fue de un 5.4% y a continuación la levadura secada en el tambor se acondicionó en un horno a 90 °C durante 20 minutos. El contenido de humedad después del acondicionamiento fue de un 1.4%. A continuación, la levadura secada en el tambor y acondicionada se introdujo en una prensa de tornillo Taby de laboratorio para la extracción del aceite. Este material presentó una buena producción de aceite, con sedimentación mínima.

[0369] El contenido de humedad del caldo de levadura concentrado y secado en un tambor fue de un 2.1% y a continuación la levadura concentrada y secada en el tambor se acondicionó en un horno a 90 °C durante 20 minutos. El contenido de humedad después del acondicionamiento fue de un 1.0%. A continuación, la levadura concentrada, secada en el tambor y acondicionada se introdujo en una prensa de tornillo Taby de laboratorio para la extracción del aceite. Este material presentó una buena producción de aceite, con sedimentación mínima.

### C. Secado y extracción de aceite a partir de bacterias oleaginosas

[0370] La cepa de bacterias oleaginosas PD630 de *Rhodococcus opacus* (DSMZ-DSM 44193) se cultivó de acuerdo con los métodos proporcionados en la presente para producir biomasa de bacterias oleaginosas con aproximadamente un 32% de contenido lipídico en PDC.

[0371] El caldo de *Rhodococcus opacus* obtenido se concentró utilizando centrifugación y a continuación se lavó con agua desionizada y se volvió a suspender en 1.8 L de agua desionizada. Se añadieron 50 gramos de celulosa purificada (PB20-Pre-co-Floc, EP Minerals, Nevada) a la biomasa resuspendida y se ajustó el contenido de sólidos totales con agua desionizada hasta un 20%. A continuación, la biomasa de *Rhodococcus* se secó en una secadora de tambor y el contenido de humedad de *Rhodococcus* después del secado en el tambor fue de aproximadamente un 3%.

5 [0372] A continuación, el material secado en el tambor se acondicionó por calentamiento en un horno a 130 °C durante 30 minutos con un contenido de humedad resultante de aproximadamente un 1.2%. A continuación, la biomasa acondicionada por calentamiento se introdujo en una prensa Taby de laboratorio (prensa de tornillo) para la extracción del aceite. La temperatura de la prensa era de 209°F y la biomasa de levadura seca acondicionada se mantuvo a aproximadamente 240°F hasta que estuvo a punto para ser introducida en la prensa. La obtención de aceite vino acompañada de bastante sedimentación.

#### 10 **EJEMPLO 9: Procesamiento del aceite extraído; reducción del punto de fluidez**

##### **Resumen**

15 [0373] El aceite microbiano preparado de acuerdo con los ejemplos anteriores se puede procesar de acuerdo con los métodos descritos en la presente con el fin de mejorar sus propiedades para utilizarlo en alimentos y lubricantes. Además de los microbios descritos en los ejemplos anteriores, la microalga *Chlorella protothecoides* es una productora excelente de aceite microbiano. Para consultar métodos de cultivo de cepas y especies de *Chlorella* con el fin de obtener un contenido elevado de aceite y para extraer aceite de estas, remítase a las Publicaciones de PCT N.os 2008/151149, 2010/120939 y 2010/138.620, incorporadas a la presente por referencia.

20 [0374] Se redujo el punto de fluidez en el aceite obtenido de *Chlorella protothecoides* reduciendo la proporción relativa de la fracción saturada, constituida principalmente por triglicéridos esteáricos y palmíticos conocidos en la técnica como la fracción estearínica. Esto se consiguió fraccionando el aceite para reducir la concentración de triglicéridos saturados del aceite. Esto se puede llevar a cabo por cristalización o fraccionamiento en seco, de forma similar al proceso de winterización conocido en la industria del aceite vegetal. En primer lugar, el aceite de algas se refinó, decoloró y desodorizó mediante los métodos descritos anteriormente (también se podrían utilizar métodos similares a los utilizados en la industria del aceite vegetal) para producir "aceite RBD".

25 [0375] La temperatura del aceite RBD se redujo de una forma controlada hasta que se formaron núcleos cristalinos. A continuación, el aceite se mantuvo a esta temperatura de cristalización durante varias horas para fomentar el crecimiento de los cristales. Los cristales se retiraron posteriormente mediante filtración para obtener dos fracciones: una fase sólida que contenía parte o gran parte de la fracción estearínica y una fase líquida que contenía principalmente la fracción oleínica. La fase líquida se sometió nuevamente a fraccionamiento hasta una temperatura de cristalización menor para conseguir eliminar más estearina. La fracción líquida purificada resultante, equivalente a una superoleína, nombre con el que se le conoce habitualmente en la industria del aceite vegetal, tiene unas propiedades térmicas mejores que las del aceite de algas original.

##### **Materiales y métodos**

##### **Materiales**

40 [0376] El aceite algáceo (refinado, decolorado y desodorizado) fue producido por Solazyme, Inc (South San Francisco, CA). La Tabla 23 resume las propiedades del aceite utilizado en el estudio.

45

50

55

60

65

Tabla 23. Propiedades del aceite algáceo utilizado en el estudio.

	Análisis	Valor
5	Humedad [%]	0.01
	Ácido graso libre [% como oleico]	0.03
	Índice de yodo	83.5
10	Perfil de ácidos grasos	
	8:0	0.00
	10:0	0.00
	12:0	0.03
	14:0	1.12
15	16:0	14.02
	18:0	3.24
	18:1	67.73
	18:2	11.18
	18:3	0.62
20	20:0	0.32
	20:1	0.20

25 **[0377]** El depresor del punto de fluidez basado en un copolímero de polialquilmetacrilato (PPD) VISCOPLEX® 10-310 que contenía ~50% (p/p) de portador de aceite de ricino y VISCOPLEX® 1-133 que contenía portador de aceite mineral refinado fueron suministrados por RohmMax Evonik (Horsham, PA).

### 30 Métodos

#### A. Fraccionamiento en seco: cristalización

35 **[0378]** Se introdujeron aproximadamente 2.5 kg de aceite de algas en un recipiente de 3 L con camisa conectado a un baño con agua circulante de temperatura controlada, que se utilizó para calentar y enfriar el producto (Crystallization & Degumming, Charleroi, Bélgica). El reactor estaba provisto de un agitador de velocidad variable. El enfriamiento se controló monitorizando las temperaturas del aceite y del agua que circulaba entre las paredes dobles del reactor. Se tomó una muestra del reactor con una varilla constituida por una microgota de la suspensión de cristales y se depositó sobre un portaobjetos para monitorizar la formación de cristales al final del enfriamiento. La muestra se analizó inmediatamente con un microscopio antes de que los cristales tuvieran la oportunidad de fundirse.

40 **[0379]** En la Fig. 1 se muestra el patrón de enfriamiento global. La velocidad del agitador era de 30 rpm durante la primera fase y de 15 rpm al final del programa de enfriamiento.

#### 45 B. Fraccionamiento en seco: filtración

**[0380]** Al final de la cristalización, la suspensión de cristales se filtró utilizando un filtro prensa de membrana de 1 L (Choquenot SA, Chauny, Francia). La filtración se llevó a cabo en una cámara que se mantuvo a la temperatura de enfriamiento final. El tiempo de filtración fue de 20 min y la presión suministrada al filtro fue de 4 barg.

50 **[0381]** Al final del paso de separación, se pesaron las fracciones estearínica y oleínica, se calcularon los rendimientos de las fracciones y se guardó una muestra de cada fracción para realizar más análisis. La superoleína de algas #1 se produjo procesando la oleína del primer fraccionamiento y repitiendo los procesos de cristalización y filtración descritos anteriormente siguiendo el programa de enfriamiento mostrado en la Fig. 2. Las superoleínas de algas #2 y #3 se produjeron fraccionando en primer lugar el aceite desodorizado y repitiendo los procesos de cristalización y filtración utilizando un programa de enfriamiento similar al que se muestra en la Fig. 2.

#### C. Punto de Vertido (PP)

60 **[0382]** Se pesaron los depresores del punto de fluidez (0.5 y 1.0 gramos) en matraces. Se añadieron el aceite de algas y las fracciones oleínica y superoleínica (100 gramos) a cada matraz. Las mezclas se mezclaron completamente. Se evaluó cada muestra de acuerdo con el método estándar D 97 de la ASTM (Sociedad Americana para Ensayos y Materiales). La muestra se vertió en un tubo de ensayo y se calentó sin agitación en un baño de agua, en el que se fijó la temperatura a 48.0 °C. La muestra se calentó hasta que alcanzó 46.0 °C. Después de calentarla, la muestra se enfrió hasta 25.0 °C (en un baño de agua). A continuación, la muestra se introdujo en un cilindro metálico en un baño de metanol. La temperatura del baño de metanol se fijó entre -1.0 °C y -2.0 °C hasta que la temperatura de la muestra alcanzó 10.0 °C. A continuación, la temperatura del baño de metanol se redujo hasta -17.0 °C hasta que la temperatura

de la muestra alcanzó -7.0 °C. Cuando la temperatura de la muestra estaba aproximadamente 11.0 °C por encima del punto de fluidez esperado, la muestra se retiró del baño de metanol a cada reducción de 3.0 °C, con el fin de comprobar su capacidad para fluir. El punto de fluidez de la muestra se determinó como la temperatura a la cual la muestra en el tubo de ensayo dejó de fluir cuando se retiró del baño de metanol. Para dar el valor real del punto de fluidez de la muestra, se añadieron 3.0 °C a la temperatura registrada.

**[0383]** Las propiedades del aceite producido en cada paso se podrían mejorar adicionalmente de acuerdo con los métodos descritos en la presente añadiendo un depresor químico del punto de fluidez que redujera aún más el punto de fluidez. Los depresores del punto de fluidez utilizados en este ejemplo fueron VISCOPLEX® 10-310 y 1-133, ambos producidos por Evonik, pero se podrían obtener resultados similares utilizando cualquier depresor del punto de fluidez estándar. Los resultados se muestran en la Tabla 24 a continuación y en la Fig. 3.

Tabla 24. Efecto del fraccionamiento y los depresores del punto de fluidez(1) sobre el aceite de algas (oC)

MUESTRA	Sin aditivo 0	VISCOPLEX® 10-310 (2) (%) p:p)		VISCOPLEX® 1-133 (3) (%) p:p)	
		0.5	1	0.5	1
		Aceite refinado, decolorado y desodorizado	-8	-17	-20
Oleína #1 (líquido del 1.er fraccionamiento)	-11	-19	-20	-16	-17
Superoleína #1 (líquido del fraccionamiento de la oleína = 2.o pase)	-20	-26	NE	NE	NE
Superoleína #2 (líquido del fraccionamiento de la oleína = 2.o pase)	-14	-20	-23	NE	NE
Superoleína #3 (líquido del fraccionamiento de la oleína = 2.o pase)	-20	-23	-29	NE	NE

- (1) Punto de fluidez según D97 de la ASTM
  - (2) Mezcla 50:50 de poli(alquil)acrilato y aceite de ricino. Clasificado como biodegradable.
  - (3) Mezcla de poli(alquil)acrilato y aceite mineral refinado.
- NE = no evaluado.

**EJEMPLO 10: Puntos de fluidez de aceite producido a partir de microalgas modificadas**

**[0384]** Se transformó *Protheca moriformis* (UTEX 1435) con uno de los siguientes constructos plasmídicos de la Tabla 25 utilizando los métodos del Ejemplo 2.

Tabla 25. Constructos plasmídicos utilizados para transformar *Protheca moriformis* (UTEX 1435).

Constructo plasmídico	Elementos de la secuencia
1	6SA-CrbTub_yInv_nr::CrbTub_hpFADc_nr-6SB
2	6SA-bTub-yInv-nr-6SB
3	FADc5'_btub-yInv-nr::amt03-S106SAD-CtOTE-nr-FADc3'
4	SAD2B5'-CrbTub_yInv_ef1::amt03_CWTE2_nr-SAD2B3'

**[0385]** Cada uno de los constructos contenía una región para la integración en el genoma nuclear y una región codificante de la sacarosa-invertasa de *S. cerevisiae* suc2 bajo el control del promotor de  $\beta$ -tubulina/5'UTR de *C. reinhardtii* y 3' UTR de la nitrato-reductasa de *Chlorella vulgaris*. Este casete de expresión de *S. cerevisiae* suc2 se enumera como la SEQ ID NO:78 y actuó como un marcador de selección. A continuación se muestran las secuencias relevantes para las regiones de modificación dirigida utilizadas para la integración en el genoma nuclear.

Descripción	SEQ ID NO:
secuencia 5' de la secuencia de modificación dirigida genómica para la región 6S	SEQ ID NO:100
secuencia 3' de la secuencia de modificación dirigida genómica para la región 6S	SEQ ID NO:101
secuencia 5' para la integración genómica en el locus FADc	SEQ ID NO:102
secuencia 3' para la integración genómica en el locus FADc	SEQ ID NO:103
secuencia 5' para la integración genómica en el locus SAD2B	SEQ ID NO:36
secuencia 3' para la integración genómica en el locus SAD2B	SEQ ID NO:37

**[0386]** Además del marcador seleccionable de sacarosa, tres de los cuatro constructos también contenían secuencias adicionales diferentes para la expresión de proteínas o ARN. La Tabla 26 enumera casetes de ARN horquillado o enzimas importantes codificados por la secuencia de ADN en el constructo indicado. Todas las regiones codificantes de proteínas tenían los codones optimizados para reflejar los codones preferenciales inherentes en genes nucleares de *Protheca moriformis* UTEX 1435 (remítase a la Tabla 2). En el Listado de Secuencias se enumeran tanto las secuencias de aminoácidos como las secuencias de ADNc para el constructo utilizado.

Tabla 26. Constructos plasmídicos para la expresión de tioesterasas o ARN horquillado utilizados para transformar *Protheca moriformis* (UTEX 1435).

Constructo plasmídico	Proteína o ARN horquillado	SEQ ID NO:
1	horquilla para FADc	SEQ ID NO:92
3	ACP-tioesterasa de <i>Carthamus tinctorius</i> (N.o de acceso de GenBank: AAA33019.1)	SEQ ID NO:104
4	tioesterasa FatB2 de <i>Cuphea wrightii</i> (N.o de acceso de GenBank U56104)	SEQ ID NO:105

**[0387]** Las regiones codificantes tanto de la ACP-tioesterasa de *Carthamus tinctorius* (CtOTE en el Constructo 3) como de la tioesterasa FatB2 de *Cuphea wrightii* (CwTE2 en el Constructo 4) estaban bajo el control del promotor Amt03/5'UTR de *Protheca moriformis* (SEQ ID NO:84) y 3'UTR de la nitrato-reductasa de *C. vulgaris* (SEQ ID NO:85). El péptido de tránsito nativo de la ACP-tioesterasa de *C. tinctorius* se reemplazó por el péptido de tránsito de la esteroil-ACP-desaturasa de *Chlorella protothecoides* (SEQ ID NO:86). Las secuencias de ADNc con codones optimizados y las secuencias de aminoácidos (con el péptido de tránsito reemplazado) de la ACP-tioesterasa de *C. tinctorius* se enumeran en el Listado de Secuencias como SEQ ID NO:106 y SEQ ID NO:104, respectivamente. Las secuencias de ADNc con codones optimizados y las secuencias de aminoácidos de la tioesterasa FatB2 de *Cuphea*

wrightii se enumeran en el Listado de Secuencias como SEQ ID NO:107 y SEQ ID NO:105, respectivamente. El Constructo 1 que contiene el ARN horquillado para FADc se describe en el Ejemplo 4.

[0388] Cada constructo se transformó en un entorno genético de *Prototheca moriformis*. Los clones positivos se evaluaron en placas con sacarosa como única fuente de carbono. Se seleccionó un subconjunto de los clones positivos y se cultivó en condiciones de producción de lípidos. Se cultivó UTEX 1435 de tipo natural utilizando glucosa, mientras que las demás líneas transgénicas se cultivaron en sacarosa. Para cada constructo, se cultivaron los transformantes y se aisló el aceite. Los aceites aislados se analizaron para establecer los perfiles de ácidos grasos y se determinaron los puntos de fluidez según se describe en la presente. Los puntos de fluidez se determinaron utilizando el método de prueba estándar D97 de ASTM para la evaluación de puntos de fluidez. Los perfiles de ácidos grasos y los puntos de fluidez de los aceites para cepas transgénicas se muestran en la Tabla 27 a continuación. La Tabla 27 muestra los datos para la manipulación eficaz de los puntos de fluidez de los aceites producidos por microalgas modificadas genéticamente. El punto de fluidez del aceite transformado con el Constructo 3 se redujo desde -10.5 °C hasta 19.5 °C.

Tabla 27. Perfiles de ácidos grasos y temperaturas de los puntos de fluidez para células de *Prototheca moriformis* que contienen diferentes constructos.

	Tipo natural	Constructo 1	Constructo 2	Constructo 3	Constructo 4
C6:0	0	0	0	0	0
C8:0	0	0	0	0	0
C10:0	0	0	0.01	0.03	0.01
C12:0	0.03	0.02	0.03	0.11	0.03
C14:0	1.12	0.68	0.75	0.90	1.08
C16:0	14.02	15.55	13.26	7.75	26.09
C18:0	3.24	3.79	5.26	1.78	12.37
C18:1	67.76	76.84	71.75	86.40	53.42
C18:2	11.49	0.91	6.44	0.12	4.38
C18:3 $\alpha$	0.62	0.09	0.07	0.02	0.2
Punto de fluidez	-10.5 °C	-7.6 °C	-7.6 °C	-19.5 °C	10.4 °C

#### EJEMPLO 11: Microalgas modificadas con perfiles de ácidos grasos alterados

[0389] Según se ha descrito anteriormente, la integración de genes heterólogos para desactivar o reducir la expresión de enzimas de la vía lipídica endógenas específicas en especies de *Prototheca* puede alterar los perfiles de ácidos grasos. Debido a que las acilo graso-ACP-tioesterasas catalizan la escisión de un ácido graso a partir de una proteína portadora de acilo durante la síntesis de lípidos, estas son enzimas importantes de la vía lipídica a la hora de establecer el perfil lipídico del organismo huésped. Se crearon constructos plasmídicos para evaluar si el perfil lipídico de una célula huésped puede verse afectado como resultado de una desactivación o reducción de la expresión de un gen endógeno de acilo graso-ACP-tioesterasa, FATA1.

#### A. Alteración de los perfiles de ácidos grasos mediante la desactivación de un gen endógeno de tioesterasa de *Prototheca moriformis*

[00390] Un derivado mutado de forma clásica de *Prototheca moriformis* UTEX 1435, S1920, se transformó con uno de los siguientes constructos plasmídicos de la Tabla 28 utilizando los métodos del Ejemplo 2. Cada constructo contenía una región para la integración en el genoma nuclear para interrumpir el gen endógeno FATA1 y una región codificante de la sacarosa-invertasa de *S. cerevisiae* suc2 bajo el control del promotor de  $\beta$ -tubulina/5'UTR de *C. reinhardtii* y 3' UTR de la nitrato-reductasa de *Chlorella vulgaris*. Este casete de expresión de *S. cerevisiae* suc2 se enumera como la SEQ ID NO:78 y actuó como un marcador de selección. Todas las regiones codificantes de proteínas tenían los codones optimizados para reflejar los codones preferenciales inherentes en genes nucleares de *Prototheca moriformis* UTEX 1435 (remítase a la Tabla 2). A continuación se muestran las secuencias relevantes para las regiones de modificación dirigida para el gen FATA1 que se utilizaron para la integración en el genoma nuclear.

Descripción	SEQ ID NO:
secuencia 5' para la integración en el locus FATA1	SEQ ID NO:108
secuencia 3' para la integración en el locus FATA1	SEQ ID NO:109

Tabla 28. Constructos plasmídicos utilizados para transformar S1920 de *Protheca moriformis* (UTEX 1435).

Constructo plasmídico	Elementos de la secuencia
pSZ1883	FATA1-CrbTub_yInv_nr-FATA1
pSZ1925	FATA1-CrbTub_yInv_nr::amt03_CwTE2_nr-FATA1

[0391] Los sitios de restricción relevantes en el constructo FATA1-CrbTub\_yInv\_nr-FATA1 se indican en minúscula en la secuencia a continuación, en negrita y subrayados y son 5'-3' BspQ 1, Kpn I, Asc I, Mfe I, Sac I, BspQ I, respectivamente. Los sitios de BspQI delimitan los extremos 5' y 3' del ADN transformante. Las secuencias en negrita y minúscula representan ADN genómico de S1920 que permite la integración dirigida en el locus FATA1 mediante recombinación homóloga. Siguiendo en la dirección de 5' a 3', el promotor de β-tubulina de *C. reinhardtii* que dirige la expresión del gen de sacarosa-invertasa de la levadura (que confiere la capacidad a S1920 para metabolizar sacarosa) se indica con el texto encuadrado. El codón de iniciación ATG y el codón de terminación TGA para la invertasa se indican en mayúscula, negrita y cursiva, mientras que la región codificante se indica en minúscula y cursiva. La 3' UTR de la nitrato-reductasa de *Chlorella vulgaris* se indica con texto en minúscula y subrayado y viene seguida por la región genómica FATA1 de S190, que se indica con texto en negrita y minúscula

**gctcttcggagtcactgtgccactgagttcgactggtagctgaatggagtcgctgctccactaa**  
**acgaattgtcagcaccgccagccggccgaggaccgagtcatagcgagggtagtagcgcgccat**  
**ggcaccgaccagcctgcttgccagtactggcgtctcttccgcttctctgtggtcctctgcgcgc**  
**tccagcgcgtgcgcttttccggtggatcatgcggtccgtggcgcaccgcagcggccgctgccc**  
**tgcagcgcgcgtgcttccgaacagtggcggtcagggccgcaccgcggttagccgtccgtccgga**  
**accgcaccaagagttttgggagcagcttgagccctgcaagatggcggaggacaagcgcattctt**  
**ctggaggagcaccgggtgctggtggaggtccggggctgaccggccgtcgcattcaacgtaataatc**  
**gcatgatgatcagaggacacgaagtcttggtggcgggtggccagaaacactgtccattgcaaggg**  
**catagggatgcgttccttcacctctcatttctcatttctgaatccctccctgctcactctttct**  
**cctcctccttcccggttcacgcagcattcgggggtacc**ctttcttgcgctatgacacttccagcaa  
aaggtagggcgggctgcgagacggcttcccggcgtgcatgcaaacaccgatgatgcttcgaccc  
cccgaagctccttcggggctgcatgggctccgatgccgctccagggcgagcgcgtgtttaaat  
agccaggcccccgattgcaaagacattatagcgagctaccaagccatattcaaacacctagat  
cactaccacttctacacaggccactcgagcttgtgatcgcactccgctaagggggcgctcttc  
ctcttcgtttcagtcacaacccgcaaac**ggcgcgccATG**ctgctgcaggccttctctgttctgc  
tggccggcttcgcccgaagatcagcgcctccatgacgaacgagacgtccgaccgccccctggt  
gcacttcaccccccaacaagggctggatgaacgacccccaacggcctgtggtacgacgagaaggac  
gccaagtggcacctgtacttccagtacaacccgaacgacaccgtctgggggacgccttggtct  
ggggccacgccacgtccgacgacctgaccaactgggaggaccagccatcgccatcgccccgaa  
gcgcaacgactccggcgccttctccggctccatggtggtggactacaacaacacctccggcttc  
ttcaacgacaccatcgaccgcccagcgcgtgctggtggccatctggacctacaacccccggagt

ccgaggagcagtagatctcctacagcctggacggcggctacaccttcaccgagtaccagaagaa  
 ccccgtgctggccgccaactccacccagttccgcgacccgaaggtcttctggtacgagocctcc  
 cagaagtggatcatgaccgcggccaagtcccaggactacaagatcgagatctactcctccgacg  
 acctgaagtccctggaagctggagtcgcggttcgccaacgagggcttctcggctaccagtacga  
 5 gtgccccggcctgatcgaggtccccaccgagcaggaccccagcaagtcctactgggtgatgttc  
 atctccatcaacccccggcgcgccggcggcggctccttcaaccagtagtctcgtcggcagcttca  
 acggcacccacttcgagggccttcgacaaccagtcgccggtggaggacttcggcaaggactacta  
 cgccctgcagaccttcttcaacaccgacccgacctacgggagcgcctggggcatcgcgtggggc  
 tccaactgggagtagtccgccttcgtgcccaccaacccctggcgtcctccatgtccctcgtgc  
 10 gcaagttctccctcaacaccgagtaccaggccaacccggagacggagctgatcaacctgaaggc  
 cgagccgatcctgaacatcagcaacgccggccctggagccggttcgccaccaacaccacgttg  
 acgaaggccaacagctacaacgctgacctgtccaacagcaccggcaccctggagttcgagctgg  
 tgtacgccgtcaacaccaccagacgatctccaagtcggttcgcggacctctccctctggtt  
 caagggcctggaggaccccgaggagtacctccgcatgggcttcgaggtgtccgcgtcctccttc  
 15 ttcttgaccgcgggaacagcaaggtgaagttcgtgaaggagaaccctacttcaccaaccgca  
 tgagcgtgaacaaccagcccttcaagagcggagaacgacctgtcctactacaaggtgtacggctt  
 gctggaccagaacatcctggagctgtacttcaacgacggcgacgtcgtgtccaccaacacctac  
 ttcatgaccaccgggaacgccctgggctccgtgaacatgacgacggggggtggacaacctgttct  
 acatcgacaagttccaggtgcgcgaggtcaag**TGAcaattggcagcagcagctcggatagtatc**  
 20 **gacacactctggacgctggctcgtgtgatggactggtgccgccacacttgctgccttgacctgtg**  
**aatatccctgccgcttttatcaaacagcctcagtggtggttgatcttggtgtacgcgcttttgc**  
**gagttgctagctgcttggtgctatttgcaataaccaccccagcatcccttccctcgtttcata**  
**tcgcttgcatcccaaccgcaacttatctacgctgtcctgctatccctcagcgtgctcctgctc**  
**ctgctcactgcccctcgcacagccttggtttgggctccgcctgtattctcctggtagtgaacc**  
 25 **tgtaaaccagcactgcaatgctgatgcacgggaagtagtgggatgggaacacaaatggaggatc**  
**gtagagctc**actagtagtgcgatttcgaagacaggggtgggtggctggatggggaaacgctggctgc  
**gggattcgatcctgctgcttatatcctccctggaagcacaccacgactctgaagaagaaaacg**  
**tgcacacacacaaccaaccggccgaatatttgcttcttatcccgggtccaagagagactgcg**  
**atgccccctcaatcagcatcctcctccctgccgcttcaatcttccctgcttgccctgcccgc**  
 30 **gggtgcgcgctctgcccgccagtcagtcactcctgcacaggcccccttggtgcgcagtgctcctgt**  
**accctttaccgctccttccattctgcgaggccccctattgaatgtattcgttgccctgtgtggcc**  
**aagcgggctgctgggcgcgcgccgctcgggcagtgctcggcgactttggcgggaagccgattggt**

**cttctgtaagccacgcgcttgctgctttgggaagagaaggggggggtactgaatggatgagga  
ggagaaggaggggtattggtattatctgagttgggtgaagagc** (SEQ ID NO:111)

5 **[0392]** Para introducir el gen de la ACP-tioesterasa 2 de *Cuphea wrightii* (CwFatB2) (N.o de acceso: U56104) en S1920 en el locus FATA1, se generó un constructo para expresar la región codificante de la proteína del gen CwFatB2 bajo el control del promotor Amt03/5'UTR de *Prototheca moriformis* (SEQ ID NO:84) y 3'UTR de la nitrato-reductasa de *C. vulgaris* (SEQ ID NO:85). El constructo que se ha expresado en S1920 se puede escribir como FATA1-CrbTub\_yInv\_nr::amt03\_CwTE2\_nr-FATA1.

10 **[0393]** Los sitios de restricción relevantes en el constructo FATA1-CrbTub\_yInv\_nr::amt03\_CwTE2\_nr-FATA1 se indican en minúscula, en negrita y subrayados en la secuencia a continuación y son 5'-3' BspQ 1, Kpn I, Asc I, Mfe I, BamH I, EcoR I, Spe I, Asc I, Pac I, Sac I, BspQ I, respectivamente. Los sitios de BspQI delimitan los extremos 5' y 3' del ADN transformante. Las secuencias en negrita y minúscula representan ADN genómico de S1920 que permite la integración dirigida en el locus FATA1 mediante recombinación homóloga. Siguiendo en la dirección de 5' a 3', el  
15 promotor de  $\beta$ -tubulina de *C. reinhardtii* que dirige la expresión del gen de sacarosa-invertasa de la levadura (que confiere la capacidad a S1920 para metabolizar sacarosa) se indica con el texto encuadrado. El codón de iniciación ATG y el codón de terminación TGA para la invertasa se indican en mayúscula, negrita y cursiva, mientras que la región codificante se indica en minúscula y cursiva. La 3' UTR de la nitrato-reductasa de *Chlorella vulgaris* se indica con texto en minúscula y subrayado, y viene seguida por un promotor amt03 endógeno de *Prototheca moriformis*, que  
20 se indica con texto en cursiva encuadrado. El codón de iniciación ATG y el codón de terminación TGA de la ACP-tioesterasa de *C. wrightii* se indican en mayúscula, negrita y cursiva, mientras que el resto de la región codificante de la ACP-tioesterasa se indica en negrita y cursiva. La 3' UTR de la nitrato-reductasa de *C. vulgaris* se indica de nuevo con texto en minúscula y subrayado y viene seguida por la región genómica FATA1 de S1920, que se indica con texto en negrita y minúscula. Las secuencias de ADNc con codones optimizados y las secuencias de aminoácidos de la  
25 tioesterasa FatB2 de *Cuphea wrightii* se enumeran en el Listado de Secuencias como SEQ ID NO:107 y SEQ ID NO:105, respectivamente.

**gctcttcggagtcactgtgccactgagttcgactggtagctgaatggagtcgctgctccactaa**  
**acgaattgtcagcaccgccagccggccgaggaccgagtcatagcgagggtagtagcgcgccat**  
30 **ggcaccgaccagcctgcttgccagtaactggcgtctcttccgcttctctgtggtcctctgcgcgcc**  
**tccagcgctgcgcttttccggtggatcatgcggtccgtggcgaccgcagcggccgctgccca**  
**tgcagcgccgctgcttccgaacagtgggcggtcagggccgcacccgcggtagccgtccgtccgga**  
**acccgccaagagttttgggagcagcttgagccctgcaagatggcggaggacaagcgcatcttc**  
**ctggaggagcaccggtgctgaggtccggggctgaccggccgtcgcattcaacgtaatcaatc**  
35 **gcatgatgatcagaggacacgaagtcttggtggcggtggccagaaacactgtccattgcaaggg**  
**catagggatgcggttccttcacctctcatttctcatttctgaatccctccctgctcactctttct**  
**cctcctccttccggttcacgcagcattcggggtacc****cttcttgcgctatgacacttccagcaa**  
**aaggtagggcgggctgcgagacggcttcccggcgctgcatgcaacaccgatgatgcttcgaccc**  
**ccgaagctccttcggggctgcatggggcgtccgatgccgctccagggcgagcgctgtttaa**at  
40 **agccaggccccgattgcaaagacattatagcgagctaccaaagccatattcaaacacctagat**  
**cactaccacttctacacaggccactcgagcttgtgatcgactccgctaagggggcgctcttc**  
**ctcttcgtttcagtcacaacccgaaac****ggcgcgccATG****ctgctgcaggccttctgttctctgc**  
**tggccggcttcgccgccaagatcagcgctccatgacgaacgagacgtccgaccgccccctggt**  
**gcacttcacccccaaagggctggatgaacgacccccaacggcctgtggtacgacgagaaggac**  
45 **gccaagtggcacctgtacttccagtaacaaccgaaacgacaccgtctgggggacgccttgttct**  
**ggggccacgccacgtccgacgacctgaccaactgggaggaccagcccatcgccatcgccccgaa**

gcgcaacgactccggcgcttctccggctccatggtggtggactacaacaacacctccggcttc  
 ttcaacgacaccatcgacccgcgcccagcgctgctggtggccatctggacctaacaaccccggagt  
 ccgaggagcagtagatctctctacagcctggacggcggctacaccttcaccgagtagcagaagaa  
 ccccgtgctggccgccaactccacccagttccgcgacccgaaggtcttctggtacgagccctcc  
 5 cagaagtggatcatgaccgcccgaagtcccaggactacaagatcgagatctactcctccgacg  
 acctgaagtccctggaagctggagctccgcgttcgccaacgagggcttccctcggctaccagtaga  
 gtgccccggcctgatcgaggtccccaccgagcaggaccccagcaagtcctactgggtgatgttc  
 atctccatcaacccccggcgccccggcggcggctccttcaaccagtagtctcgtcggcagcttca  
 acggcaccacttcgaggtcctcgacaaccagtcctccgctggtggacttcggcaaggactacta  
 10 cgccctgcagaccttcttcaacaccgacccgacctaaggagcgccttgggcatcgcgtgggccc  
 tccaactgggagtagtccgccttcgtgcccaccaacccctggcgtcctccatgtccctcgtgc  
 gcaagttctccctcaacaccgagtagcaggccaacccggagacggagctgatcaacctgaaggc  
 cgagccgatcctgaacatcagcaacgcccggccctggagccgggttcgccaccaacaccacgttg  
 acgaaggccaacagctacaacgtagcctgtccaacagcaccggcaccctggagttcgagctgg  
 15 tgtacgccgtcaacaccaccagacgatctccaagtcggtgcttcgcccagcctctccctctggtt  
 caagggcctggaggaccccagagtagtccctccgatgggcttcgaggtgtccgcgtcctccttc  
 ttctggaccgcccgaacagcaaggtgaagttcgtgaaggagaaccctacttcaccaaccgca  
 tgagcgtgaacaaccagcccttcaagagcgagaacgacctgtcctactacaaggtgtacggctt  
 gctggaccagaacatcctggagctgtacttcaacgacggcggcagctcgtgtccaccaacaccta  
 20 ttcatgaccaccgggaacgcccctgggctccgtgaacatgacgacgggggtggacaacctgttct  
 acatcgacaagttccaggtgcccagaggtcaag**TGAcaattggcagcagcagctcggatagtagt**  
gacacactctggacgctggctcgtgtgatggactggtgcccgcacacttgctgccttgacctgtg  
aatatccctgcccgttttatcaaacagcctcagtggtggttgatcttgtgtgtacgcgcttttgc  
gagttgctagctgcttgtgctatttgcaataaccaccccagcatcccctccctcgtttcata  
 25 tcgcttgcatoccaaccgcaacttatctacgctgtcctgctatccctcagcgtgctcctgctc  
ctgctcactgcccctcgcacagccttggtttgggctccgcctgtattctcctggtagctgcaacc  
tgtaaaccagcactgcaatgctgatgcacgggaagtagtgggatgggaacacaaatggag**ggatc**  
cgcgctctgaaacagagcgcgcagaggaacgctgaaggtctcgctctgctgcacctcagcgcg  
 gcataaccacaataaccacctgacgaatgcgcttgggtctctcgtccattagcgaagcgtccgg  
 30 ttcacacacgtgccacgttggcgaggtggcaggtgacaatgatcgggtggagctgatggtcgaaa  
 cgttcacagcctagggatagc**gaattcggccgacaggacgcgcgtcaaaggtgctggctcgtgta**  
 tgccctggccggcaggtcgttgctgctgctgggttagtgattccgcaaccctgatatttggcgtct  
 tattttggcgtggcaaacgctggcgcgccgagccgggcccggcggcggatgcggtgccccacggc

tgccggaatccaagggaggcaagagcgcccgggtcagttgaagggctttacgcgcaaggtacag  
 ccgctcctgcaaggctgctgtggtggaattggacgtgcaggctcctgctgaagttcctccaccgcc  
 tcaccagcggacaaagcaccgggtgtatcagggtccgtgtcatccactctaagagctcgactacg  
 acctactgatggccctagattcttcatcaaaaacgcctgagacacttgcccaggattgaaactc  
 5 cctgaagggaccaccaggggcccctgagttggttccttcccccgctggcgagctgccagccaggct  
 gtacctgtgatcgaggctggcgggaaaataggcttcgtgtgctcagggtcatgggaggtgcagga  
 cagctcatgaaacgccaacaatcgcacaattcatgtcaagctaatacagctatcttctcttcacg  
 agctgtaattgtcccaaaattctgggtctaccgggggtgatccttcgtgtacgggcccttccctc  
 aaccctaggtatgctgcgcatgctgggtcgccgcgcaactcgctgcgagggccgaggggttgggacgg  
 10 gccgtcccgaaatgcagttgcacccggatgctgtggcaccttttttgcgataatttatgcaatgg  
 actgctctgcaaaattctggctctgtcgccaaccctaggatcagcggcgtaggatttcgtaatc  
 attcgtcctgatggggagctaccgactaccctaataatcagcccgactgctgacgccagcgtcc  
 acttttgtgcacacattccattcgtgcccgaagacatttcattgtggtgccaagcgtccccagtt  
 acgctcacctgtttcccgcacctccttactgttctgtcgacagagcgggcccacaggccggctcgc  
 15 agccactagtatggtggtggccgcccgcagcagcgccttcttccccgtgcccgccccccgcg  
 cccaccccccaagcccggcaagttcggcaactggcccagcagcctgagccagcccttcaagccca  
 agagcaacccccaacggccgcttccagggtgaaggccaacgtgagccccacgggcgcgccccaa  
 ggccaacggcagcgcctgagcctgaagtccggcagcctgaacaccctggaggacccccccagc  
 agccccccccccgcaccttctgaaccagctgcccgactggagccgcctgctgcaccgcatca  
 20 ccaccgtgttcgtggccgcccgagaagcagttcaccgcctggaccgcaagagcaagcgcccccga  
 catgctggtggactgggttcggcagcagaccatcgtgcaggacggcctgggtgttccgcgagcgc  
 ttcagcatccgcagctacgagatcggcgcgaccgcaccgcccagcatcgagaccctgatgaacc  
 acctgcaggacaccagcctgaaccactgcaagagcgtgggcctgctgaacgacggcttcggccg  
 ccccccgagatgtgcaccgcgacctgatctgggtgctgaccaagatgcagatcgtgggtgaac  
 25 cgctacccccacctggggcgacaccgtggagatcaacagctgggttcagccagagcggcaagatcg  
 gcatgggcccgcgagtggtgatcagcagctgcaacaccggcgagatcctgggtgctgcgcccaccag  
 cgctgggcatgatgaaccagaagaccgcccgcttcagcaagctgccctgagaggtgctgcccag  
 gagatcgccccccacttctgtggacgccccccccgtgatcgaggacaacgaccgcaagctgcaca  
 agttcgacgtgaagaccggcgacagcatctgcaagggcctgacccccggctggaacgacttcga  
 30 cgtgaaccagcacgtgagcaacgtgaagtacatcggctggattctggagagcatgcccaccgag  
 gtgctggagaccaggagctgtgcagcctgaccctggagtagccgcccgcgagtgccggcccgcgaga  
 gcgtgggtggagagcgtgaccagcatgaaccccagcaaggtgggcccagccagcagtagcagca  
 cctgctgctgcctggaggacggcgcgacatcatgaagggccgcaccgagtgccgcccccaagaac

**gccggcaccaaccgcgccatcagcaccTGAttaattaa**ctcgagggcagcagcagctcggatagt  
 atcgacacactctggacgctggtcgctgctgatggactgctgcccacacacttgctgccttgacct  
 gtgaatatccctgccgcttttatcaaacagcctcagtgctgcttgatcttgctgctacgcgcttt  
 tgcgagttgctagctgcttgctatcttgccaataaccacccccagcatccccttcctcgtttc  
 5 atatcgcttgcatccaaccgcaacttatctacgctgtcctgctatccctcagcgcctgctcctg  
ctcctgctcactgcccctcgcacagccttggtttgggctccgctgctattctcctggactgca  
acctgtaaaccagcactgcaatgctgatgcacgggaagttagtgggatgggaacacaaatggaaa  
 gctt**gagctc**ttgttttccagaaggagttgctccttgagcctttcattctcagcctcgataacc  
 tccaaagccgctctaattgtggagggggttcgaag**gacaggggtggttggttggttgatggggaaacgc**  
 10 **tggtcgcgggattcgatcctgctgcttatatcctccctggaagcacaccacgactctgaagaa**  
**gaaaacgtgcacacacacaaccaaccggccgaatatttgcttccttatcccgggtccaagaga**  
**gactgcgatgccccctcaatcagcatcctcctccctgccgcttcaatcttcctgcttgctg**  
**cgcccgcggtgcgccgtctgcccgccagtcagtcactcctgcacaggccccttgctgcgcagtg**  
**ctcctgtaccctttaccgctccttcattctgcgaggccccctattgaatgtattcgttgctg**  
 15 **tgtggccaagcgggctgctggggcgcgccgctcgggcagtgctcggcgactttggcggaagcc**  
**gattgttcttctgtaagccacgcgcttgctgctttgggaagagaaggggggggtactgaatgg**  
**atgaggaggagaaggaggggtattggtattatctgagttgggtgagagc** (SEQ ID  
 NO:112)

20 **[0394]** Durante la transformación de FATA1-CrbTub\_ylnv\_nr-FATA1 en S1920, se purificaron clones de transformantes primarios y se cultivaron en condiciones de producción de lípidos estándar a pH 5.0 similares a las condiciones descritas en el Ejemplo 1. Los perfiles de ácidos grasos se analizaron utilizando métodos de detección por cromatografía de gases de éster metílico de ácido graso en ionización de llama (FAME GC/FID). La siguiente

25 Tabla 29 muestra los perfiles de ácidos grasos de varios transformantes.

25

30

35

40

45

Tabla 29. Perfiles de ácidos grasos de células de *Prototheca moriformis* que contenían un marcador seleccionable para suprimir un alelo de FATA1 endógeno.

Transformación	% de C14:0	% de C16:0	% de C18:0	% de C18:1	% de C18:2
natural	1.23	25.68	2.83	60.54	7.52
pSZ1883 Transformante 1	0.86	16.95	1.75	68.44	9.78
pSZ1883 Transformante 2	0.85	17.33	1.71	68.57	9.31
pSZ1883 Transformante 3	0.82	17.40	1.78	68.55	9.22
pSZ1883 Transformante 4	0.84	17.43	1.78	68.25	9.53
pSZ1883 Transformante 5	0.75	17.64	2.02	69.02	8.61

**[0395]** Estos resultados muestran que la ablación del alelo de FATA1 endógeno del huésped altera el perfil lipídico de las microalgas modificadas. El impacto de dirigir un marcador seleccionable al alelo de FATA1 endógeno es una disminución clara de la producción de ácidos grasos C16:0 con un incremento en la producción de ácidos grasos C18:1.

**[0396]** Durante la transformación de FATA1-CrbTub\_yInv\_nr::amt03\_CwTE2\_nr-FA en S1920, se purificaron clones de transformantes primarios y se cultivaron en condiciones de producción de lípidos estándar a pH 7.0 y proporcionando fuentes de carbono diferentes hasta una concentración total de 40 g/L. La concentración de sacarosa era de 40 g/L. Cuando se utilizó únicamente glucosa como fuente de carbono, la glucosa se proporcionó en una concentración de 40 g/L. Cuando se utilizaron glucosa y fructosa como fuentes de carbono, la glucosa se proporcionó en una concentración de 20 g/L y la fructosa en una concentración de 20 g/L. Los perfiles de ácidos grasos se evaluaron mediante GC-FID. Los perfiles de ácidos grasos resultantes se enumeran en la Tabla 30.

Tabla 30. Perfiles de ácidos grasos de células de *Prototheca moriformis* que contenían un marcador seleccionable y una tioesterasa exógena para suprimir un alelo de FATA1 endógeno.

Transformante	Número de copias	Fuente de carbono	% de C10:0	% de C12:0	% de C14:0	% de C16:0	% de C18:0	% de C18:1	% de C18:2
natural	0	Glucosa	0.01	0.04	1.38	28.83	3.00	56.05	8.21
natural	0	Glucosa	0.01	0.04	1.50	29.38	3.00	55.29	8.23
natural	0	Glucosa/ Fructosa	0.01	0.05	1.48	28.58	3.20	57.14	7.27
natural	0	Glucosa/ Fructosa	0.01	0.04	1.54	29.05	3.23	56.47	7.32
pSZ1925 Transformante 1	> 2	Glucosa/ Fructosa	4.29	19.98	9.17	20.68	3.47	34.38	6.37
pSZ1925 Transformante 2	> 2	Glucosa/ Fructosa	3.11	16.17	9.91	15.97	1.57	45.72	5.81
pSZ1925 Transformante 3	> 2	Sacarosa	4.84	24.22	11.56	19.48	2.67	29.56	6.02
pSZ1925 Transformante 4	> 2	Sacarosa	3.24	16.67	10.39	16.34	1.43	44.41	6.00
pSZ1925 Transformante 5	1-2	Glucosa/ Fructosa	0.18	1.64	1.85	14.43	2.12	70.30	7.63
pSZ1925 Transformante 6	1-2	Glucosa/ Fructosa	0.18	1.56	1.74	13.56	2.25	71.04	7.72

(Continuado)

5	pSZ1925 Transformante 7	1-2	Sacarosa	0.19	1.69	1.89	13.79	3.15	69.97	7.68
10	pSZ1925 Transformante 8	1-2	Sacarosa	0.15	1.26	1.49	13.44	2.73	71.46	7.77

[0397] En concordancia con el direccionamiento de un marcador seleccionable solo al alelo de FATA1 del huésped, la integración de un marcador seleccionable concomitante con una tioesterasa exógena altera el perfil lipídico de las microalgas modificadas. Al igual que se indicó anteriormente, el direccionamiento de un gen exógeno al alelo de FATA1 produce una disminución clara de la producción de ácidos grasos C16:0. La expresión adicional de la tioesterasa CwTE2 en el locus FATA1 también afecta a los ácidos grasos de cadena media y a la producción de ácidos grasos C18:1 en una medida que depende del nivel de actividad de la tioesterasa exógena presente en los transformantes analizados. Los genes flanqueados por unidades repetitivas, tales como la 3' UTR de la nitrato-reductasa de *C. vulgaris* en constructos tales como FATA1-CrbTub\_ylnv\_nr::amt03\_CwTE2\_nr-FATA1, se pueden amplificar al integrarlos en el genoma huésped. Existe una buena concordancia entre el número de copias del transgén amplificado en el sitio de integración diana y los niveles de tioesterasa, tal como indica el impacto que ejercen sobre los perfiles de ácidos grasos o la acumulación de proteínas recombinantes tal como se evalúa mediante inmunotransferencia de Western.

[0398] Las líneas transgénicas en las que el gen CwTE2 ha sido sometido a amplificación muestran un aumento marcado en los ácidos grasos de cadena media (C10:0-C14:0) y una reducción concurrente de los ácidos grasos C18:1. En contraste con esto, aquellos transformantes en los que CwTE2 no fue ampliado o fue ampliado poco (probablemente 1-2 copias) concuerdan con una expresión inferior de la tioesterasa exógena, lo cual produce un ligero incremento en los ácidos grasos de cadena media y un impacto mucho mayor sobre el incremento de ácidos grasos C18:1.

[0399] En conjunto, estos datos muestran que la ablación del alelo de FATA1 endógeno del huésped altera el perfil lipídico de las microalgas modificadas.

## B. Alteración de los perfiles lipídicos mediante la desactivación de un gen endógeno de tioesterasa de *Prototheca moriformis*

[0400] Se introdujo un constructo, pSZ1773, para reducir la expresión del gen FATA1 de *Prototheca moriformis* mediante un ARN horquillado en un entorno genético UTEX 1435 de S1920 de *Prototheca moriformis*. El gen de la sacarosa-invertasa suc2 de *Saccharomyces cerevisiae* se utilizó como marcador seleccionable, que confiere capacidad para crecer en sacarosa como única fuente de carbono. La porción del constructo que codifica el ARN horquillado empleó el primer exón de la región codificante de FATA1, seguido del intrón endógeno y una unidad repetitiva del primer exón en la orientación inversa. Se incluyeron secuencias de modificación dirigida por recombinación homóloga 5' y 3' (que flanqueaban el constructo) en la región genómica 6S, enumeradas como SEQ ID NO:100 y 101 respectivamente, para la integración del constructo horquillado en el genoma nuclear. Este constructo se denomina 6S:: $\beta$ -Tub:suc2:nr:: $\beta$ -tub:hairpinFatA:nr::6S.

[0401] Los sitios de restricción relevantes en el constructo 6S:: $\beta$ -Tub:suc2:nr:: $\beta$ -tub:hairpin FatA:nr::6S se indican en minúscula, en negrita y subrayados en la secuencia a continuación y son 5'-3' BspQ 1, Kpn I, Mfe I, BamH I, EcoR I, Spe I, Xho I, Sac I, BspQ I, respectivamente. Los sitios de BspQ I delimitan los extremos 5' y 3' del ADN transformante. Las secuencias en negrita y minúscula representan ADN genómico de S1920 que permite la integración dirigida en el locus 6S mediante recombinación homóloga. Siguiendo en la dirección de 5' a 3', el promotor de  $\beta$ -tubulina de *C. reinhardtii* que dirige la expresión del gen de sacarosa-invertasa de la levadura (que confiere la capacidad a S1920 para metabolizar sacarosa) se indica con el texto encuadrado. El codón de iniciación ATG y el codón de terminación TGA para la invertasa se indican en mayúscula, negrita y cursiva, mientras que la región codificante se indica en minúscula y cursiva. La 3' UTR de la nitrato-reductasa de *Chlorella vulgaris* se indica con texto en minúscula y subrayado, y viene seguida por el segundo promotor de  $\beta$ -tubulina de *C. reinhardtii* que dirige la expresión de la horquilla para FATA1, que se indica con texto en cursiva encuadrado. El codón de iniciación ATG de FATA1 se indica en mayúscula, negrita y cursiva, mientras que el resto del primer exón de la región codificante de FATA1 se indica en mayúscula. El intrón del gen FATA se indica en mayúscula y subrayado, y se creó una región conectora, mostrada en mayúscula, negrita, cursiva y subrayada, en el punto de unión del intrón/primer exón inverso de FATA1 para facilitar el corte y empalme del ARN en estos vectores. El primer exón inverso de FATA1 se indica en mayúscula. La 3' UTR de la nitrato-reductasa de *C. vulgaris* se indica de nuevo con texto en minúscula y subrayado y viene seguida por la región genómica 6S de S1920, que se indica con texto en negrita y minúscula. Las secuencias de las porciones de FATA de este constructo de ARN se enumeran como SEQ ID NO:110.

gctcttcgccgcccgcactcctgctcgagcgcgcccgcgctgcccgcagcgccttggcctt  
ttcgccgcgctcgtgcgctcgtgatgtccatcaccaggtccatgaggtctgccttgcgccg  
ctgagccactgcttcgtccgggcccgaagaggagcatgagggaggactcctgggtccagggctc  
tgacgtggtcgcggctctgggagcgggcccagcatcatctggctctgccgcaccgaggccgctc  
5 caactggctcctccagcagcccagtcgcccgcgaccctggcagaggaagacaggtgaggggggt  
atgaattgtacagaacaaccacgagccttgtctaggcagaatccctaccagtcatggctttacc  
tggatgacggcctgcaacagctgtccagcagaccctcgtcgcgcccgttctcccgcacgcttc  
ttccagcaccgtgatggcgcgagccagcgcgacgctggcgctgcgcttcgccgatctgagg  
acagtcggggaactctgatcagtcctaaaccccttgcgcttagtggtgccatcctttgcagac  
10 cggtgagagccgacttgttgtgcgccacccccacaccactcctcccagaccaattctgtcac  
ctttttggcgaaggcatcggcctcggcctgcagagaggacagcagtgcccagccgctgggggtt  
ggcggatgcacgctcaggtaccctttcttgcgctatgacacttccagcaaaaggtagggcgggc  
tgcgagacggcttcccggcgtgcatgcaacaccgatgatgcttcgacccccgaagctccttc  
ggggctgcatgggcgctccgatgccgctccagggcgagcgtgtttaaatagccagggccccga  
15 ttgcaaagacattatagcgagctaccaagccatattcaaacacctagatcactaccacttcta  
cacaggccactcgagcttgtgatcgactccgctaagggggcgctcctcctcttctgtttcagt  
cacaaccgcgaaactcttagaataatcaATGctgctgcaggccttctgttcttctgctggccggctt  
cgccgccaagatcagcgcctccatgacgaacgagacgctccgaccgccccctgggtgacttcacc  
ccaacaagggctggatgaacgacccccaacggcctgtgggtacgacgagaaggacgccaagtggc  
20 acctgtacttccagtacaaccggaacgacaccgtctgggggacgccttgttctggggccacgc  
cacgtccgacgacctgaccaactgggaggaccagccatcgccatcgccccgaagcgcaacgac  
tccggcgccttctccggctccatgggtgggtgactacaacaacacctccggcttcttcaacgaca  
ccatcgaccgcccagcgtgcgtggccatctggacctacaacaccccggagtccgaggagca  
gtacatctctacagcctggacggcggctacaccttaccgagtaccagaagaaccccgtgctg  
25 gccgccaactccaccagttccgcgaccccgaaggtcttctggtagcagccctcccagaagtgga  
tcatgaccgcccgaagtcccaggactacaagatcgagatctactcctccgacgacctgaagtc  
ctggaagctggagtccgcgttcgccaacgagggcttctcggctaccagtagcagtgccccggc  
ctgatcgaggtcccaccgagcaggaccccagcaagtcctactgggtgatgttcatctccatca  
accccggcgcctccggcggcctccttcaaccagttctcgtcggcagcttcaacggcaccaca  
30 cttcgaggccttcgacaaccagtcctccgcgtgggtgacttcggcaaggactactacgccctgcag  
accttcttcaacaccgaccccagctacgggagcgccttgggcatcgcggtggcctccaactggg  
agtactccgccttctgtgccaccaacccctggcgtcctccatgtcctcgtgcgcaagttctc  
cctcaacaccgagtaccaggccaaccccggagacggagctgatcaacctgaaggccgagccgatc  
ctgaacatcagcaacgcccggccctggagccgggttcgccaccaacaccagttgacgaaggcca  
35 acagctacaacgctcgacctgtccaacagcaccggcaccctggagttcgagctgggtgtacgccgt  
caacaccacccagacgatctccaagtcggtgttcgcggaccttccctctgggttcaagggcctg  
gaggaccccgaggagtacctccgcatgggcttcgaggtgtccgcgtcctccttcttctggacc  
gcccgaacagcaaggtgaagttcgtgaaggagaacccctacttcaccaaccgcatgagcgtgaa  
caaccagcccttcaagagcgagaacgacctgtcctactacaaggtgtacggcttgcgtggaccag  
40 aacatcctggagctgtacttcaacgacggcgacgtcgtgtccaccaacacctacttcatgacca  
ccgggaacgcctgggctccgtgaacatgacgacgggggtggacaacctgttctacatcgacaa  
gttccaggtgcgaggtcaagTGACAattggcagcagcagctcggatagtatcgacacactct  
ggacgctggctcgtgtgatggactgttgcccgcacacttgctgccttgacctgtgaatatccctg  
ccgcttttatcaaacagcctcagtggtttgatcttgtgtgtacgcgcttttgcgagttgctag  
45 ctgcttgtgctatttgcgaataaccacccccagcatccccctccctcgtttcatatcgcttgcat  
ccaaccgcaacttatctacgctgtcctgctatccctcagcgtgctcctgctcctgctcactg  
cccctcgacagccttgggttgggctccgcctgtattctcctgggtactgcaacctgtaaacag  
cactgcaatgctgatgcacgggaagtagtgggatgggaacacaaatggagggatcccgcgtctcg  
aacagagcgcgagaggaacgctgaaggtctcgcctctgtcgcacctcagcgcggcatacacca  
50 caataaccacctgacgaatgcgcttgggttcttctgctccattagcgaagcgtccgggtcacacag

tgccacggtggcgaggtggcaggtgacaatgatcgggtggagctgatggtcgaaacggttcacagc  
 ctagggatatacgaattcctttcttgcgctatgacacttccagcaaaaggtagggcgggctgcga  
 gacggcttcccggcgctgcatgcaacaccgatgatgcttccgacccccgaagctccttcggggg  
 tgcattgggctccgatgccgctccagggcgagcgctgtttaaatagccaggcccccgattgca  
 5 aagacattatagcgagctaccaaaagccatattcaaacacctagatcactaccacttctacacag  
 gccactcgagcttgtgatcgcaactccgctaagggggcgctccttctccttcttcggtttcagtcacaa  
 cccgcaaacactagtATGGCACCGACCAGCCTGCTTGCCAGTACTGGCGTCTCTTCCGCTTCTC  
 TGTGGTCTCTGCGCGCTCCAGCGCGTGCCTTTTTCCGGTGGATCATGCGGTCCGTGGCGCACC  
 GCAGCGGCCGCTGCCCATGCAGCGCCGCTGCTTCCGAACAGTGGCGGTGAGGGCCGCACCCGCG  
 10 GTAGCCGTCCGTCCGGAACCCGCCAAGAGTTTTGGGAGCAGCTTGAGCCCTGCAAGATGGCGG  
 AGGACAAGCGCATCTTCCCTGGAGGAGCACCGGTGCGTGGAGGTCCGGGGCTGACCGGCCGTCCG  
 ATCAACGTAATCAATCGCATGATGATCAGAGGACACGAAGTCTTGTTGGCGGTGGCCAGAAAC  
 ACTGTCCATTGCAAGGGCATAGGGATGCGTTCCTTCACCTCTCATTCTCATTCTGAATCCCT  
 CCTGCTCACTCTTTCTCCTCCTCCTTCCCGTTCACGCAGCATTTCGGGGCAACGAGGTGGGCC  
 15 GTGCTCCTCCAGGAAGATGCGCTTGTCTCCTCCGCCATCTTGCAGGGCTCAAGCTGCTCCAAAAC  
 TCTTGGGCGGGTTCGGGACGGACGGCTACCGCGGGTGCAGGCCCTGACCGCCACTGTTCCGAAGC  
 AGCGGCGCTGCATGGGCAGCGGCCGCTGCGGTGCGCCACGGACCGCATGATCCACCGGAAAAGC  
 GCACGCGCTGGAGCGCGCAGAGGACCACAGAGAAGCGGAAGAGACGCCAGTACTGGCAAGCAGG  
 CTGGTCCGTGCCATatcgatagatctcttaaggcagcagcagctcggatagtatcgacacactc  
 20 tggacgctggctcgtggtgatggactggtgccgccacacttgctgccttgacctgtaatatcct  
 gccgcttttatcaaacagcctcagtggtggttgatcttggtggtacgcgcttttgcgagttgcta  
 gctgcttggtgctatttgcaataaccacccccagcatccccttccctcgtttcataatcgcttga  
 tcccaaccgcaacttatctacgctgctcctgctatcccctcagcgtgctcctgctcctgctcact  
 gccctcgacagccttggttgggctccgctgctattctcctggtactgcaacctgtaacca  
 25 gcaactgcaatgctgatgcacgggaagtagtgggatgggaacacaaaatggaaagcttaattaaga  
 gctccttggtttccagaaggagttgctccttgagcctttcattctcagcctcgataacctccaaa  
 gccgctctaattgtggagggggttcgaatttaaagcttggaatggtgggtcgtgctctggaa  
 caagcccagacttgttgctcactgggaaaaggaccatcagctccaaaaaacttgccgctcaaac  
 cgcgtacctctgctttcgcgcaatctgccctggtgaaatcgccaccacattcatattgtgacgc  
 30 ttgagcagctctgtaattgcctcagaatgtggaatcatctgccccctgtgagcagccatgccagg  
 catgtcgcgggagggacacccgccactcgtacagcagaccattatgctacctcacaatagttc  
 ataacagtgaccatatttctcgaagctccccaacgagcacctccatgctctgagtggtgcccaccc  
 ccggccctggtgcttgccggagggcaggtcaaccggcatggggctaccgaaatccccgaccggat  
 cccaccacccccgcgatgggaagaatctctccccgggatgtgggcccaccaccagcacaacctg  
 35 ctggcccaggcgagcgtcaaaccataccacacaaatatccttggcatcggccctgaattccttc  
 tgccgctctgctaccgggtgcttctgtccgaagcagggggttgctagggatcgctccgagtcgca  
 aaacccttgctcgcgtggcggggcttgttcgagcttgaagagc (SEQ ID NO:113)

40 **[0402]** La expresión de 6S::β-Tub:suc2::nr:: β-tub:hairpin FatA::nr::6S conduce a la formación de un ARN horquillado para silenciar los genes FATA diana. Durante su transformación en S1920, se purificaron clones de transformantes primarios y se cultivaron en condiciones de producción de lípidos estándar a pH 5.0. Los perfiles resultantes de los clones de transformantes representativos se enumeran en la Tabla 31

45  
 50

Tabla 31. Perfiles de ácidos grasos de células de *Prototheca moriformis* que contenían un constructo de ARN horquillado para reducir la expresión de FATA.

Transformante	% de C10:0	% de C12:0	% de C14:0	% de C16:0	% de C16:1	% de C18:0	% de C18:1	% de C18:2
natural	0.01	0.03	1.23	25.68	0.96	2.83	60.54	7.52
Transformante 1 de pSZ1773	0.01	0.03	0.71	15.10	1.05	1.67	72.08	8.27
Transformante 2 de pSZ1773	0.01	0.03	0.81	15.66	1.16	1.56	70.03	9.61
Transformante 3 de pSZ1773	0.01	0.03	1.09	22.67	1.05	2.12	63.18	8.66
Transformante 4 de pSZ1773	0.01	0.04	1.14	23.31	1.01	2.23	62.83	8.26

[0403] Los resultados anteriores muestran que la construcción de horquilla FATA produjo fenotipos esperados: una reducción de los niveles ácidos grasos C16 y un aumento en los niveles de ácidos grasos C18: 1, en comparación con el control no transformado de origen natural.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

**[0404]**

SEQ ID NO:1

Promotor de HUP de *Chlorella* (subsecuencia de número de acceso a GenBank X55349)

gatcagacgggcctgacctgcgagataatcaagtctcgttagccaaccaactcagcagctgcttgggtgtgggtctgcaggatagtgttc  
 agggcccaaggacagcaggggaacttacacctgtccccgaccagtttatggagtgcattgcctcaagagcctagccggagcgttag  
 gctacatacttggcaccggataggggatagctactgcactgcctgtctagttagatgggcagtgctgccataaacaactggctg  
 ctacagccatttggcggaccattctggggggccagcaatgctgacttccggtagggtaaaaactgaacaaagactacaaaacaga  
 atttctctccttggagtaagcgcaggccggccgctgcgccacatggcgtccgaacacctccatagctgaaggcgcaaacatg  
 gccggactgtgtcagcactcttcatggcatacaaggtcatgtcagattagtctgagtaagacactatccccatgttcgattgaagcc  
 gtgacttcatgccaacctgcccctgggcgtagcagacgtatgccatcatgaccactagccgacatgcgtgtctttgccacaaaact  
 ggtacaccgctcgaagtcgtgccgcacacctccgggagtgtccggcactcctccccggcgggcccgcggccctacctgggtagggt  
 cgccatacggccacgaccaaacgacgcaggaggggattgggtaggggaatccaaccagcctaaccaagacggcacctataataatag  
 gtggggggactaacagccctatcgaagcttgggtgcctatcttgagaagcacgattggagtggctgtgtacggtcgacctaaagt  
 gggtgtgccgcagcctgaaacaaagcgtctagcagctgcttataatgtgtcagccgttgtttcagttatattgtatgctattgttctg  
 ctagggtggcgcaggccacctactgtggcggccattggtggtgctgaattgcctcaccatctaaggctgtaacgctcactcaaacgcc  
 tttgtacaactgcagaacttcttggcgtgcaactacagtgtgcaaacagcacatagcactcccttaccatcaccagcagtacaaca

SEQ ID NO:2

Promotor de la nitrato-reductasa de *Chlorella ellipsoidea* de AY307383

cgctgcgcaccagggccgagctcgtgatgtcgtccaaatcggtccccgatttttgttcttcatcttctccaccttgggtggccttctg  
 gccagggcctcagctgcatgcgcagaccggtgagctcctgatcagatcctcaggaggcccttgacaagcaagcccctgtgcaagc  
 ccattcacgggtaccagtgggtgctgaggtataggggtttaaaggattgctcggctgattgctgctcatggaattggcatgtcatgcatg  
 ttcacaatatgccaccaggcttggagcaagagacatgaatgcttcaggcaggtgaaagttcctgggggtgaagaggcaggccgag  
 gattggaggaggaaagcatcaagtcgtcgtcatgctcatgttttcagtcagatttgccaagctcacaggagcagagacaagactggctg  
 ctacaggtgtgcatcgtgtgtgtggggggggggggggttaatacgggtacgaaatgcacttggaaattccacctcatgcccagcggacca  
 catgcttgaattcagggcctgtggggtgagaaatgtcactctgcctcgttctgaggtacttcaggccgctgagctcaaagtcgatgcct  
 gctcgtctatcagggcctgcaccttggctgaccggctcagcctccttcggggcatggagtaggcgccggcagcgttcatgtccgggc  
 ccagggcagcgggtgtccataaatgtcggatggtggggaggggggccgctgccacaccattgccgttggctgacgcatgcaca  
 tgtggcctggctggcaccggcagcactggtctccagccagcagcaagtggctgttcaggaaagcggccatgttggctcctgcgcat  
 gtaattcccagatcaaaggagggaacagcttggattgatgtagtgccaaccggactgaatgtcgatggcaggtccctttgagtctccc

gaattactagcagggcactgtgacctaacgcagcatgccaacggcaaaaaatgattgacagaaaatgaagcgggtgtgcaatatttctgt  
 atttattcgttttaacagcaaccaagttcgaaacgcaactatcggtgatcaagtgaacctcatcagacttacctcgttcggcaaggaaacg  
 gaggcaccaaattccaattgatattatcgcttgccaagctagagctgatctttggaaaccaactgccagacagtgactgtgatggagtgc  
 cccgagtggaggacctctcgattcggtagtcattactaacgtgaacctcagtgaaaggaccatcagaccagaaagaccagatctcctc  
 5 ctcgacaccgagagagtgttcggcagtaggacgacaag

**SEQ ID NO:3**

Sacarosa-invertasa de levadura

10 MTNETSDRPLVHFTPNGKWMNDPNGLWYDEKDAKWHLYFQYNPNDTVWGTPLFWG  
 HATSDDLTNWEDQPIAIAIPKRNDSGAFSGSMVVDYNNTSGFFNDTIDPRQRCVAIWTYN  
 TPESEEQYISYSLDGGYTFTEYQKNPVLAANSTQFRDPKVFYEPSQKWIMTAAKSQDY  
 KIEIYSSDDLKSWKLESAFANEGFLGYQYECPLIEVPTEQDPSKSYWVMFISINPGAPAG  
 GSFNQYFVGSFNGTHFEAFDNQSRVVDGKDYALQTFNTDPTYGSALGIAWASNWE  
 15 YSAFVPTNPWRSSMSLVRKFSLNTEYQANPETELINLKAEPILNISNAGPWSRFATNTTLT  
 KANSYNVDLSNSTGTLEFELVYAVNTTQTISKSVFADLSLWFKGLEDPEEYLRMGFEVS  
 ASSFFLDRGNSKVFKVKENPYFTNRMSVNNQPFKSENDLSYYKVYGLLDQNILELYFND  
 GDVVSTNTYFMTTGNALGSVNMTTGVDNLFYIDKFQVREVK

**SEQ ID NO:4**

Señal de secreción de levadura

MLLQAFLFLLAGFAAKISAS

**SEQ ID NO:5**

25 Señal de secreción de plantas superiores

MANKSLLLLLLLLGSLASG

**SEQ ID NO:6**

Señal de secreción eucariota consenso

30 MARLPLAALG

**SEQ ID NO:7**

Combinación de señal de secreción de plantas superiores/eucariota

MANKLLLLLLLLLLLLPLAASG

35

**SEQ ID NO:8**

Sacarosa-invertasa de *S. cerevisiae* NP\_012104

40 GAATTCCCAACATGGTGGAGCACGACACTCTCGTCTACTCCAAGAATATCAAAGAT  
 ACAGTCTCAGAAGACCAAAGGGCTATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCGGG  
 AAACCTCCTCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTCATCAAAGGACAGTAGA  
 AAAGGAAGGTGGCACCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCTATCGTTC  
 AAGATGCCTCTGCCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATC  
 GTGGAAAAAGAAGACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGAACA  
 45 TGGTGGAGCACGACACTCTCGTCTACTCCAAGAATATCAAAGATACAGTCTCAGAA  
 GACCAAAGGGCTATTGAGACTTTTCAACAAAGGGTAATATCGGGAAACCTCCTCGG  
 ATTCCATTGCCAGCTATCTGTCACTTCATCAAAGGACAGTAGAAAAGGAAGGTG

GCACCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCTATCGTTCAAGATGCCTCTG  
 CCGACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCCACCCACGAGGAGCATCGTGGAAAAAGAA  
 GACGTTCCAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTA  
 AGGGATGACGCACAATCCCCTATCCTTCGCAAGACCCTTCCTCTATATAAGGAAGT  
 5 TCATTTCAATTTGGAGAGGACACGCTGAAATCACCAGTCTCTCTCTACAAATCTATCT  
 CTGGCGCGCCATATCAATGCTTCTTCAGGCCTTTCTTTTTCTTCTTGCTGGTTTTGCTG  
 CCAAGATCAGCGCCTCTATGACGAACGAAACCTCGGATAGACCACTTGTGCACTTTA  
 CACCAACAAGGGCTGGATGAATGACCCCAATGGACTGTGGTACGACGAAAAAGAT  
 GCCAAGTGGCATCTGTACTTTCAATAACAACCCGAACGATACTGTCTGGGGGACGCCA  
 10 TTGTTTTGGGGCCACGCCACGTCCGACGACCTGACCAATTGGGAGGACCAACCAAT  
 AGCTATCGCTCCGAAGAGGAACGACTCCGGAGCATTCTCGGGTTCCATGGTGGTTGA  
 CTACAACAATACTTCCGGCTTTTTCAACGATACCATTGACCCGAGACAACGCTGCGT  
 GGCCATATGGACTTACAACACACCCGGAGTCCGAGGAGCAGTACATCTCGTATAGCC  
 TGGACGGTGGATACACTTTTACAGAGTATCAGAAGAACCCTGTGCTTGCTGCAAATT  
 15 CGACTCAGTTCCGAGATCCGAAGGTCTTTTGGTACGAGCCCTCGCAGAAGTGGATCA  
 TGACAGCGGCAAAGTCACAGGACTACAAGATCGAAATTTACTCGTCTGACGACCTT  
 AAATCCTGGAAGCTCGAATCCGCGTTCGCAAACGAGGGCTTTCTCGGCTACCAATAC  
 GAATGCCCAGGCCTGATAGAGGTCCCAACAGAGCAAGATCCCAGCAAGTCCTACTG  
 GGTGATGTTTATTTCCATTAATCCAGGAGCACCGGCAGGAGGTTCTTTTAATCAGTA  
 20 CTTCGTCGGAAGCTTTAACGGAACCTCATTTCGAGGCATTTGATAACCAATCAAGAGT  
 AGTTGATTTTGGAAAGGACTACTATGCCCTGCAGACTTTCTTCAATACTGACCCGAC  
 CTATGGGAGCGCTCTTGGCATTGCGTGGGCTTCTAACTGGGAGTATTCCGCATTCGT  
 TCCTACAAACCCTTGGAGGTCCCTCATGTGCTCGTGTGAGGAAATTTCTCTCAACAC  
 TGAGTACCAGGCCAACCCGGAAACCGAACTCATAAACCTGAAAGCCGAACCGATCC  
 25 TGAACATTAGCAACGCTGGCCCCTGGAGCCGGTTTGCAACCAACACCACGTTGACG  
 AAAGCCAACAGCTACAACGTCGATCTTTCGAATAGCACCGGTACACTTGAATTTGAA  
 CTGGTGTATGCCGTCAATACCACCCAAACGATCTCGAAGTCGGTGTTCGCGGACCTC  
 TCCCTCTGGTTTAAAGGCCTGGAAGACCCCGAGGAGTACCTCAGAATGGGTTTTCGAG  
 GTTTCTGCGTCCTCCTTCTTCTTGTATCGCGGGAACAGCAAAGTAAAATTTGTTAAG  
 30 GAGAACCCATATTTTACCAACAGGATGAGCGTTAACAACCAACCATTCAAGAGCGA  
 AAACGACCTGTGCTACTACAAAGTGATGGTTTTGCTTGATCAAATATCCTGGAACCT  
 TACTTCAACGATGGTGTATGTCGTGTCCACCAACACATACTTCATGACAACCGGGAA  
 CGCACTGGGCTCCGTGAACATGACGACGGGTGTGGATAACCTGTTCTACATCGACA  
 AATTCAGGTGAGGGAAGTCAAGTGAGATCTGTGATCGACAAGCTCGAGTTTCTCC  
 35 ATAATAATGTGTGAGTAGTTCCAGATAAGGGAATTAGGGTTCCTATAGGGTTTCGC  
 TCATGTGTTGAGCATATAAGAAACCCTTAGTATGTATTTGTATTTGTAAAATACTTCT  
 ATCAATAAAATTTCTAATTCCTAAAACCAAATCCAGTACTAAAATCCAGATCCCC  
 GAATTA

40 **SEQ ID NO:9**

TGTTGAAGAATGAGCCGGCGAC

**SEQ ID NO:10**

45

CAGTGAGCTATTACGCACTC

**SEQ ID NO:11**

*Prototheca kruegani* UTEX 329

TGTTGAAGAATGAGCCGGCGAGTTAAAAAGAGTGGCATGGTTAAAGAAAATACTCT  
 GGAGCCATAGCGAAAGCAAGTTTAGTAAGCTTAGGTCATTCTTTTTAGACCCGAAAC  
 CGAGTGATCTACCCATGATCAGGGTGAAGTGTTAGTAAAATAACATGGAGGCCCGA  
 5 ACCGACTAATGTTGAAAAATTAGCGGATGAATTGTGGGTAGGGGCGAAAAACCAAT  
 CGAACTCGGAGTTAGCTGGTTCTCCCCGAAATGCGTTTAGGCGCAGCAGTAGCAGTA  
 CAAATAGAGGGGTAAAGCACTGTTTCTTTTGTGGGCTTCGAAAGTTGTACCTCAAAG  
 TGGCAAACCTCTGAATACTCTATTTAGATATCTACTAGTGAGACCTTGGGGGATAAGC  
 TCCTTGGTCAAAGGGAAACAGCCCAGATCACCAGTTAAGGCCCCAAAATGAAAAT  
 10 GATAGTACTAAGGATGTGGGTATGTCAAACCTCCAGCAGGTTAGCTTAGAAGCA  
 GCAATCCTTTCAAGAGTGCGTAATAGCTCACTG

**SEQ ID NO:12**

*Prototheca wickerhamii* UTEX 1440

15 TGTTGAAGAATGAGCCGGCGACTTAAAATAAATGGCAGGCTAAGAGATTTAATAAC  
 TCGAAACCTAAGCGAAAGCAAGTCTTAATAGGGCGTCAATTTAACAAAACCTTTAAA  
 TAAATTATAAAGTCATTTATTTTAGACCCGAACCTGAGTGATCTAACCATGGTCAGG  
 ATGAAACTTGGGTGACACCAAGTGGAAAGTCCGAACCGACCGATGTTGAAAAATCGG  
 20 CGGATGAACTGTGGTTAGTGGTGAATACCAGTCGAACTCAGAGCTAGCTGGTTCTC  
 CCCGAAATGCGTTGAGGCGCAGCAATATATCTCGTCTATCTAGGGGTAAAGCACTGT  
 TTCGGTGCGGGCTATGAAAATGGTACCAAATCGTGGCAAACCTCTGAATACTAGAAA  
 TGACGATATATTAGTGAGACTATGGGGGATAAGCTCCATAGTCGAGAGGGAAACAG  
 CCCAGACCACAGTTAAGGCCCCAAAATGATAATGAAGTGGTAAAGGAGGTGAAAA  
 25 TGCAAATACAACCAGGAGGTTGGCTTAGAAGCAGCCATCCTTTAAGAGTGCGTAA  
 TAGCTCACTG

**SEQ ID NO:13**

*Prototheca stagnora* UTEX 1442

30 TGTTGAAGAATGAGCCGGCGAGTTAAAAAAAATGGCATGGTTAAAGATATTTCTCT  
 GAAGCCATAGCGAAAGCAAGTTTTACAAGCTATAGTCATTTTTTTTTAGACCCGAAAC  
 CGAGTGATCTACCCATGATCAGGGTGAAGTGTTGGTCAAATAACATGGAGGCCCGA  
 ACCGACTAATGGTGAAAAATTAGCGGATGAATTGTGGGTAGGGGCGAAAAACCAAT  
 35 CGAACTCGGAGTTAGCTGGTTCTCCCCGAAATGCGTTTAGGCGCAGCAGTAGCAAC  
 ACAAATAGAGGGGTAAAGCACTGTTTCTTTTGTGGGCTTCGAAAGTTGTACCTCAA  
 GTGGCAAACCTCTGAATACTCTATTTAGATATCTACTAGTGAGACCTTGGGGGATAAG  
 CTCCTTGGTCAAAGGGAAACAGCCCAGATCACCAGTTAAGGCCCCAAAATGAAAA  
 TGATAGTACTAAGGACGTGAGTATGTCAAACCTCCAGCAGGTTAGCTTAGAAGC  
 40 AGCAATCCTTTCAAGAGTGCGTAATAGCTCACTG

**SEQ ID NO:14**

*Prototheca moriformis* UTEX 288

45 TGTTGAAGAATGAGCCGGCGAGTTAAAAAGAGTGGCATGGTTAAAGATAATTCTCT  
 GGAGCCATAGCGAAAGCAAGTTTAAACAAGCTAAAGTCACCCTTTTTAGACCCGAAA  
 CCGAGTGATCTACCCATGATCAGGGTGAAGTGTTGGTAAAATAACATGGAGGCCCG  
 AACCGACTAATGGTGAAAAATTAGCGGATGAATTGTGGGTAGGGGCGAAAAACCAA  
 TCGAACTCGGAGTTAGCTGGTTCTCCCCGAAATGCGTTTAGGCGCAGCAGTAGCAAC

ACAAATAGAGGGGTAAAGCACTGTTTCTTTTGTGGGCTTCGAAAGTTGTACCTCAA  
 GTGGCAAACCTCTGAATACTCTATTTAGATATCTACTAGTGAGACCTTGGGGGATAAG  
 CTCCTTGGTCAAAGGGAAACAGCCAGATCACCAGTTAAGGCCCAAAATGAAAA  
 TGATAGTGACTAAGGATGTGGGTATGTTAAAACCTCCAGCAGGTTAGCTTAGAAGC  
 5 AGCAATCCTTTCAAGAGTGCGTAATAGCTCACTG

**SEQ ID NO:15**

*Prototheca moriformis* UTEX 1439, UTEX 1441, UTEX 1435, UTEX 1437

10 TGTTGAAGAATGAGCCGGCGACTTAAAATAAATGGCAGGCTAAGAGAATTAATAAC  
 TCGAAACCTAAGCGAAAGCAAGTCTTAATAGGGCGCTAATTTAACAAAACATTTAA  
 TAAAATCTAAAGTCATTTATTTTAGACCCGAACCTGAGTGATCTAACCATGGTCAGG  
 ATGAAACTTGGGTGACACCAAGTGGAAGTCCGAACCGACCGATGTTGAAAAATCGG  
 CGGATGAACTGTGGTTAGTGGTGAATACCAGTCGAACTCAGAGCTAGCTGGTTCTC  
 15 CCCGAAATGCGTTGAGGCGCAGCAATATATCTCGTCTATCTAGGGGTAAAGCACTGT  
 TTCGGTGCGGGCTATGAAAATGGTACCAAATCGTGGCAAACCTCTGAATACTAGAAA  
 TGACGATATATTAGTGAGACTATGGGGGATAAGCTCCATAGTCGAGAGGGAAACAG  
 CCCAGACCACAGTTAAGGCCCAAAATGATAATGAAGTGGTAAAGGAGGTGAAAA  
 TGCAAATACAACCAGGAGGTTGGCTTAGAAGCAGCCATCCTTTAAAGAGTGCGTAA  
 20 TAGCTCACTG

**SEQ ID NO:16**

*Prototheca wickerhamii* UTEX 1533

25 TGTTGAAGAATGAGCCGTCGACTTAAAATAAATGGCAGGCTAAGAGAATTAATAAC  
 TCGAAACCTAAGCGAAAGCAAGTCTTAATAGGGCGCTAATTTAACAAAACATTTAA  
 TAAAATCTAAAGTCATTTATTTTAGACCCGAACCTGAGTGATCTAACCATGGTCAGG  
 ATGAAACTTGGGTGACACCAAGTGGAAGTCCGAACCGACCGATGTTGAAAAATCGG  
 CGGATGAACTGTGGTTAGTGGTGAATACCAGTCGAACTCAGAGCTAGCTGGTTCTC  
 30 CCCGAAATGCGTTGAGGCGCAGCAATATATCTCGTCTATCTAGGGGTAAAGCACTGT  
 TTCGGTGCGGGCTATGAAAATGGTACCAAATCGTGGCAAACCTCTGAATACTAGAAA  
 TGACGATATATTAGTGAGACTATGGGGGATAAGCTCCATAGTCGAGAGGGAAACAG  
 CCCAGACCACAGTTAAGGCCCAAAATGATAATGAAGTGGTAAAGGAGGTGAAAA  
 TGCAAATACAACCAGGAGGTTGGCTTAGAAGCAGCCATCCTTTAAAGAGTGCGTAA  
 35 TAGCTCACTG

**SEQ ID NO:17**

*Prototheca moriformis* UTEX 1434

40 TGTTGAAGAATGAGCCGGCGAGTTAAAAGAGTGGCGTGGTTAAAGAAAATTCTCT  
 GGAACCATAGCGAAAGCAAGTTAACAAAGCTTAAGTCACTTTTTTTTAGACCCGAAAC  
 CGAGTGATCTACCCATGATCAGGGTGAAGTGTGGTAAAATAACATGGAGGCCCGA  
 ACCGACTAATGGTGAAAAATTAGCGGATGAATTGTGGGTAGGGGCGAAAAACCAAT  
 CGAACTCGGAGTTAGCTGGTTCTCCCCGAAATGCGTTTAGGCGCAGCAGTAGCAAC  
 45 ACAAATAGAGGGGTAAAGCACTGTTTCTTTTGTGGGCTCCGAAAGTTGTACCTCAA  
 GTGGCAAACCTCTGAATACTCTATTTAGATATCTACTAGTGAGACCTTGGGGGATAAG  
 CTCCTTGGTCAAAGGGAAACAGCCAGATCACCAGTTAAGGCCCAAAATGAAAA  
 TGATAGTGACTAAGGATGTGAGTATGTCAAACCTCCAGCAGGTTAGCTTAGAAGC  
 AGCAATCCTTTCAAGAGTGCGTAATAGCTCACTG

**SEQ ID NO:18**

*Prototheca zopfii* UTEX 1438

5 TGTGAAGAATGAGCCGGCGAGTTAAAAAGAGTGGCATGGTTAAAGAAAATTCTCT  
 GGAGCCATAGCGAAAGCAAGTTTAAACAAGCTTAAGTCACTTTTTTTAGACCCGAAAC  
 CGAGTGATCTACCCATGATCAGGGTGAAGTGTGGTAAATAACATGGAGGCCCGA  
 ACCGACTAATGGTGAAAAATTAGCGGATGAATTGTGGGTAGGGGCGAAAAACCAAT  
 10 CGAACTCGGAGTTAGCTGGTTCTCCCCGAAATGCGTTTAGGCGCAGCAGTAGCAAC  
 ACAATAGAGGGGTAAAGCACTGTTTCTTTCGTGGGCTTCGAAAGTTGTACCTCAA  
 GTGGCAAACCTCTGAATACTCTATTTAGATATCTACTAGTGAGACCTTGGGGGATAAG  
 CTCCTTGGTCAAAGGGAAACAGCCAGATCACCAGTTAAGGCCCCAAAATGAAAA  
 TGATAGTACTAAGGATGTGAGTATGTCAAACCTCCAGCAGGTTAGCTTAGAAGC  
 15 AGCAATCCTTCAAGAGTGCCTAATAGCTCACTG

**SEQ ID NO:19**

*Prototheca moriformis* UTEX 1436

20 TGTGAAGAATGAGCCGGCGACTTAGAAAAGGTGGCATGGTTAAGGAAATATTCCG  
 AAGCCGTAGCAAAGCGAGTCTGAATAGGGCGATAAAATATATTAATATTTAGAAT  
 CTAGTCATTTTTTCTAGACCCGAACCCGGGTGATCTAACCATGACCAGGATGAAGCT  
 TGGGTGATACCAAGTGAAGGTCCGAACCGACCGATGTTGAAAAATCGGCGGATGAG  
 TTGTGGTTAGCGGTGAAATACCAGTCGAACCCGGAGCTAGCTGGTTCTCCCCGAAAT  
 25 GCGTTGAGGCGCAGCAGTACATCTAGTCTATCTAGGGGTAAAGCACTGTTTCGGTGC  
 GGGCTGTGAGAACGGTACCAAATCGTGGCAAACCTCTGAATACTAGAAATGACGATG  
 TAGTAGTGAGACTGTGGGGGATAAGCTCCATTGTCAAGAGGGAAACAGCCAGACC  
 ACCAGCTAAGGCCCCAAAATGGTAATGTAGTGACAAAGGAGGTGAAAATGCAAATA  
 CAACCAGGAGGTTGGCTTAGAAGCAGCCATCCTTTAAAGAGTGCCTAATAGCTCAC  
 30 TG

**SEQ ID NO:20**

Invertasa de *Chicorium intybus*: n.º de acceso a Genbank Y11124

35 MSNSSNASESLFPATSEQPYRTAFHFQPPQNWMNDPNGPMCYNVYHLFYQYNPFGPL  
 WNLRMVWAHSVSHDLINWIHLDLAFAPTEPFDINGCLSGSATVLPGNKPIMLYTIDTE  
 NRQVQNLA VPKDLSDPYLREWVKHTGNPIISLPEEIQPDDFRDPTTTWLEEDGTWRLV  
 GSQKDKTGIAFLYHSGDFVNWTKSDSPLHKVSGTGMWECVDFFPVWVDSTNGVDTSII  
 NPSNRVKHVLKLGIQDHGKDCYLIGKYSADKENYVPEDELTLSTLRDLDYGMYYASKSF  
 FDPVKNRRIMTAWVNESDSEADVIARGWSGVQSFPRSLWLDKNQKQLLQWPPIEEIEML  
 40 HQNEVSFHNKLDGGSSLEVLGITASQADV KISFKLANLEEAEELDPSWVDPQLICSEND  
 ASKKGKFGPFGLLALASSDLREQTAIFFRVFRKNGRYVVLMSDQSRSSMKNKIEKRTY  
 GAFVDIDPQQDEISLRTLIDHSIVESFGGRGKTCITTRVYPTLAIGEQRARLFAFNHGTESVE  
 ISELASWSMKKAQMKVEEP

**SEQ ID NO:21**

Invertasa de *Schizosaccharomyces pombe*: n.º de acceso a Genbank AB011433

45 MFLKYILASGICLVSLLSSTNAAPRHLVVKRYVPVIYNASNITEVSNSTTVPPPPFVNTTAP  
 NGTCLGNYNEYLPSGYYNATDRPKIHFTPSSGFMNDPNGLVYTTGGVYHMFQYSPKTL

TAGEVHWGHTVSKDLIHWENYPIAIYPDEHENGVLSPFSGSAVVDVHNSSGLFSNDTIP  
 EERIVLIYTDHWTGVAERQAIAYTTDGGYTFKKYSGNPVLDINSLQFRDPKVIWDFDAN  
 RWVMIVAMSQNYGIAFYSSYDLIHWTELSVFSTSGYLGLQYECPGMARVPVEGTDEYK  
 WVLFIGINPGAPLGGSVVQYFVGDWNGTNFVPDDGQTRFVDLGKDFYASALYHSSAN  
 5 ADVIGVGWASNWQYTNQAPTQVFRSAMTVARKFTLRDVPQNPMTNLTSLIQTPLNVSL  
 LRDETLFTAPVINSSSSLSGSPITLPSNTAFEFNVTLISINYTEGCTTGYCLGRIIIDSDDPYRL  
 QSISVDVDFAASTLVINRAKAQMGWFNSLFTPSFANDIYIYGNVTLYGIVDNGLLELYVN  
 NGEKTYTNDFFLQGATPGQISFAAFQGVSFNNVTVTPLKTIWNC

**SEQ ID NO:22**

Beta-fructofuranosidasa (invertasa) de *Picha anomala*: n.º de acceso a Genbank X80640

MIQLSPLLLLPLFSVFNSIADASTEYLRPQIHLTPDQGWMDPNMGMFYDRKDKLWHVYF  
 QHNPDKKSIWATPVTWGHSTSKDLLTWDYHGNALEPENDEGIFSGSVVDRNNTSGF  
 15 FNDSTDPEQRIVAIYTNNACLQTQEIAYSLDKGYSFICYDQNPVINVNSSQQRDPKVLWH  
 DESNQWIMVVAKTQEFKVQIYGSPLKKNWDLKSNFTSNGYLGFGYECPLFKLPIENPL  
 NDTVTSKWVLLLAINPGSPLGGSSINEYFIGDFDGTTFHPDDGATRFMDIGKDFYAFQSF  
 NTEPEDGALGLAWASNWQYANTVPTENWRSSMSLVRNYTLKYVDVNPENYGLTLIQK  
 PVYDTKETRLNETLKTLETINEYEVNDLKLKDKSSFVATDFNTERNATGVFEFDLKFQTD  
 20 LKMGYSNMTTQFGLYIHSQTVKGSQETLQLVFDLSTTWYIDRTTQHSFQRNSPVFTE  
 STYVEKIDTTDQGNVYTLYGVVDRNILELYFNDGSIAMTNTFFFREGKIPTSFEVVCDSE  
 KSFITIDELSVRELARK

**SEQ ID NO:23**

Invertasa de *Debaryomyces occidentalis*: n.º de acceso a Genbank X17604

MVQVLSVLVIPLLTFFGYVASSIDLSVDTSEYNRPLIHFTPEKGMNDPNGLFYDKTA  
 KLWHLFYQYNPNATAWGGPLYWGHATSNDLVHWDEHEIAIGPEHDNEGIFSGSIVVDH  
 NNTSGFFNSSIDPNQRIVAIYTNIPDLQTQDIAFSLDGGYTFTKYENNPVIDVSSNQFRDP  
 30 KVFVHERFKSMDHGCSEIARVKIQIFGSANLKNWVLNSNFSSGYGNQYGM SRLIEVPI  
 ENSDKSKWVMFLAINPGSPLGGSSINQYFVGDGDFGQFVPPDSQTRFVDIGKDFYAFQTF  
 EVEHGVLGLAWASNWQYADQVPTNPWRSSSTSLARNYTLRYVIQMLKLTANIDKSVLP  
 DSINVVDKLKKKNVKTNKKPIKTNFKGSTGLFDNFITFKVLNLNVSPGKTHFDILINSQE  
 LNSSVDSIKIGFDSSQSLFYIDRHIPNVEFPRKQFFTDKLAAYLEPLDYDQDLRVFSLYGIV  
 35 DKNIIELYFNDGTVAMTNTFFMGEKGYPHDIQIVTDTEEPLFELESVIIRELNK

**SEQ ID NO:24**

Invertasa de *Oryza sativa*: n.º de acceso a Genbank AF019113

MATSRTPAYDLKNAAAAVYTPLPEQPHSAEVEIRDRKPFKIISAIISSLLLLALILVAVN  
 YQAPPSHSSGDN SQPAAVMPPSRGVSQGVSEKAFRGASGAGNGVSAFWSNLMLSWQR  
 TSYHFQPVKNWMNDPNGLPLYKGYWYHLFYQYNPDSAVWGNITWGHAVSTDLINWLH  
 LPFAMVPDQWYDVNGVWTGSATILPDGRIVMLYTGDTDDYVQDQNLAFPANLSDPLL  
 45 VDWVKYPNNPVIYPPPGIGVKDFRDPTTAGTAGMQNGQRLVTIGSKVVGKTGISLVYETT  
 NFTTFKLLYGVLHAVPGTGMWECVDLYPVSTTGENGLDTSVNGLGVKHLVKTSLDDD  
 KHDYYALGTYDPVKNKWTPDNPDLVDGIGLRLDYGKYAARTFYDQNKQRRILWGW  
 GETDLEAVDLMKGWASLQAIPTIVFDKKTGTNVLQRPEEEVESWSSGDPITQRRIFEPG  
 SVVPIHVSGATQLDITASFEVDETLETTSESH DAGYDCSNSGGAGTRGSLGPFGLLVVA  
 50 DEKLSLTPVYLYVAKGGDGKAKAHLCA YQTRSSMASGVEKEVYGS AVPVLDGENYS

ARILIDHSIVESFAQAGRTCVRSRDYPTKDIYGAARCCFFFNATEASVRASLKAWQMKSF  
IRPYPFIPDQKS

**SEQ ID NO:25**

5 Invertasa de *Allium cepa*: n.º de acceso a Genbank AJ006067

MSSDDLESPPSSYLPIPPSDEFHDQPPPLRSWLRLLSIPLALMFLFLATFLSNLESPPSDSG  
LVSDPVTDFVNPAVVRRGKDAGVSDKTSVSDSGFVLDPVAVDANSVVVHRGKDAGVS  
DKTSGVDSGLLKDSPLGPYPWTNQMLSWQRTGFHFQPVKNWMNDPNGPLYKGYH  
10 FFYQYNPEGAVWGNIAWGHAVSRDLVHWTHLPLAMVPDQWYDINGVWTGSATILPD  
GQIVMLYTGATNESVQVQNLAVPADQSDTLRLRWWKKEANPILVPPPVGIGDKDFRDPTT  
AWYEPSDDTWRIVIGSKDSSHSGIAIVYSTKDFINYKLIPGILHAVERVGMWECVDFYYPV  
ATADSSHANHGLDPSARPSPAVKHVLKASMDDDRHDYIAIGTYDPAQNTWVPDDASV  
DVGIGLRYDWGKFYASKTFYDHAKKRILWSWIGETDSETADIAKGWASLQGVPRTVL  
15 LDVKTGSNLITWPVVEIESLRTRPRDFSGITVDAGSTFKLDVGGAAQLDIEAEFKISSEEL  
EAVKEADVSYNCSGGAAERGVLPFGLLVLANQDLTE  
QTATYFYVSRGMDGGLNTHFCQDEKRSSKASDIVKRIVGHSVPVLDGESFALRILVDHSI  
VESFAQGGRASATSRVYPTAEIYNNARVVFVFNATGAKVTAQSLKVWHMSTAINIYD  
PATSVM

20

**SEQ ID NO:26**

Invertasa de *Beta vulgaris subsp. vulgaris*: n.º de acceso a Genbank AJ278531

LFYQYNPNNGVIWGPVWGHSTSKDLVNWVPQPLTMEPEMAANINGSWSGSATILPGNK  
25 PAILFTGLDPKYEQVQVLAYPEKDTSDPNLKEWFLAPQNPVMFPTPQNQINATSFRDPTTA  
WRLPDGVWRLIGSKRGQRGLSLLFRSRDFVHWVQAKHPLYSDKLSGMWECPDFFPV  
YANGDQMGVDTSIIGSHVKHVLKNSLDITKHDIYTIGDYNIKKDAYTPDIGYMNDSCLR  
YDYGKYYASKTFFDDAKKERILLGWANESSVEDDIKKGWSGIHTIPRKIWLKLGKQL  
IQWPIANIEKLRQKPVNIYRKVLKGGSQIEVSGITAAQADVEISFKIKDLKNVEKFDASWT  
30 SPQLLCSKKGASVKGGLGPFGLLTLASXGLEEYTAFFRIFKAYDNKFVVMCSDQSRS  
SLNPTNDKTTYGTFFVDVNPVIREGLSLRVLIDHSVVESFGAKGKNVITARVYPTLAINEKA  
HLYVFNRGTSNVEITGLTAWSMKKANIA

**SEQ ID NO:27**

35 Beta-fructofuranosidasa (invertasa) de *Bifidobacterium breve UCC2003*: n.º de acceso a  
Genbank AAT28190

MTDFTPETPVLTPIRDHAAELAKAEAGVAEMAANKRNNRWYPKYHIASNGGWINDPNGL  
CFYKGRWHVIFYQLHPYGTQWGPMPHWGHVSSDMLNWKREPIMFAPSLEQEKDGVFS  
40 GSAVIDDNGDLRFYYTGHRWANGHDNTGGDWQVQMTALPDNDELTSATKQGMIDCP  
TDKVDHHRDPKVWKTGDTWYMTFGVSSDKRGQMWLFSSKDMVRWEYERVLVQFQ  
PDPDVFMLECPDFFPKDKDGNEKWWIGFSAMGSKPSGFMNRNVNAGYMIGTWEPPG  
EFKPETEFRLWDCGHNYAPQSFNVDGRQIVYGWMSPFVQPIPMEDDGWCGQLTLPRE  
ITLDDDDGDVVTAPVAEMEGLREDTLDHGSITLDMGDEQVIADDAEAVEIEMTIDLAAS  
45 ADRAGLKIATEDGAYTYVAYDDQIGRVVDRQAMANGDHGYRAAPLTDALASGK  
LDRVFDVDRGSVEVYVNGGHQVLSSYSYASEGPRAIKLVAEFGNLKVESLKLHHMKSIG  
LE

**SEQ ID NO:28**

Invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*: n.º de acceso a Genbank NP\_012104

5 MLLQAFLFLLAGFAAKISASMTNETSDRPLVHFTPNKGWMNDPNGLWYDEKDAKWHL  
 YFQYNPNDTVWGTPLFWGHATSDDLTNWEDQPIAIAPKRNDSGAFSGSMVVDYNNTS  
 10 GFFNDTIDPRQRCVAIWTYNTPESSEEQYISYSLDGGYTFTEYQKNPVLAANSTQFRDPKV  
 FWYEPSQKWIMTAAKSQDYKIEIYSSDDLKSWKLESAFANEGFLGYQYECPLIEVPTE  
 QDPSKSYWVMFISINPGAPAGGSFNQYFVGSFNNGTHFEAFDNQSRVVDVDFGKDYYALQTF  
 FNTDPTYGSALGIAWASNWEYSAFVPTNPWRSSMSLVRKFSLNTEYQANPETELINLKA  
 15 EPILNISNAGPWSRFATNTTLTKANSYNVDLSNSTGTLEFELVYAVNTTQTISKSVFADLS  
 LWFKGLEDPPEYLRMGFEVSASSFFLDRGNSKVKFKVKENPYFTNRMSVNNQPFKSEND  
 LSYYKVYGLLDQNILELYFNDGDVVSTNTYFMTTGNALGSVNMTTGVDNLFYIDKFQV  
 REVK

**SEQ ID NO:29**

15 Invertasa A de *Zymomonas mobilis*: n.º de acceso a Genbank AY171597

20 MESPSYKNLIKAEDAQKKAGKRLLSSEWYPGFHVTPLTGWMNDPNGLIFFKGEYHLFY  
 QYYPFAPVWGPMPHWHAKSRDLVHWETLPVALAPGDLFDRDGCFSGCAVDNNGVLT  
 LIYTGHIVLSNDSPDAIREVQCMATSIDGIHFQKEGIVLEKAPMPQVAHFRDPRVWKEND  
 25 HWFMVVGYRTDDEKHQGIGHVALYRSENKLDWIFVKTLGDNSQLPLGKRAFMWECF  
 DFFSLGNRSVLMFSPQGLKASGYKNRNLFQNGYILGKWQAPQFTPETSFQELDYGHDFY  
 AAQRFEAKDGRQILIAWFDMWENQKPSQRDGWAGCMTLPRKLDLIDNKIVMTPVREM  
 EILRQSEKIESVVTLSDAEHPFTMDSPLQEIELIFDLEKSSAYQAGLALRCNGKQETLLYI  
 30 DRSQNRILDRNRSGQNVKIRSCPLPNTSKVRLHIFLDRSSIEIFVGGDDQTQGLYSISRRIF  
 PDKDSLKGRLFAIEGYAVFDSFKRWTLQDANLAAFSSDAC

**SEQ ID NO:30**

Secuencia 5' de ADN donante de constructo de modificación dirigida por recombinación  
 homóloga para la desactivación de delta 12 FAD de *Prototheca moriformis*

30 GCTCTTCGGGTTTGCTCACCCGCGAGGTCGACGCCAGCATGGCTATCAAGACGAAC  
 AGGCAGCCTGTGGAGAAGCCTCCGTTACGATCGGGACGCTGCGCAAGGCCATCCC  
 CGCGCACTGTTTCGAGCGCTCGGCGCTTCGTAGCAGCATGTACCTGGCCTTTGACAT  
 35 CGCGGTCATGTCCCTGCTCTACGTCGCGTCGACGTACATCGACCCTGCGCCGGTGCC  
 TACGTGGGTCAAGTATGGCGTCATGTGGCCGCTCTACTGGTTCTTCCAGGTGTGTGT  
 GAGGGTTGTGGTTGCCCGTATCGAGGTCCTGGTGGCGCGCATGGGGGAGAAGGCGC  
 CTGTCCCGCTGACCCCCCGGCTACCCTCCCGGCACCTTCCAGGGCGCCTTCCGGCAC  
 40 GGGTGTCTGGGTGTGCGCGCACGAGTGCGGCCACCAGGCCTTTTCCTCCAGCCAGGC  
 CATCAACGACGGCGTGGGCCTGGTGTTCACAGCCTGCTGCTGGTGCCCTACTACTC  
 CTGGAAGCACTCGCACCAGCCGACCCTCCAACACGGGGTGCCTGGACAAGGACG  
 AGGTGTTTGTGCCGCGCACCCGCGCAGTGGCGCACGAGGGCCTGGAGTGGGAGGAG  
 TGGCTGCCCATCCGCATGGGCAAGGTGCTGGTCACCCTGACCCTGGGCTGGCCGCTG  
 45 TACCTCATGTTCAACGTCGCCTCGCGGCCGTACCCGCGCTTCGCCAACCCTTTGAC  
 CCGTGGTCCGCCATCTTCAGCAAGCGCGAGGTACCCTTTCTTGCGCTATGACACTTC  
 CAGCAAAGGTAGGGCGGGCTGCGAGACGGCTTCCCGGCGCTGCATGCAACACCGA  
 TGATGCTTCGACCCCCGAAGCTCCTTCGGGGCTGCATGGGCGCTCCGATGCCGCTC  
 CAGGGCGAGCGCTGTTTAAATAGCCAGGCCCCCGATTGCAAAGACATTATAGCGAG  
 CTACCAAAGCCATATTCAAACACCTAGATCACTACCACTTCTACACAGGCCACTCGA

GCTTGTGATCGCACTCCGCTAAGGGGGCGCCTCTTCTTCTTCGTTTCAGTCACAACCC  
GCAAACGGCGCGCC

**SEQ ID NO:31**

5 Secuencia 3' de ADN donante de constructo de modificación dirigida por recombinación  
homóloga para la desactivación de delta 12 FAD de *Prototheca moriformis*

CAATTGGCAGCAGCAGCTCGGATAGTATCGACACACTCTGGACGCTGGTCGTGTGAT  
GGACTGTTGCCGCCACACTTGCTGCCTTGACCTGTGAATATCCCTGCCGCTTTTATCA  
10 AACAGCCTCAGTGTGTTTGTATCTTGTGTGTACGCGCTTTTGCAGTTGCTAGCTGCTT  
GTGCTATTTGCGAATACCACCCCAGCATCCCCTTCCCTCGTTTCATATCGCTTGCAT  
CCCAACCGCAACTTATCTACGCTGTCTGCTATCCCTCAGCGCTGCTCCTGCTCCTGC  
TCACTGCCCTCGCACAGCCTTGGTTTGGGCTCCGCCTGTATTCTCCTGGTACTGCAA  
CCTGTAAACCAGCACTGCAATGCTGATGCACGGGAAGTAGTGGGATGGGAACACAA  
15 ATGGAGCATCGAGGTGGTCATCTCCGACCTCGCGTTGGTGGCGGTGCTCAGCGGGCT  
CAGCGTGCTGGGCCGCACCATGGGCTGGGCCTGGCTGGTCAAGACCTACGTGGTGC  
CCTACATGATCGTGAACATGTGGCTGGTGTCTATCACGCTGCTCCAGCACACGCACC  
CGGCCCTGCCGCACTACTTCGAGAAGGACTGGGACTGGCTACGCGGCCGCCATGGCC  
ACCGTCGACCGCTCCATGGGCCCGCCCTTCATGGACAGCATCCTGCACCACATCTCC  
20 GACACCCACGTGCTGCACCACCTCTCAGCACCATCCCGCACTACCACGCCGAGGAG  
GCCTCCGCCGCCATCCGGCCCATCCTGGGCAAGTACTACCAATCCGACAGCCGCTGG  
GTCGGCCGCGCCCTGTGGGAGGACTGGCGGCGACTGCCGCTACGTTCGTCGCCGACGC  
GCCCGAGGACGACTCCGCGCTCTGGTTCCACAAGTGAGCGCGCCTGCGCGAGGACG  
CAGAACAACGCTGCCGCCGTGTCTTTTGCACGCGCGACTCCGGCGCTTCGCTGGTGG  
25 CACCCCATAAAGAAACCCTCAATTCTGTTTGTGGAAGACACGGTGTACCCCAACC  
ACCCACCTGCACCTCTATTATTGGTATTATTGACGCGGGAGTGGGCGTGTGTACCTA  
CAACGTAGCTTCTCTAGTTTTTCAGCTGGCTCCCACCATTTGTAAGAGCCTCTAGAGT  
CGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAA  
ATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATAACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTA  
30 GCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCC  
GCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCG  
GGGAGAGGCGGTTTGCATATTGGGCGCTCTTCC

**SEQ ID NO:32**

35 Constructo de modificación dirigida por recombinación homóloga para la desactivación de delta  
12 FAD de *Prototheca moriformis*

GCTCTTCGGGTTTGTCAACCCGCGAGGTCGACGCCCAGCATGGCTATCAAGACGAAC  
AGGCAGCCTGTGGAGAAGCCTCCGTTACGATCGGGACGCTGCGCAAGGCCATCCC  
40 CGCGCACTGTTTCGAGCGCTCGGCCGCTTCGTAGCAGCATGTACCTGGCCTTTGACAT  
CGCGGTCATGTCCCTGCTCTACGTCGCGTCGACGTACATCGACCCTGCGCCGGTGCC  
TACGTGGGTCAAGTATGGCGTCATGTGGCCGCTCTACTGGTTCTTCCAGGTGTGTGT  
GAGGGTTGTGGTTGCCCGTATCGAGGTCCTGGTGGCGCGCATGGGGGAGAAGGCGC  
CTGTCCCGCTGACCCCCCGGCTACCCTCCCGGCACCTTCCAGGGCGCCTTCGGCAC  
45 GGGTGTCTGGGTGTGCGCGCACGAGTGCGGCCACCAGGCCTTTTCTCCAGCCAGGC  
CATCAACGACGGCGTGGGCCTGGTGTTCACAGCCTGCTGCTGGTGCCCTACTACTC  
CTGGAAGCACTCGCACCGCCGCCACCACTCCAACACGGGGTGCCTGGACAAGGACG  
AGGTGTTTGTGCCGCCGACCCGCGCAGTGGCGCACGAGGGCCTGGAGTGGGAGGAG  
TGGCTGCCCATCCGCATGGGCAAGGTGCTGGTCACCCTGACCCTGGGCTGGCCGCTG

TACCTCATGTTCAACGTCGCCTCGCGGCCGTACCCGCGCTTCGCCAACCACCTTTGAC  
 CCGTGGTCGCCCATCTTCAGCAAGCGCGAGGTACCCTTTCTTGCGCTATGACACTTC  
 CAGCAAAAGGTAGGGCGGGCTGCGAGACGGCTTCCCGGCGCTGCATGCAACACCGA  
 TGATGCTTCGACCCCCGAAGCTCCTTCGGGGCTGCATGGGCGCTCCGATGCCGCTC  
 5 CAGGGCGAGCGCTGTTTAAATAGCCAGGCCCCCGATTGCAAAGACATTATAGCGAG  
 CTACCAAAGCCATATTCAAACACCTAGATCACTACCACTTCTACACAGGCCACTCGA  
 GCTTGTGATCGCACTCCGCTAAGGGGGCGCCTCTTCTCTTCGTTTCAGTCACAACCC  
 GCAAACGGCGCGCCATGCTGCTGCAGGCCTTCTGTTCTGCTGGCCGGCTTCGCCG  
 CCAAGATCAGCGCCTCCATGACGAACGAGACGTCCGACCGCCCCCTGGTGCCTTC  
 10 ACCCCCAACAAGGGCTGGATGAACGACCCCAACGGCCTGTGGTACGACGAGAAGGA  
 CGCCAAGTGGCACCTGTACTTCCAGTACAACCCGAACGACACCGTCTGGGGGACGC  
 CCTTGTCTGGGGCCACGCCACGTCCGACGACCTGACCAACTGGGAGGACCAGCCC  
 ATCGCCATCGCCCCGAAGCGCAACGACTCCGGCGCCTTCTCCGGCTCCATGGTGGTG  
 GACTACAACAACACCTCCGGCTTCTTCAACGACACCATCGACCCGCGCCAGCGCTGC  
 15 GTGGCCATCTGGACCTACAACACCCCGGAGTCCGAGGAGCAGTACATCTCCTACAG  
 CCTGGACGGCGGCTACACCTTACCGAGTACCAGAAGAACCCCGTGTGGCCGCCA  
 ACTCCACCCAGTTCGCGGACCCGAAGGTCTTCTGGTACGAGCCCTCCAGAAGTGA  
 TCATGACCCGCGGCCAAGTCCCAGGACTACAAGATCGAGATCTACTCCTCCGACGAC  
 CTGAAGTCTTGAAGCTGGAGTCCGCGTTCGCCAACGAGGGCTTCTCGGCTACCAG  
 20 TACGAGTGCCCCGGCCTGATCGAGGTCCCCACCGAGCAGGACCCAGCAAGTCTTA  
 CTGGGTGATGTTTCACTCCATCAACCCCGGCGCCCCGGCCGGCGGCTCCTTCAACCA  
 GACTTCGTCGGCAGCTTCAACGGCACCCACTTCGAGGCCTTCGACAACCAGTCCCG  
 CGTGGTGGACTTCGGCAAGGACTACTACGCCCTGCAGACCTTCTTCAACACCGACCC  
 GACCTACGGGAGCGCCCTGGGCATCGCGTGGGCCTCCAACCTGGGAGTACTCCGCCTT  
 25 CGTGCCACCAACCCCTGGCGCTCCTCCATGTCCCTCGTGCGCAAGTTCTCCCTCAA  
 CACCGAGTACCAGGCCAACCCGGAGACGGAGCTGATCAACCTGAAGGCCGAGCCGA  
 TCCTGAACATCAGCAACGCCGGCCCTGGAGCCGGTTCGCCACCAACACCACGTTG  
 ACGAAGGCCAACAGCTACAACGTCGACCTGTCCAACAGCACCCGGCACCCCTGGAGTT  
 CGAGCTGGTGTACGCCGTCAACACCACCCAGACGATCTCCAAGTCCGTGTTTCGCGGA  
 30 CCTCTCCCTCTGGTTCAAGGGCCTGGAGGACCCCGAGGAGTACCTCCGCATGGGCTT  
 CGAGGTGTCCGCGTCCCTTCTTCTTCTGGACCCGCGGGAACAGCAAGGTGAAGTTCGT  
 GAAGGAGAACCCCTACTTCACCAACCGCATGAGCGTGAACAACCAGCCCTTCAAGA  
 GCGAGAACGACCTGTCTACTACAAGGTGTACGGCTTGCTGGACCAGAACATCCTG  
 GAGCTGTACTTCAACGACGGCGACGTCGTGTCCACCAACACCTACTTCATGACCACC  
 35 GGAACGCCCTGGGCTCCGTGAACATGACGACGGGGGTGGACAACCTGTTCTACAT  
 CGACAAGTTCAGGTGCGCGAGGTCAAGTGACAATTGGCAGCAGCAGCTCGGATAG  
 TATCGACACACTCTGGACGCTGGTTCGTGTGATGGACTGTTGCCGCCACACTTGCTGC  
 CTTGACCTGTGAATATCCCTGCCGCTTTTATCAAACAGCCTCAGTGTGTTTGATCTTG  
 TGTGTACGCGCTTTTTCGAGTTGCTAGCTGCTTGTGCTATTTGCGAATACCACCCCA  
 40 GCATCCCCTTCCCTCGTTTCATATCGCTTGCATCCCAACCGCAACTTATCTACGCTGT  
 CCTGCTATCCCTCAGCGCTGCTCCTGCTCCTGCTCACTGCCCTCGCACAGCCTTGGT  
 TTGGGCTCCGCCTGTATTCTCCTGGTACTGCAACCTGTAAACCAGCACTGCAATGCT  
 GATGCACGGGAAGTAGTGGGATGGGAACACAAATGGAGCATCGAGGTGGTCATCTC  
 CGACCTCGCGTTGGTGGCGGTGCTCAGCGGGCTCAGCGTGCTGGGCCGACCATGG  
 45 GCTGGGCCTGGCTGGTCAAGACCTACGTGGTGCCCTACATGATCGTGAACATGTGGC  
 TGGTGTCTATCACGCTGCTCCAGCACACGCACCCGGCCCTGCCGCACTACTTCGAGA  
 AGGACTGGGACTGGCTACGCGGGCCATGGCCACCGTCGACCGCTCCATGGGCCCG  
 CCCTTCATGGACAGCATCCTGCACCACATCTCCGACACCCACGTGCTGCACCACCTC  
 TTCAGCACCATCCCGCACTACCACGCCGAGGAGGCCTCCGCCGCCATCCGGCCCATC

CTGGGCAAGTACTACCAATCCGACAGCCGCTGGGTCGGCCGCGCCCTGTGGGAGGA  
 CTGGCGGACTGCCGCTACGTTCGTCGCCCCGACGCGCCCGAGGACGACTCCGCGCTCTG  
 GTTCCACAAGTGAGCGCGCCTGCGCGAGGACGCAGAACAAACGCTGCCGCCGTGTCT  
 TTTGCACGCGCGACTCCGGCGCTTCGCTGGTGGCACCCCCATAAAGAAACCCTCAAT  
 5 TCTGTTTGTGGAAGACACGGTGTACCCCCACCCACCCACCTGCACCTCTATTATTGG  
 TATTATTGACGCGGGAGTGGGCGTTGTACCCTACAACGTAGCTTCTCTAGTTTTTCAG  
 CTGGCTCCCACCATTGTAAAGAGCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGG  
 CGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACA  
 CAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCT  
 10 AACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGAAACCTGTTCGT  
 GCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCCTATTGGG  
 CGCTCTTCC

**SEQ ID NO:33**

15 Secuencia 5' de ADN donante de constructo de modificación dirigida por recombinación  
 homóloga para la desactivación de SAD2A de *Prototheca moriformis*

GCTCTTCCGCCTGGAGCTGGTGCAGAGCATGGGTCAGTTTGC GGAGGAGAGGGTGC  
 TCCCCGTGCTGCACCCCGTGGACAAGCTGTGGCAGCCGCAGGACTTCCCTGCCCGACC  
 20 CCGAGTCGCCGACTTCGAGGACCAGGTGGC GGAGCTGCGCGCGCGCGCCAAGGAC  
 CTGCCCCGACGAGTACTTTGTGGTGTGTTGGGCGACATGATCACGGAGGAGGCGCT  
 GCCGACCTACATGGCCATGCTCAACACCTTGGACGGTGTGCGCGACGACACGGGCG  
 CGGCTGACCACCCGTGGGCGCGCTGGACGCGGCAGTGGGTGGCCGAGGAGAACCGG  
 CACGGCGACCTGCTGAACAAGTACTGTTGGCTGACGGGGCGCGTCAACATGCGGGC  
 25 CGTGGAGGTGACCATCAACAACCTGATCAAGAGCGGCATGAACCCGCAGACGGACA  
 ACAACCCTTACTTGGGCTTCGTCTACACCTCCTTCCAGGAGCGCGCCACCAAGTAGG  
 TACC

**SEQ ID NO:34**

30 Secuencia 3' de ADN donante de constructo de modificación dirigida por recombinación  
 homóloga para la desactivación de SAD2A de *Prototheca moriformis*

CAATTGGCAGCAGCAGCTCGGATAGTATCGACACACTCTGGACGCTGGTTCGTGTGAT  
 GGACTGTTGCCGCCACACTTGCTGCCTTGACCTGTGAATATCCCTGCCGCTTTTATCA  
 35 AACAGCCTCAGTGTGTTTGTATCTTGTGTGTACGCGCTTTTGCAGATTGCTAGCTGCTT  
 GTGCTATTTGCGAATACCACCCCGAGCATCCCTTCCCTCGTTTCATATCGCTTGCAT  
 CCAACCGCAACTTATCTACGCTGTCTGCTATCCCTCAGCGCTGCTCCTGCTCCTGC  
 TCACTGCCCTCGCACAGCCTTGGTTTGGGCTCCGCCTGTATTCTCCTGGTACTGCAA  
 CCTGTAAACCAGCACTGCAATGCTGATGCACGGGAAGTAGTGGGATGGGAACACAA  
 40 ATGGAAGGATCGTAGAGCTCCAGCCACGGCAACACCGCGCGCCTGGCGGCCGAGCA  
 CGGCGACAAGGGCCTGAGCAAGATCTGCGGGCTGATCGCCAGCGACGAGGGCCGGC  
 ACGAGATCGCCTACACGCGCATCGTGGACGAGTTCTTCCGCCTCGACCCCGAGGGC  
 GCCGTGCGCCGCTACGCCAACATGATGCGCAAGCAGATCACCATGCCCGCGCACCT  
 CATGGACGACATGGGCCACGGCGAGGCCAACCCGGGCCGCAACCTCTTCGCCGACT  
 45 TCTCCGCCGTCGCCGAGAAGATCGACGTCTACGACGCCGAGGACTACTGCCGCATCC  
 TGGAGCACCTCAACGCGCGCTGGAAGGTGGACGAGCGCCAGGTCAGCGGCCAGGCC  
 GCCGCGGACCAGGAGTACGTTCTGGGCCTGCCCCAGCGCTTCCGGAAACTCGCCGA  
 GAAGACCGCCGCCAAGCGCAAGCGCGTCGCGCGCAGGCCCGTGCCTTCTCCTGGA  
 GAGAAGAGCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCA

TAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCC  
 GGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAAT  
 TCGGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTA  
 ATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCC

5

**SEQ ID NO:35**

Constructo de modificación dirigida por recombinación homóloga para la desactivación de  
 SAD2A de *Prototheca moriformis*

10 GCTCTTCCGCCTGGAGCTGGTGCAGAGCATGGGTGTCAGTTTTCGGGAGGAGAGGGTGC  
 TCCCCGTGCTGCACCCCGTGGACAAGCTGTGGCAGCCGCAGGACTTCCCTGCCCGACC  
 CCGAGTCGCCCCGACTTCGAGGACCAGGTGGCGGAGCTGCGCGCGCGCCAAGGAC  
 CTGCCCGACGAGTACTTTGTGGTGTGGTGGGCGACATGATCACGGAGGAGGCGCT  
 GCCGACCTACATGGCCATGCTCAACACCTTGGACGGTGTGCGCGACGACACGGGCG  
 15 CGGCTGACCACCCGTGGGCGCGCTGGACGCGGCAGTGGGTGGCCGAGGAGAACCGG  
 CACGGCGACCTGCTGAACAAGTACTGTTGGCTGACGGGGCGCGTCAACATGCGGGC  
 CGTGGAGGTGACCATCAACAACCTGATCAAGAGCGGCATGAACCCGCAGACGGACA  
 ACAACCCTTACTTGGGCTTCGTCTACACCTCCTTCCAGGAGCGCGCCACCAAGTAGG  
 TACCCTTTCTTTCGCTATGACACTTCCAGCAAAGGTAGGGCGGGCTGCGAGACGGC  
 20 TTCCCGGCGCTGCATGCAACACCGATGATGCTTTCGACCCCCGAAGCTCCTTCGGGG  
 CTGCATGGGCGCTCCGATGCCGCTCCAGGGCGAGCGCTGTTTAAATAGCCAGGCCCC  
 CGATTGCAAAGACATTATAGCGAGCTACCAAAGCCATATTCAAACACCTAGATCAC  
 TACCACTTCTACACAGGCCACTCGAGCTTGTGATCGCACTCCGCTAAGGGGGCGCCT  
 CTTCCTCTTCGTTTCAGTCACAACCCGCAAACGGGCGCGCCATGCTGCTGCAGGCCTT  
 25 CCTGTTCTGCTGGCCGGCTTCGCCGCAAGATCAGCGCCTCCATGACGAACGAGAC  
 GTCCGACCGCCCCCTGGTGCACCTTACCCCCAACAAAGGGCTGGATGAACGACCCCA  
 ACGGCCTGTGGTACGACGAGAAGGACGCCAAGTGGCACCTGTACTTCCAGTACAAC  
 CCGAACGACACCGTCTGGGGGACGCCCTTGTTCGTTGGGGCCACGCCACGTCCGACGA  
 CCTGACCAACTGGGAGGACCAGCCATCGCCATCGCCCCGAAGCGCAACGACTCCG  
 30 GCGCCTTCTCCGGCTCCATGGTGGTGGACTACAACAACACCTCCGGCTTCTTCAACG  
 ACACCATCGACCCGCGCCAGCGCTGCGTGGCCATCTGGACCTACAACACCCCGGAG  
 TCCGAGGAGCAGTACATCTCCTACAGCCTGGACGGCGGCTACACCTTACCGAGTAC  
 CAGAAGAACCCCGTGTGGCCGCAACTCCACCCAGTTCCGCGACCCGAAGGTCTTC  
 TGGTACGAGCCCTCCAGAAGTGGATCATGACCGCGGCCAAGTCCAGGACTACAA  
 35 GATCGAGATCTACTCCTCCGACGACCTGAAGTCCTGGAAGCTGGAGTCCGCGTTTCG  
 CAACGAGGGCTTCCCTCGGCTACCAGTACGAGTGCCCCGGCCTGATCGAGGTCCCCAC  
 CGAGCAGGACCCAGCAAGTCTACTGGGTGATGTTTCATCTCCATCAACCCCGGCGC  
 CCCGGCCGGCGGCTCCTTCAACCAGTACTTCGTGCGCAGCTTCAACGGCACCCACTT  
 CGAGGCCTTCGACAACCAGTCCCAGCTGGTGGACTTCGGCAAGGACTACTACGCCCT  
 40 GCAGACCTTCTTCAACACCGACCCGACCTACGGGAGCGCCCTGGGCATCGCGTGGG  
 CCTCCAACCTGGGAGTACTCCGCCTTCGTGCCACCAACCCCTGGCGCTCCTCCATGT  
 CCCTCGTGCGCAAGTTCTCCCTCAACACCGAGTACCAGGCCAACCCGGAGACGGAG  
 CTGATCAACCTGAAGGCCGAGCCGATCCTGAACATCAGCAACGCCGGCCCCCTGGAG  
 CCGGTTCCGCCACCAACACCACGTTGACGAAGGCCAACAGCTACAACGTCGACCTGT  
 45 CCAACAGCACCGGCACCCTGGAGTTCGAGCTGGTGTACGCCGTC AACACCACCCAG  
 ACGATCTCCAAGTCCGTGTTTCGCGGACCTCTCCCTCTGGTTCAAGGGCCTGGAGGAC  
 CCCGAGGAGTACCTCCGCATGGGCTTCGAGGTGTCCGCGTCTCCTTCTTCTGGAC  
 CGCGGGAACAGCAAGGTGAAGTTCGTGAAGGAGAACCCCTACTTCAACCAACCGCAT  
 GAGCGTGAACAACCAGCCCTTCAAGAGCGAGAACGACCTGTCTACTACAAGGTGT

ACGGCTTGCTGGACCAGAACATCCTGGAGCTGTACTTCAACGACGGCGACGTCGTGT  
 CCACCAACACCTACTTCATGACCACCGGGAACGCCCTGGGCTCCGTGAACATGACG  
 ACGGGGGTGGACAACCTGTTCTACATCGACAAGTTCCAGGTGCGCGAGGTCAAGTG  
 ACAATTGGCAGCAGCAGCTCGGATAGTATCGACACACTCTGGACGCTGGTTCGTGTG  
 5 ATGGACTGTTGCCGCCACACTTGTGCCTTGACCTGTGAATATCCCTGCCGCTTTTAT  
 CAAACAGCCTCAGTGTGTTTGATCTTGTGTGTACGCGCTTTTGGCGAGTTGCTAGCTGC  
 TTGTGCTATTTGCGAATAACCACCCCCAGCATCCCCTTCCCTCGTTTCATATCGCTTGC  
 ATCCCAACCGCAACTTATCTACGCTGTCCTGCTATCCCTCAGCGCTGCTCCTGCTCCT  
 GCTCACTGCCCTCGCACAGCCTTGGTTTGGGCTCCGCCTGTATTCTCCTGGTACTGC  
 10 AACCTGTAAACCAGCACTGCAATGCTGATGCACGGGAAGTAGTGGGATGGGAACAC  
 AAATGGAAGGATCGTAGAGCTCCAGCCACGGCAACACCGCGCGCCTGGCGGCCGAG  
 CACGGCGACAAGGGCCTGAGCAAGATCTGCGGGCTGATCGCCAGCGACGAGGGCCG  
 GCACGAGATCGCCTACACGCGCATCGTGGACGAGTTCTTCCGCCTCGACCCCGAGG  
 GCGCCGTCGCCGCCTACGCCAACATGATGCGCAAGCAGATCACCATGCCCGCGCAC  
 15 CTCATGGACGACATGGGCCACGGCGAGGCCAACCCGGGCCGCAACCTCTTCGCCGA  
 CTTCTCCGCCGTCGCCGAGAAGATCGACGTCTACGACGCCGAGGACTACTGCCGCAT  
 CCTGGAGCACCTCAACGCGCGCTGGAAGGTGGACGAGCGCCAGGTCAGCGGCCAGG  
 CCGCCGCGGACCAGGAGTACGTTCTGGGCCTGCCCCAGCGCTTCCGGAAACTCGCC  
 GAGAAGACCGCCGCCAAGCGCAAGCGCGTGC GCGCAGGCCCGTCGCCTTCTCCTG  
 20 GAGAGAAGAGCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCGTAATCATGGT  
 CATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAAATCCACACAACATACGAG  
 CCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTA  
 ATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCAT  
 TAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCC

25

**SEQ ID NO:36**

Secuencia 5' de ADN donante de constructo de modificación dirigida por recombinación homóloga para la desactivación de SAD2B de *Prototheca moriformis*

GCTCTTCCCGCCTGGAGCTGGTGCAGAGCATGGGGCAGTTTGC GGAGGAGAGGGTG  
 CTCCCCGTGCTGCACCCCGTGGACAAGCTGTGGCAGCCGCAGGACTTCCTGCCCGAC  
 CCCGAGTCGCCCGACTTCGAGGACCAGGTGGCGGAGCTGCGCGCGCGCCAAAGGA  
 CCTGCCCGACGAGTACTTTGTGGTGTGTTGGGCGACATGATCACGGAGGAGGCGC  
 TGCCGACCTACATGGCCATGCTCAACACCTTGGACGGTGTGCGCGACGACACGGGC  
 35 GCGGCTGACCACCCGTGGGCGCGCTGGACGCGGCAGTGGGTGGCCGAGGAGAACCG  
 GCACGGCGACCTGCTGAACAAGTACTGTTGGCTGACGGGGCGCGTCAACATGCGGG  
 CCGTGGAGGTGACCATCAACAACCTGATCAAGAGCGGCATGAACCCGCAGACGGAC  
 AACAACCCTTACTTGGGCTTCGTCTACACCTCCTTCCAGGAGCGCGCCACCAAGTAG  
 GTACC

40

**SEQ ID NO:37**

Secuencia 3' de ADN donante de constructo de modificación dirigida por recombinación homóloga para la desactivación de SAD2B de *Prototheca moriformis*

CAGCCACGGCAACACCGCGCGCCTTGC GGCCGAGCACGGCGACAAGAACCTGAGCA  
 AGATCTGCGGGCTGATCGCCAGCGACGAGGGCCGGCACGAGATCGCCTACACGCGC  
 ATCGTGGACGAGTTCTTCCGCCTCGACCCCGAGGGCGCCGTCGCCGCCTACGCCAAC  
 ATGATGCGCAAGCAGATCACCATGCCCGCGCACCTCATGGACGACATGGGCCACGG  
 CGAGGCCAACCCGGGCCGCAACCTCTTCGCCGACTTCTCCGCGGTTCGCCGAGAAGA

TCGACGTCTACGACGCCGAGGACTACTGCCGCATCCTGGAGCACCTCAACGCGCGCT  
 GGAAGGTGGACGAGCGCCAGGTCAGCGGCCAGGCCGCCGCGGACCAGGAGTACGT  
 CCTGGGCCTGCCCCAGCGCTTCCGGAAACTCGCCGAGAAGACCGCCGCCAAGCGCA  
 AGCGCGTCGCGCGCAGGCCCGTTCGCCTTCTCCTGGAGAAGAGCCTCTAGAGTCGAC  
 5 CTGCAGGCATGCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTG  
 TTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCT  
 GGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTT  
 TCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGG  
 AGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCC

10

**SEQ ID NO:38**

Construeto de modificación dirigida por recombinación homóloga para la desactivación de  
 SAD2B de *Prototheca moriformis*

15 GCTCTTCCCGCCTGGAGCTGGTGCAGAGCATGGGGCAGTTTGC GGAGGAGAGGGTG  
 CTCCCCGTGCTGCACCCCGTGGACAAGCTGTGGCAGCCGCAGGACTTCCTGCCCGAC  
 CCCGAGTCGCCCGACTTCGAGGACCAGGTGGCGGAGCTGCGCGCGCGCCAAGGA  
 CCTGCCCGACGAGTACTTTGTGGTGTGGTGGGGCAGATGATCACGGAGGAGGGCGC  
 TGCCGACCTACATGGCCATGCTCAACACCTTGGACGGTGTGCGCGACGACACGGGC  
 20 GCGGCTGACCACCCGTGGGCGCGCTGGACGCGGCAGTGGGTGGCCGAGGAGAACCG  
 GCACGGCGACCTGCTGAACAAGTACTGTTGGCTGACGGGGCGCGTCAACATGCGGG  
 CCGTGGAGGTGACCATCAACAACCTGATCAAGAGCGGCATGAACCCGCAGACGGAC  
 AACAACCCTTACTTGGGCTTCGTCTACACCTCCTTCCAGGAGCGCGCCACCAAGTAG  
 GTACCCTTTCTTGCCTATGACACTTCCAGCAAAGGTAGGGCGGGCTGCGAGACG  
 25 GCTTCCCGGCGCTGCATGCAACACCGATGATGCTTCGACCCCCGAAGCTCCTTCGG  
 GGCTGCATGGGCGCTCCGATGCCGCTCCAGGGCGAGCGCTGTTTAAATAGCCAGGC  
 CCCCATTGCAAAGACATTATAGCGAGCTACCAAAGCCATATTCAAACACCTAGAT  
 CACTACCACTTCTACACAGGCCACTCGAGCTTGTGATCGCACTCCGCTAAGGGGGCG  
 CCTCTTCTCTTCGTTTCAGTCACAACCCGCAAACGGCGCGCCATGCTGCTGCAGGC  
 30 CTTCCTGTTCTGCTGGCCGGCTTCGCCGCAAGATCAGCGCCTCCATGACGAACGA  
 GACGTCCGACCGCCCCCTGGTGCACCTCACCCCCAACAAAGGGCTGGATGAACGACC  
 CCAACGGCCTGTGGTACGACGAGAAGGACGCCAAGTGGCACCTGTACTTCCAGTAC  
 AACCCGAACGACACCGTCTGGGGGACGCCCTTGTCTGGGGCCACGCCACGTCCGA  
 CGACCTGACCAACTGGGAGGACCAGCCATCGCCATCGCCCCGAAGCGCAACGACT  
 35 CCGGCGCCTTCTCCGGCTCCATGGTGGTGGACTACAACAACACCTCCGGCTTCTTCA  
 ACGACACCATCGACCCGCGCCAGCGCTGCGTGGCCATCTGGACCTACAACACCCCG  
 GAGTCCGAGGAGCAGTACATCTCCTACAGCCTGGACGGCGGCTACACCTTCACCGA  
 GTACCAGAAGAACCCCGTGTGCTGGCCGCCAACTCCACCCAGTTCCGCGACCCGAAGG  
 TCTTCTGGTACGAGCCCTCCCAGAAGTGGATCATGACCGCGGCCAAGTCCCAGGACT  
 40 ACAAGATCGAGATCTACTCCTCCGACGACCTGAAGTCTGGAAGCTGGAGTCCGCG  
 TTCGCCAACGAGGGCTTCCCTCGGCTACCAGTACGAGTGCCCCGGCCTGATCGAGGTC  
 CCCACCGAGCAGGACCCAGCAAGTCCTACTGGGTGATGTTTATCTCCATCAACCCC  
 GGCGCCCCGGCCGGCGGCTCCTTCAACCAGTACTTCGTCCGCGAGCTTCAACGGCACC  
 CACTTCGAGGCCTTCGACAACCAGTCCCGCGTGGTGGACTTCGGCAAGGACTACTAC  
 45 GCCCTGCAGACCTTCTTCAACACCGACCCGACCTACGGGAGCGCCCTGGGCATCGCG  
 TGGGCCTCCAACCTGGGAGTACTCCGCCTTCGTGCCACCAACCCCTGGCGCTCCTCC  
 ATGTCCCTCGTGCGCAAGTTCTCCCTCAACACCGAGTACCAGGCCAACCCGGAGACG  
 GAGCTGATCAACCTGAAGGCCGAGCCGATCCTGAACATCAGCAACGCCGGCCCCCTG  
 GAGCCGGTTCGCCACCAACACCACGTTGACGAAGGCCAACAGCTACAACGTCGACC

TGTCCAACAGCACCGGCACCCTGGAGTTCGAGCTGGTGTACGCCGTCAACACCACCC  
 AGACGATCTCCAAGTCCGTGTTTCGCGGACCTCTCCCTCTGGTTCAAGGGCCTGGAGG  
 ACCCCGAGGAGTACCTCCGCATGGGCTTCGAGGTGTCCGCGTCCTCCTTCTCCTGG  
 ACCGCGGGAACAGCAAGGTGAAGTTCGTGAAGGAGAACCCCTACTTCACCAACCGC  
 5 ATGAGCGTGAACAACCAGCCCTTCAAGAGCGAGAACGACCTGTCCTACTACAAGGT  
 GTACGGCTTGCTGGACCAGAACATCCTGGAGCTGTACTTCAACGACGGCGACGTCGT  
 GTCCACCAACACCTACTTCATGACCACCGGGAACGCCCTGGGCTCCGTGAACATGAC  
 GACGGGGGTGGACAACCTGTTCTACATCGACAAGTTCAGGTGCGCGAGGTCAAGT  
 GACAATTGGCAGCAGCAGCTCGGATAGTATCGACACACTCTGGACGCTGGTCGTGT  
 10 GATGGACTGTTGCCGCCACACTTGCTGCCTTGACCTGTGAATATCCCTGCCGCTTTTA  
 TCAAACAGCCTCAGTGTGTTTGATCTTGTGTGTACGCGCTTTTGGCAGTTGCTAGCTG  
 CTTGTGCTATTTGCGAATACCACCCCCAGCATCCCCTTCCCTCGTTTCATATCGCTTG  
 CATCCCAACCGCAACTTATCTACGCTGTCCTGCTATCCCTCAGCGCTGCTCCTGCTCC  
 TGCTCACTGCCCTCGCACAGCCTTGGTTTGGGCTCCGCCTGTATTCTCCTGGTACTG  
 15 CAACCTGTAAACCAGCACTGCAATGCTGATGCACGGGAAGTAGTGGGATGGGAACA  
 CAAATGGACAGCCACGGCAACACCGCGCGCCTTGCGGCCGAGCACGGCGACAAGA  
 ACCTGAGCAAGATCTGCGGGCTGATCGCCAGCGACGAGGGCCGGCACGAGATCGCC  
 TACACGCGCATCGTGGACGAGTTCCTCCGCCTCGACCCCGAGGGCGCCGTCGCCGCC  
 TACGCCAACATGATGCGCAAGCAGATCACCATGCCCGCGCACCTCATGGACGACAT  
 20 GGGCCACGGCGAGGCCAACCCGGGCCGCAACCTCTTCGCCGACTTCTCCGCGGTTCG  
 CCGAGAAGATCGACGTCTACGACGCCGAGGACTACTGCCGCATCCTGGAGCACCTC  
 AACGCGCGCTGGAAGGTGGACGAGCGCCAGGTCAGCGGCCAGGCCGCCGCGGACC  
 AGGAGTACGTCTGGGCTGCCCCAGCGCTTCCGGAAACTCGCCGAGAAGACCGCC  
 GCCAAGCGCAAGCGCGTCCGCGCGCAGGCCCGTCCGCTTCTCCTGGAGAAGAGCCTC  
 25 TAGAGTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTG  
 TGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGT  
 GTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCAC  
 TGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTGCTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAAC  
 GCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCC

30 **SEQ ID NO:39**  
 Cebador directo SZ5434

GTCCCTGCCCTTTGTACACAC

35 **SEQ ID NO:40**  
 Cebador inverso SZ5435

TTGATATGCTTAAGTTCAGCGGG

40 **SEQ ID NO:41**  
*Rhodotorula glutinis* DSMZ-DSM 70398 y *Lipomyces tetrasporus* CBS 5911

45 CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTCCGGATTGGCTATTGGG  
 AGCTCGCGAGAGCACCTGACTGCCGAGAAGTTGTACGAACTTGGTCATTTAGAGGA  
 AGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAGTGAA  
 TATTAGGGTGTCCAACCTTAACCTTGAGCCCCGACCCTCACTTTCTAACCCGTGTCATTT  
 GTCTTGGGTAGTAGCTTGCCTCAGCGAGCGAATCCCATTTCACTTACAAACACAAAG  
 TCTATGAATGTAACAATTTATAACAAAACAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGC

TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATT  
 CAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCATGGTATTCCGTGGAGCAT  
 GCCTGTTTGAGTGTGCATGAATTCTTCAACCCACCTCTTTCTTAGTGAATCAGGCGGTG  
 TTTGGATTCTGAGCGCTGCTGGCTTCGCGGCCTAGCTCGCTCGTAATGCATTAGCAT  
 5 CCGCAATCGAACTTCGGATTGACTCGGCGTAATAGACTATTCGTTGAGGATTCTGGT  
 CTCTGACTGGAGCCGGGTAAGGTTAAAGGGAGCTACTAATCCTCATGTCTATCTTGA  
 GATTAGACCTCAAATCAGGTAGGACTA

**SEQ ID NO:42**

10 *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis* CBS 3044 y *Lipomyces tetrasporus* CBS 8664

CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTCCGGATTGGCTATTGGG  
 AGCTCGCGAGAGCACCCGACTGCCGAGAAGTTGTACGAACTTGGTCATTTAGAGGA  
 AGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAGTGAA  
 15 TATTAGGGCGTCCAACCTTAACCTTGAGCCCGAACTCTCACTTTCTAACCCCTGTGCAT  
 CTGTTTCTGGTCAGTAGCTCTCTCGGGAGTGAACGCCATTCACTTAAAACACAAAGT  
 CTATGAATGTATAAAAATTTATAACAAAACAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCT  
 CTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTC  
 AGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCTCTGGTATTCCGGAGAGCATG  
 20 CCTGTTTGAGTGTGCATGAAATCTTCAACCCTCTCTTTTCTTAATGAATCGAGAGGTGC  
 TTGGATCCTGAGCGCTGCTGGCTTCGGCCTAGCTCGTTCGTAATGCATTAGCATCCG  
 CAATCGAACTTCGGATTGACTTGGCGTAATAGACTATTCGCTGAGGATTCTGGTCTC  
 GTACCAGAGCCGGGTTGGGTTAAAGGAAGCTTCTAATCCTAAAAGTCTAACTTTTGA  
 TTAGATCTCAAATCAGGTAGGACTA

25

**SEQ ID NO:43**

*Lipomyces tetrasporus* CBS 1808 y *Lipomyces tetrasporus* CBS 1810

CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTTCGGACTGGCTCCAGAA  
 30 AATGGGAAACCATTATCAGGAGCTGGAAAGTTGGTCAAACCTTGGTCATTTAGAGGA  
 AGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGAG  
 TATTTGTCTTTTAAAGACATCTCTCTATCCATAAACTCTTTTTTCTAAAAAGACATGA  
 TTTACACAATTAGTCTGAATGATTATATAAAAATCTTCAAAACTTTCAACAACGGAT  
 CTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCAAATGCGATAAGTATTGTGAATTG  
 35 CAGGATTTTGTGAATCATCGAATTTTGAACGCACATTGCACCTTCTGGTATTCCGG  
 AGGGTATACCTGTTTGAGCGTCATTTATATACTCAAACCTTTGTTTTGGTGATGGGC  
 ACATATCTGGTGAGAGCTAGATTTGCCTGAAATATAGTGGTAGAGATTGCTACGAGT  
 TATGCAAGTTAGCCAATGCTATTAAGTTAATTCGTTGGTGAAGCATGCGGAGCTTTA  
 40 GCGGTCGCCTTCCTTAACTATTGGAATTTTTCTAATTTTGACCTCAAATCAGGCAGGA  
 GTA

**SEQ ID NO:44**

*Lipomyces starkeyi* CBS 1809 y *Trichosporon montevidense* CBS 8261

45 CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGACCCTCGGATTGGCGTTAGGA  
 AGCCGGCAACGGCATCCTTTGGCCGAGAAGTTGGTCAAACCTTGGTCATTTAGAGGA  
 AGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAGTGAT  
 TGCCTTTATAGGCTTATAACTATATCCACTTACACCTGTGAACTGTTCTATTACTTGA  
 CGCAAGTCGAGTATTTTTACAAACAATGTGTAATGAACGTCGTTTTATTATAACAAA

ATAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAT  
 TGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAGC  
 TTGCGCTCTCTGGTATTCCGGAGAGCATGCCTGTTTCAGTGTGCATGAAATCTCAACC  
 ACTAGGGTTTCCTAATGGATTGGATTTGGGCGTCTGCGATCTCTGATCGCTCGCCTTA  
 5 AAAGAGTTAGCAAGTTTGACATTAATGTCTGGTGTAAATAAGTTTCACTGGGTCCATT  
 GTGTTGAAGCGTGCTTCTAATCGTCCGCAAGGACAATTACTTTGACTCTGGCCTGAA  
 ATCAGGTAGGACTA

**SEQ ID NO:45**

10 *Yarrowia lipolytica* CBS 6331

CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGTTTAGTGAGACCTTGGGAGGGCGAGATGA  
 GGGGGGCAACCCCTTTTGAACATCCAAACTTGGTCAAACCTTGATTATTTAGAGGAAG  
 TAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGATTTT  
 15 ATCTATTTCTGTGGATTTCTGGTATATTACAGCGTCATTTTATCTCAATTATAACTAT  
 CAACAACGGATCTCTGGCTCTCACATCGATGAAGAACGCAGCGAACC GCGATATTT  
 TTTGTGACTTGCAGATGTGAATCATCAATCTTTGAACGCACATTGCGCGGTATGGCA  
 TTCCGTACCGCACGGATGGAGGAGCGTGTTCCCTCTGGGATCGCATTGCTTTCTTGA  
 AATGGATTTTTTAAACTCTCAATTATTACGTCATTTACCTCCTTCATCCGAGATTA  
 20

**SEQ ID NO:46**

*Cryptococcus curvatus* CBS 5324, *Rhodotorula mucilaginosa* var. *mucilaginosa* CBS 316,  
*Cryptococcus curvatus* CBS 570, *Cryptococcus curvatus* CBS 2176, *Cryptococcus curvatus*  
 CBS 2744, *Cryptococcus curvatus* CBS 2754, *Cryptococcus curvatus* CBS 2829, *Cryptococcus*  
 25 *curvatus* CBS 5163 y *Cryptococcus curvatus* CBS 5358

CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGATTTCTGGATTGGCGTTAGGA  
 AGCCGGCAACGGCATCTTTGGCTGAGAAGTTACTCAAACCTTGGTCATTTAGAGGAA  
 GTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAGTGATTT  
 30 GCCTTCGGGCTAAACTATATCCATAACACCTGTGAACTGTTGATTGACTTCGGTCAA  
 TATTTTTACAAACATTGTGTAATGAACGTCATGTTATAATAACAAATATAACTTTCA  
 ACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTA  
 ATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAACTTGCCTCTCT  
 GGTATTCCGGAGAGCATGCCTGTTTGAGTGTGCATGAAATCTCAACCATTAGGGTTTC  
 35 TTAATGGCTTGGATTTGGACGTTTGCCAGTCAAATGGCTCGTCTTAAAAGAGTTAGT  
 GAATTTAACATTTGTCTTCTGGCGTAATAAGTTTCGCTGGGCTGATAGTGTGAAGTTT  
 GCTTCTAATCGTCCGCAAGGACAATTCTTGAACCTCTGGCCTCAAATCAGGTAGGACT  
 A

**SEQ ID NO:47**

40 *Trichosporon* sp. CBS 7617

CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGACCCTCGGATTGGCGTTAAGA  
 AGCCGGCAACGGCATCTTTGGCCGAGAAGTTGGTCAAACCTTGGTCATTTAGAGGA  
 45 AGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAGTGAA  
 TTGCTCTTTGAGCGTTAAACTATATCCATCTACACCTGTGAACTGTTGATTGACTTCG  
 GTCAATTAATTTTACAAACATTGTGTAATGAACGTCATGTTATTATAACAAAAATAA  
 CTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGAT  
 AAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAACTTGC

TCTCTGGTATTCCGGAGAGCATGCCTGTTTGAGTATCATGAAATCTCAACCATTAGG  
 GTTTCTTAATGGCTTGGATTTGGGCGCTGCCACTTGCCTGGCTCGCCTTAAAAGAGTT  
 AGCGTATTAACCTTGTCGATCTGGCGTAATAAGTTTCGCTGGTGTAGACTTGAGAAGT  
 GCGCTTCTAATCGTCCTCGGACAATTCTTGAACCTCTGGTCTCAAATCAGGTAGGACT

5 A

**SEQ ID NO:48**

*Sporobolomyces alborubescens* CBS 482

10 CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTCCGGATTGGCTATTGGG  
 AGCTCGCGAGAGCACCCGACTGCCGAGAAGTTGTACGAACTTGGTCATTTAGAGGA  
 AGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAGTGAA  
 TATAGGACGTCCAACCTTAACCTTGGAGTCCGAACTCTCACTTTCTAACCCCTGTGCACTT  
 GTTTGGGATAGTAACTCTCGCAAGAGAGCGAACTCCTATTCACCTATAAACACAAAG  
 15 TCTATGAATGTATTAATTTTATAACAAAATAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGG  
 CTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAAT  
 TCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCATGGTATTCCGTGGAGCA  
 TGCCTGTTTGAAGTGTATGAATACTTCAACCCTCCTCTTTCTTAATGATTGAAGAGGT  
 GTTTGGTTTCTGAGCGCTGCTGGCCTTTACGGTCTAGCTCGTTCGTAATGCATTAGCA  
 20 TCCGCAATCGAATTTCCGGATTGACTTGGCGTAATAGACTATTTCGCTGAGGAATTCTA  
 GTCTTCGGATTAGAGCCGGGTTGGGTAAAGGAAGCTTCTAATCAGAATGTCTACAT  
 TTAAAGATTAGATCTCAAATCAGGTAGGACTA

**SEQ ID NO:49**

25 *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis* CBS 324

CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTCCGGATTGGCTATTGGG  
 AGCTCGCGAGAGCACCCGACTGCCGAGAAGTTGTACGAACTTGGTCATTTAGAGGA  
 AGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAGTGAA  
 30 TCTAGGACGTCCAACCTTAACCTTGGAGTCCGAACTCTCACTTTCTAACCCCTGTGCATCT  
 GTTTTAAAATTGGCTAGTAGCTCTTCGGAGCGAACCACCATTTTTCACTTATACAAA  
 CACAAAGTCTATGAATGTAAACAAATTTATAACAAAACAAACTTTCAACAACGGA  
 TCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATT  
 GCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCCG  
 35 AGGAGCATGCCTGTTTGAAGTGTATGAATCTTCAACCCACCTCTTTCTTAGTGAAT  
 CTGGTGGTGCTTGGTTTCTGAGCGCTGCTCTGCTTCGGCTTAGCTCGTTCGTAATGCA  
 TTAGCATCCGCAACCGAACTTCCGGATTGACTTGGCGTAATAGACTATTTCGCTGAGG  
 ATTCCAGACTTGTCTGGAGCCGAGTTGGGTAAAGGAAGCTTCTAATCCTAAAGTC  
 TATTTTTTGATTAGATCTCAAATCAGGTAGGACTA

40

**SEQ ID NO:50**

*Rhodotorula glutinis* var. *glutinis* CBS 4476

45 CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGGCTCCGGATTGGCTTCTGGG  
 AGCCGGCAACGGCACCTAGTCGCTGAGAAGTTGGACGAACTTGGTCATTTAGAGGA  
 AGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAATGAA  
 ATGCAAGGACGCTCTTTTTAGAGGTCCGACCCAATTCATTTTCTCACACTGTGCACA  
 CACTACTTTTTACACCATTTTTAACACTTGAAGTCTAAGAATGTAAACAGTCTCTTAA  
 TTGAGCATAAAATTTAAACAAAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCCCATCGA

TGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCAT  
 CGAATCTTTGAACGCACCTTGCACCTTTGGTATTCCGAAGAGTATGTCTGTTTGAGT  
 GTCATGAAACTCTCAACCCCCCTGTTTTGTAATGAACCAGGCGTGGGCTTGGATTAT  
 GGCTGCTGCCGGCGTAATTGTGCGACTCGGCTGAAATACACGAGCTACCCATTCATA  
 5 AGAAATAGACGGTTTGACTCGGCGTAATAACATATTTTCGCTGAGGACGTCACATTCT  
 TTACCTAGTGGTGCTTCTAATGCGACATCTAACTTTAAGCTTTAGACCTCAAATCA  
 GTCAGGACTA

**SEQ ID NO:51**

10 *Trichosporon behrend* CBS 5581

CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGACCCTCGGATTGGCGTTAGGA  
 AGCCGGCAACGGCATCCTTTGGCCGAGAAGTTGGTCAAACCTGGTCATTTAGAGGA  
 AGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAGTGAT  
 15 TGCCTTCATAGGCTTAAACTATATCCACATACACCTGTGAACTGTTCCACCACTTGA  
 CGCAAGTCGAGTGTTTTACAAACAATGTGTAATGAACGTCGTTTTATTATAACAAA  
 AATAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAT  
 TGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAGC  
 TTGCGCTCTCTGGTATTCCGGAGAGCATGCCTGTTTCAGTGTGTCATGAAATCTCAACC  
 20 ACTAGGGTTTCCTAATGGATTGGATTTGGGCGTCTGCGATCTCTGATCGCTCGCCTTA  
 AAAGAGTTAGCAAGTTTGACATTAATGTCTGGTGTAAATAAGTTTCACTGGGTCCATT  
 GTGTTGAAGCGTGCTTCTAATCGTCCGCAAGGACAATTACTTTGACTCTGGCCTGAA  
 ATCAGGTAGGACTA

**SEQ ID NO:52**

25 *Geotrichum histeridarum* CBS 9892

CGCCCGTCGCTACTACCGATCGAATGGCTTAGTGAGGCTTCCGGATTGATTTGGGAG  
 AGAGGGCGACTTTTTTCTGGAACGAGAAGCTAGTCAAACCTGGTCATTTAGAGGA  
 30 AGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAGAAAA  
 ATGCGATATTAGTGGTTTATTTTGCTCGCCGAAAGGCAAACCTTTTAACATACCTACC  
 TTTTTTAACTATAAAAACCTTTTAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGA  
 ACGCAGCGAATTGCGATACGTTTTGTGAATTGCAGAAGTGAATCATCAATCTTTGAA  
 CGCACATTGCGCCTGGTGGTATTCCGCCAGGCATACCTGTTTGAGCGTTGTTCTCTCT  
 35 GGGATTGTCTACTTTCCTCAAAGAAATTAACAACAAGTTTGACACAACACCTCAA  
 CCTCAGATCAGGTAGGACTA

**SEQ ID NO:53**

40 *Rhodotorula aurantiaca* CBS 8411 y *Cryptococcus curvatus* CBS 8126

CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTTCGGATTGGCTTCTGGG  
 AGCCGGCAACGGCACCTAGTCGCTGAGAAGTTTGACGAACTTGGTCATTTAGAGGA  
 AGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAATGAA  
 TTTTAGGACGTTCTTTTTAGAAAGTCCGACCCTTTCATTTTCTTACACTGTGCACACAC  
 45 TTCTTTTTTACACACACTTTTAACACCTTAGTATAAGAATGTAATAGTCTCTTAATTG  
 AGCATAAATAAAAACAAAACCTTTCAGCAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGA  
 AGAACGCAGCGAATTGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGA  
 ATCTTTGAACGCACCTTGCACCTTTGGTATTCCGAAGAGTATGTCTGTTTGAGTGTG  
 ATGAAACTCTCAACCCCCCTATTTTGTAAATGAGATGGGTGTGGGCTTGGATTATGGT

TGTCTGTCGGCGTAATTGCCGGCTCAACTGAAATACACGAGCAACCCTATTGAAATA  
 AACGGTTTGACTTGGCGTAATAATTATTTTCGCTAAGGACGCTTTCTTCAAATATAAG  
 AGGTGCTTCTAATTCGCTTCTAATAGCATTAAAGCTTTAGACCTCAAATCAGTCAGG  
 ACTA

5

**SEQ ID NO:54***Trichosporon domesticum* CBS 8111

CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGACCTCCGGATTGGCGTTGAGA  
 10 AGCCGGCAACGGCATCTCTGGCTGAGAAGTTGGTCAAACCTGGTCAATTTAGAGGA  
 AGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAGTGAT  
 TGCCTTAATTGGCTTAAACTATATCCATCTACACCTGTGAACTGTTTGATTGAATCTT  
 CGGATTCGATTTTATACAAACATTGTGTAATGAACGTCATTATATTATAACAAAAA  
 AAAACTTTCAACAACGGATCTCTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAAT  
 15 GCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAACT  
 TGCCTCTCTGGTATTCCGGAGAGCATGCCTGTTTGAGTGTGCATGAAATCTCAACCA  
 TTAGGGTTTCTTAATGGCTTGGATTTGGAGGTTTGGCAGTCTGACTGGCTCCTCTTAA  
 AAGAGTTAGCAAGTTGAACTATTGCTATCTGGCGTAATAAGTTTCGCTGGAATGGTA  
 TTGTGAAGCGTGCTTCTAATCGTCTTCGGACAATTTTTTGACTCTGGCCTCAAATCAG  
 20 GTAGGACTA

**SEQ ID NO:55***Rhodotorula toruloides* CBS 8761

CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTCCGGATTGGCTATCGGG  
 25 AGCTCGCGAGAGCACCTGACTGCCGAGAAGTTGTACGAACTTGGTCAATTTAGAGGA  
 AGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAGTGAA  
 TATTAGGGTGTCCAACCTTAACTTGGAGCCCGACCCTCACTTTCTAACCTGTGCATTT  
 GTCTTGGGTAGTAGCTCGTGTGTCAGCGAGCGAATCCCATTTCCTTACAAACACAAAG  
 30 TCTATGAATGTAACAAATTTATAACAAACAAAACCTTCAACAACGGATCTCTTGGCT  
 CTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTC  
 AGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCATGGTATTCCGTGGAGCATG  
 CCTGTTTGAGTGTGCATGAATTCTTCAACCCACCTCTTTCTTAGTGAATCAGGCGGTGT  
 TTGGATTCTGAGCGTTGCTGGCTTCGCGGCCTAGCTCGCTCGTAATGCATTAGCATC  
 35 CGCAATCGAACTTCGGATTGACTCGGCGTAATAGACTATTTCGCTGAGGATTCTGGTC  
 TCTGACTGGAGCCGGGTAAGATTAAGGAAGCTACTAATCCTCATGTCTATCTTTTG  
 AGATTAGACCTCAAATCAGGTAGGACTA

**SEQ ID NO:56**40 *Rhodotourula terpendoidalis* CBS 8445

CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTCCGGACTGGCTATTGGG  
 ATCTCGCGAGAGAACCTGACTGCTGGGAAGTTGTACGAACTTGGTCAATTTAGAGGA  
 AGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAATGAA  
 45 TATTAGGGTGTCTTTTCATCAAAGAGGCCTGACCTTCATTCTTACCCTGTGCACT  
 ATTCAAACATTCGGCAGTTGGTAATTTGGCTTGTA AAAAGAGCCAGACGACTCTGCTG  
 AATTCCTTAAACTCTAAAGTATAAGAATGTTACAAATAAAAACAAATAAAAACCTTT  
 CAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAG  
 TAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCG

CTGGTATTCCGGCGAGCATGCCTGTTTGAGTGTGCATGAAAACCTCAACCCTTCAATT  
 CCTTGTTGAATTGTAAGGTGTTTGGATTCTGAATGTTTGCTGGCTTGAAGGGCCCTTG  
 GCTACTTCAAAAGCGAAGCTCATTTCGTAATACATTAGCATCTCAATTTTCAATATTC  
 GGATTGACTCGGCGTAATAGACTTTATTCGCTGAGGACACCTTCACAAGGTGGCCGA  
 5 ATTTTCGAGGTAGAAGCTTCCAATTCGATCAAAAGTCACTCTTAGTTTAGACCTCAGA  
 TCAGGCAGGACTA

**SEQ ID NO:57**

*Yarrowia lipolytica* CBS 10144

CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGTTTAGTGAGACCTTGGGAGGGCGAGATGA  
 GGGGGGCAACCCCTTTTGAACATCCAAACTTGGTCAAACCTTGATTATTTAGAGGAAG  
 TAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGATTTT  
 ATCTATTTCTGTGGATTTCTGGTATATTACAGCGTCATTTTATCTCAATTATAACTAT  
 15 CAACAACGGATCTCTTGGCTCTCACATCGATGAAGAACGCAGCGAACC GCGATATTT  
 TTTGTGACTTGCAGATGTGAATCATCAATCTTTGAACGCACATTGCGCGGTATGGTA  
 TTCCGTACCGCACGGATGGAGGAGCGTGTTCCCTCTGGGATCGCATTGCTTTCTTGA  
 AATGGATTTTTTAAACTCTCAATTATTACGTCATTTACCTCCTTCATCCGAGATTA

**SEQ ID NO:58**

*Rhodotorula glutinis* var. *glutinis* CBS 5805

CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTCCGGATTGGCTATTGGG  
 AGCTCGCGAGAGCACCTGACTGCCGAGAAGTTGTACGAACTTGGTCATTTAGAGGA  
 25 AGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAGTGAA  
 TATTAGGGTGTCCAACCTTAACCTTGGAAACCCGACCCTCACTTTCTAACCCGTGTGCA  
 GTCTTGGGTAGTAGCTTGCCTCGGCGAGCGAATCCCATTTCACTTACAAACACAAAG  
 TCTATGAATGTAACAAATTTATAACAAACAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCT  
 CTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTC  
 30 AGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCATGGTATTCCGTGGAGCATG  
 CCTGTTTGAGTGTGCATGAATCTTCAACCCACCTATTTCTTAGTGAATCAGGCGGTGT  
 TTGGATTCTGAGCGCTGCTGGCCTCACGGCCTAGCTCGCTCGTAATGCATTAGCATC  
 CGCAATCGAACTTCGGATTGACTCGGCGTAATAGACTATTCGCTGAGGATTCTGGTC  
 TCTGACTGGAGCCGGGTGAGATTAAAGGAAGCTACTAATCCTCATGTCTATCTTGAG  
 35 ATTAGACCTCAAATCAGGTAGGACTA

**SEQ ID NO:59**

*Yarrowia lipolytica* CBS 10143

GTCCCTGCCCTTTGTACACACCGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGTTTAGTGAG  
 ACCTTGGGAGGGCGAGATGAGGGGGGCAACCCCTTCTGAACATCCAAACTTGGTCA  
 AACTTGATTATTTAGAGGAAGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGC  
 GGAAGGATCATTATTGATTTTATCTATTTCTGTGGATTTCTATTCTATTACAGCGTCA  
 TTTTATCTCAATTATAACTATCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCACATCGATGAAGA  
 45 ACGCAGCGAACC GCGATATTTTTTTGTGACTTGCAGATGTGAATCATCAATCTTTGAA  
 CGCACATTGCGCGGTATGGCATTCCGTACCGCACGGATGGAGGAGCGTGTTCCCTCT  
 GGGATCGCATTGCTTTCTTGAAATGGATTTTTTAAACTCTCAATTATTACGTCATTT  
 ACCTCCTTCATCCGAGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAA

**SEQ ID NO:60***Lipomyces tetrasporus* CBS 5607

5 CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTCCGGATTGGCTATTGGG  
 AGCTCGCGAGAGCACCTGACTGCTGAGAAGTTGTACGAACTTGGTCATTTAGAGGA  
 AGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAGTGAA  
 TCTAGGACGTCCAACCTAACTTGGAGTCCGAAATCTCACTTTCTAACCCCTGTGCATCT  
 GTTAATTGGAATAGTAGCTCTTCGGAGTGAACCACCATTCACTTATAAAACACAAAG  
 TCTATGAATGTATACAAATTTATAACAAAACAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGG  
 10 CTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAAT  
 TCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCGCTCCTTGGTATTCCGAGGAGCA  
 TGCCTGTTTGAAGTGTATGAAATCTTCAACCCACCTCTTTCTTAGTGAATCTGGTGGT  
 GCTTGGTTTCTGAGCGCTGCTCTGCTTCGGCTTAGCTCGTTCGTAATGCATTAGCATC  
 CGCAACCGAACTTCGGATTGACTTGGCGTAATAGACTATTCGCTGAGGATTCTAGTT  
 15 TACTAGAGCCGAGTTGGGTAAAGGAAGCTCCTAATCCTAAAGTCTATTTTTTGATT  
 AGATCTCAAATCAGGTAGGACTA

**SEQ ID NO:61***Yarrowia lipolytica* CBS 5589

20 CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGTTTAGTGAGACCTTGGGAGGGCGAGATGA  
 GGGGGGCAACCCCTTCTGAACATCCAACTTGGTCAAACCTTGATTATTTAGAGGAAG  
 TAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGATTTT  
 ATCTATTTCTGTGGATTTCTATTCTATTACAGCGTCATTTTATCTCAATTATAACTATC  
 25 AACAACGGATCTCTTGGCTCTCACATCGATGAAGAACGCAGCGAACCGCGATATTTT  
 TTGTGACTTGCAGATGTGAATCATCAATCTTTGAACGCACATTGCGCGGTATGGCAT  
 TCCGTACCGCACGGATGGAGGAGCGTGTCCCTCTGGGATCGCATTGCTTTCTTGAA  
 ATGGATTTTTTTAACTCTCAATTATTACGTCATTTACCTCCTTCATCCGAGATTA

**SEQ ID NO:62***Lipomyces tetrasporus* CBS 8724

35 CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTTCGGACTGGCTCCAGAA  
 AATGGGAAACCATTATCAGGAGCTGGAAAGTTGGTCAAACCTTGGTCATTTAGAGGA  
 AGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCCTTCCGTAGCACTTACTGAAGCTTTAGCAGCCCG  
 AAAAGGCGAATGCTAGCGACTATAAATAAATATGGCGTTCTTAAATGCTAGTCTCTG  
 ATTAGAGGCGACATTGCCAAATTGCGGGGACATCCTAAAGATCTTGATACCAAGCT  
 GGTAGTCGAAAGACGCCAGTGGCCGAGCTAACAGCCCTGGGTATGGTAATAATTCA  
 AGATATGGAACAATGGGTAATCCGCAGCCAAGTCCTAAACTACGCAAGTAGCATGG  
 40 ATGCAGTTCACAGGCCAAATGGTGATGGGTAGATTACTAAATCTGCTTAAGATATGG  
 TCGGTCCCCTGTGAGAGCAGATGGGAAGCTACAAAGCAGACTCGTGAGTTTGCGC  
 AAACGTAACATAAAACGTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGAGTAT  
 TTGTCTTTTAAAGACATCTCTATCCATAAACTCTTTTTTCTAAAAAGACATGATTT  
 ACACAATTAGTCTGAATGATTATATAAAAATCTTCAAACCTTTCAACAACGGATCTC  
 45 TTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCAAATGCGATAAGTATTGTGAATTGCA  
 GGATTTTGTGAATCATCGAATTTTTGAACGCACATTGCACCTTCTGGTATTCCGGAG  
 GGTATACCTGTTTGAAGCGTCATTTATATACTCAAACCTTCGTTTTTGGTGATGGGCAC  
 ATATCTGGTGAGAGCTAGATTTGCCTGAAATATAGTGGTAGAGATTGCTACGAGTTA  
 TGCAAGTTAGCCAATGCTATTAAGTTAATTCGTTGGTGAAGCATGCGGAGCTTTAGT

GATCGCCTTCCTTAACTATTGGAATTTTTCTAATTTTGACCTCAAATCAGGCAGGAGT  
A

**SEQ ID NO:63**

5 *Rhodospiridium sphaerocarum* CBS 2371

CGCCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTCCGGACCGGCTATTGGG  
AGCTCGCGAGAGCACCCGACTGCTGGGAAGTTGTACGAACTTGGTCATTTAGAGGA  
AGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAGTGAA  
10 TATAGGACGTCCAACCTTAACTTGGAGTCCGAACTCTCACTTTCTAACCCGTGTGCATT  
GTTTGGGATAGTAGCCTCTCGGGGTGAACTCCTATTCACTCATAAACACAAAGTCTA  
TGAATGTATTTAATTTATAACAAAATAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTC  
GCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGT  
GAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCATGGTATTCCGTGGAGCATGCCT  
15 GTTTGGAGTGTGATGAATACTTCAACCCTCCTCTTTTCTAGTGAAAGAGAAGGTGCTT  
GGTTTCTGAGCGTTTTGCTGGCCTCACGGTCGAGCTCGCTCGTAATGCATTAGCATC  
CGCAATCGAACTTCGGATTGACTTGGCGTAATAGACTATTCGCTGAGGAATTCTAAT  
CTTCGGATTAGAGCCGGGTTGGGTTAAAGGAAGCTTCTAATCCTAATGTCTATATTT  
TTAGATTAGATCTCAAATCAGGTAGGACTA

20

**SEQ ID NO:64**

*Trichosporon brassicae* CBS 6382

CGCCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGACCTCCGGATTGGCGTTGAGA  
25 AGCCGGCAACGGCATCTCTTGGCCGAGAAGTTGGTCAAACCTTGGTCATTTAGAGGA  
AGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAGTGAT  
TGCCTTAATTGGCTTAACTATATCCAACCTACACCTGTGAACTGTTTCGATTGAATCTT  
CGATTCAATTTTACAAACATTGTGTAAAGAACGTCATTAGATCATAACAAAAAAA  
ACTTTTAAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGA  
30 TAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAACTTGGC  
CTCTCTGGTATTCCGGAGAGCATGCCTGTTTGGAGTGTGATGAAATCTCACACATCAA  
GGTTTCTTGATGAAGTGGATTTGGAGGTTGCCAGTCTAACTGGCTCCTCTTAAAGGA  
GTTAGCATATTTGATTATTGCTGTCTGGCGTAATAAGTTTCGCTAGTTTGGCATTTTG  
AAGTGTGCTTCTAATCGTCTTCGGACAATTTTTTACTCTGGCCTCAAATCAGGTAG  
35 GACTA

35

**SEQ ID NO:65**

*Cryptococcus curvatus* CBS 2755 y *Lipomyces tetrasporus* CBS 7656

CGCCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGATTTCCGGATTGGCGTTAGGA  
40 AGCCGGCAACGGCATCCTTTGGCTGAGAAGCTACTCAAACCTTGGTCATTTAGAGGA  
AGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAGTGAT  
TTGCCTTCGGGCTAACTATATCCATAACACCTGTGAACTGTTGATTGACTTCGGTCA  
ATATTTTACAAACATTGTGTAATGAACGTCATGTTATAATAACAAATATAACTTTC  
45 AACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGT  
AATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAACTTGGCCTCTC  
TGGTATTCCGGAGAGCATGCCTGTTTGGAGTGTGATGAAATCTCAACCATTAGGGTTT  
CTTAATGGCTTGGATTTGGACGTTTGGCAGTCAAATGGCTCGTCTTAAAGAGTTAG  
TGAATTTAACATTTGTCTTCTGGCGTAATAAGTTTCGCTGGGCTGATAGTGTGAAGTT

45

TGCTTCTAATCGTCCGCAAGGACAATTCTTGAACCTCTGGCCTCAAATCAGGTAGGAC  
TA

**SEQ ID NO:66**

5 *Lipomyces starkeyi* CBS 7786

CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTTCGGACTGGCTCCAGAA  
AATGGGAAACCATTATCAGGAGCTGGAAAGTTGGTCAAACCTTGGTCATTTAGAGGA  
AGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGAG  
10 TATTTGTCTTTTCAAGACATCTCTATCCATAAACTCTTTTTTTTAAAAAGACATGA  
TTTATAACAATTAGTCTGAATGATTATTTTTAAATCTTCAAACCTTCAACAACGGAT  
CTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCAAATTGCGATAAGTAATGTGAATTG  
CAGGATTTTGTGAATCATCGAATTTTTGAACGCACATTGCACCTTCTGGTATTCCGG  
AGGGTATACCTGTTTGAGCGTCATTTATACTCAAACCTTACGTTTTGGTGATGGG  
15 CACGTATCTGGCTTCTAAGTTAGATTTGCCTGAAATATAGCGGTAGAGGTCGCTAGA  
AGCGATGCAAGTTAGCCAATGCTATTAAGTTAATTCGTTGGTGACGCATGTTGAGC  
TTTTGGTGAAGTCTTCCTTAATTATTGGAATTTTTTTCTAATTTTGACCTCAAATCAG  
GCAGGAGTA

20 **SEQ ID NO:67**

*Yarrowia lipolytica lipolytica* CBS 6012

CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGTTTAGTGAGACCTTGGGAGGGCGAGATGA  
GGGGGGCAACCCCTTTTGAACATCCAACTTGGTCAAACCTTGAATTATTTAGAGGAAG  
25 TAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATTGATTTT  
ATCTATTTCTGTGGATTTCTATTCTATTACAGCGTCATTTTATCTCAATTATAACTATC  
AACACGGATCTCTTGGCTCTCACATCGATGAAGAACGCAGCGAACCGCGATATTTT  
TTGTGACTTGCAGATGTGAATCATCAATCTTTGAACGCACATTGCGCGGTATGGCAT  
TCCGTACCGCACGGATGGAGGAGCGTGTCCCTCTGGGATCGCATTGCTTTCTTGAA  
30 ATGGATTTTTTAAACTCTCAATTATTACGTCATTTACCTCCTTCATCCGAGATTA

**SEQ ID NO:68**

*Trichosporon loubieri* var. *loubieri* CBS 8265

CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGACCTCCGGATTGGCGTTGAGA  
AGCCGGCAACGGCATCTCTTGGCCGAGAAGTTGGTCAAACCTTGGTCATTTAGAGGA  
AGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAGTGAT  
TGCCATCTTGGCTTAAACTATATCCATCTACACCTGTGAACCGTTTGATTGAATCTTC  
TGATTCAATTTTACAAACATTGTGTAATGAACGTCATTAGATCATAATAAGAAAAAA  
40 CTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGAT  
AAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAACTTGC  
TCTCTGGTATTCCGGAGAGCATGCCTGTTTGAGTGTGATGAAATCTCAACCATTAGG  
GTTTCTTAATGGCTTGGATTTGGAGGTTGCCATTCTAAATGGCTCCTCTTAAAAGAGT  
TAGCGAGTTTAACTATTGCTATCTGGCGTAATAAGTTTCGCTGGAATGGTATTGTGA  
45 AGCGCGCTTCTAATCGTCTTCGGACAATTTTTTACTCTGGCCTCAAATCAGGTAGG  
ACTA

**SEQ ID NO:69**

*Geotrichum vulgare* CBS 10073

CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCTCCGGATTGATTAGTTGG  
 AGAGGGAGACTTTTCTGACTGAACGAGAAGCTAGTCAAACCTTGGTCATTTAGAGGA  
 AGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAT  
 5 TTAATATTAATTGTGAAATTA AAAACGATATTAACAAAAAATCATACAATCAATTATA  
 AAAAAAATCAAACCTTTTAACAATGGATCTCTTGGTTCTCGTATCGATGAAGAACGC  
 AGCGAAACGCGATATTTCTTGTGAATTGCAGAAGTGAATCATCAGTTTTTGAACGCA  
 CATTGCACTTTGGGGTATCCCCAAAGTATACTTGTTTGAGCGTTGTTTCTCTCTTGG  
 AATTGCATTGCTTTTCTAAAAAATCGAATCAAATTCGTTTGAACATCCATTCTTCAA  
 10 CCTCAGATCAAGTAGGATTA

**SEQ ID NO:70**

*Rhodospiridium toruloides* CBS 14

CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTCCGGATTGGCTATTGGG  
 AGCTCGCGAGAGCACCTGACTGCCGAGAAGTTGTACGAACCTTGGTCATTTAGAGGA  
 AGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAGTGAA  
 TATTAGGGTGTCCAACCTTAACCTGGAGCCCGACCCTCACTTTCTAACCCCTGTGCATTT  
 GTCTTGGGTAGTAGCTTGCCTCAGCGAGCGAATCCCATTTCACTTACAAACACAAAG  
 20 TCTATGAATGTAACAAATTTATAACAAAAACAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGC  
 TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATT  
 CAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCATGGTATTCCGTGGAGCAT  
 GCCTGTTTGAGTGTGCATGAATTTCAACCCACCTCTTTCTTAGTGAATCAGGCGGTG  
 TTTGGATTCTGAGCGCTGCTGGCTTCGCGGCCTAGCTCGCTCGTAATGCATTAGCAT  
 25 CCGCAATCGAACTTCGGATTGACTCGGCGTAATAGACTATTCGCTGAGGATTCTGGT  
 CTCTGACTGGAGCCGGGTAAGGTTAAAGGGAGCTACTAATCCTCATGTCTATCTTGA  
 GATTAGACCTCAAATCAGGTAGGACTA

**SEQ ID NO:71**

30 *Rhodotorula glutinis* var. *glutinis* CBS 6020 y *Lipomyces orientalis* CBS 10300

CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTCCGGATTGGCTATTGGG  
 AGCTCGCGAGAGCACCTGACTGCTGAGAAGTTGTACGAACCTTGGTCATTTAGAGGA  
 AGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAGTGAA  
 35 TCTAGGACGTCCAACCTTAACCTGGAGTCCGAACCTCTCACTTTCTAACCCCTGTGCATCT  
 GTTAATTGGAATAGTAGCTCTTCGGAGTGAACCACCATTCCTTATAAAAACACAAAG  
 TCTATGAATGTATACAAATTTATAACAAAAACAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGG  
 CTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAAT  
 TCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCATGGTATTCCGAGGAGCA  
 40 TGCCTGTTTGAGTGTGCATGAATTTCAACCCACCTCTTTCTTAGTGAATCTGGTGGT  
 GCTTGGTTTCTGAGCGCTGCTCTGCTTCGGCTTAGCTCGTTTCGTAATGCATTAGCATC  
 CGCAACCGAACTTCGGATTGACTTGGCGTAATAGACTATTCGCTGAGGATTCTAGTT  
 TACTAGAGCCGAGTTGGGTTAAAGGAAGCTCCTAATCCTAAAGTCTATTTTTTGATT  
 AGATCTCAAATCAGGTAGGACTA

45

**SEQ ID NO:72**

*Rhodotorula aurantiaca* CBS 317

CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGATTTCCGGATTGGCGTTAGGA  
 AGCCGGCAACGGCATCCTTTGGCTGAGAAGCTACTCAAACCTGGTCATTTAAAGGA  
 AGTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAGTGAT  
 TTGCCTTCGGGCTAACTATATCCATAACACCTGTGAACTGTTGATTGACTTCGGTCA  
 5 ATATTTTACAAACATTGTGTAATGAACGTCATGTTATAATAACAAATATAACTTTC  
 AACACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGT  
 AATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCAACTTGCGCTCTC  
 TGGTATTCCGGAGAGCATGCCTGTTTGAGTGTCATGAAATCTCAACCATTAGGGTTT  
 CTTAATGGCTTGGATTTGGACGTTTGCCAGTCAAATGGCTCGTCTTAAAAGAGTTAG  
 10 TGAATTTAACATTTGTCTTCTGGCGTAATAAGTTTTCGCTGGGCTGATAGTGTGAAGTT  
 TGCTTCTAATCGTCCGCAAGGACAATTCTTGAACCTCTGGCCTCAAATCAGGTAGGAC  
 TA

**SEQ ID NO:73**

15 *Torulaspota delbrueckii* CBS 2924

CGCCCGTCGCTAGTACCGATTGAATGGCTTAGTGAGGCCTCAGGATCTGCTTAGAGA  
 AGGGGGCAACTCCATCTCAGAGCGGAGAATCTGGTCAAACCTGGTCATTTAGAGGA  
 ACTAAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAGAGAA  
 20 ATCTATATGAATGAAGTTAGAGGACGTCTAAAGATACTGTAAGAGAGGATCAGGTT  
 CAAGACCAGCGCTTAATTGCGCGGTTGCGGCTTGGTTCGCCTTTTGGCGAACATGTC  
 TTTTCTCGTTGTTAACTCTACTTCAACTTCTACAACACTGTGGAGTTTCTACACAAC  
 TTTTCTTCTTTGGGAAGATACGTCTTGTGCGTGCTTCCCAGAGGTGACAAACACAAA  
 CAACTTTTTATTATTATAAACAGTCAAACCAATTTTCGTTATGAAATTAATAAATAT  
 25 TTAACACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAA  
 TGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACA  
 TTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTTCTCAAAC  
 AATCATGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTGTCAAGGGTTAACTTGAAATTGCTAGCCT  
 GTTATTTGGTTGTGATTTTGTGCTGGCTTGGATGACTTTGTCCAGTCTAGCTAATACCGA  
 30 ATTGTCGTATTAGGTTTTACCAACTTCGGCAGACTGTGTGTTGGCTCGGGCGCTTTAA  
 AGACTTTGTCGTAACGATTTATCGTTTGTGAGCTTTTCGCATACGCAATCCGGGC  
 GAACAATACTCTCAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGAATA

**SEQ ID NO:74**

35 Cebador 5' para la amplificación genómica de  $\Delta 12$  FAD de *Prototheca moriformis* (UTEX 1435)

5'-TCACTTCATGCCGGCGGTCC-3'

**SEQ ID NO:75**

40 Cebador 3' para la amplificación genómica de  $\Delta 12$  FAD de *Prototheca moriformis* (UTEX 1435)

5'-GCGCTCCTGCTTGGCTCGAA-3'

**SEQ ID NO:76**

45 Secuencia 5' de modificación dirigida genómica para pSZ1124 (FAD2B)

gctcttcgagacgtggtctgaatcctccaggcgggtttccccgagaaagaaagggtgccgatttcaaagcagagccatgtgccgggacct  
 gtggcctgtgttgccgctatgtagtaccctccccaattgtcgcagtttgcgcaatcataaactcaaaactgcagcttctgagctg  
 cgctgttcaagaacacctctggggtttgctacccgcgaggtcgcagccagcatggctatcaagacgaacaggcagcctgtggagaagc  
 ctccggtcacgatcgggacgctgcgcaaggccatccccgcgactgttctgagcgtcggcgcttctgtagcagcatgtacctggcctttgac  
 5 atcgcggtcatgtccctgctctacgtcgcgtcgcagctacatgacctgcgccgggtgctacgtgggtcaagatggcgtcatgtggccgct  
 ctactggttcttcaggtgtgtgaggggtgtggttccccgtatcaggtcctgtggcgcgcatgggggagaaggcgcctgtcccgtga  
 cccccggctacctcccggcacttccaggggcgccttggcaggggtgtctgggtgtcgcgcacgagtgccggccaccaggcctttc  
 ctccagccaggccatcaacgacggcgtgggctgtgttccacagcctgtctgtggtgccctactactcctggaagcactcgcaccgggt  
 acc

10

**SEQ ID NO:77**

Secuencia 3' de modificación dirigida genómica para pSZ1124 (FAD2B)

ccgccaccactccaacacggggtgcctggacaaggacgaggtgttggccgccaccgcgagtgccgcacgagggcctggagtg  
 15 ggaggagtggctgccatccgcatgggcaaggtgctgtcacctgacctgggctggccgctgtacctcatgtcaacgtcgcctcgcg  
 gccgtacctcgccttcccaaccactttgacctggctgccatcttcagcaagcgcgagcgcacatgaggtggtcatctccgacctggcg  
 ctggtggcggtgctcagcgggctcagcgtgctggccgcaccatgggctggcctggctggtcaagacctagtggtgcctacctgatc  
 gtgaacatgtggctcgtctacacgctgtccagcacacgcaccggcgctgccactacttcgagaaggactgggactggctgcgc  
 ggcgccatggccaccgtggaccgtccatggcccgccttcatggacaacatcctgcaccacatctccgacaccacgtgctgcaccac  
 20 ctcttcagcaccatcccgcactaccacgccgaggaggcctccgcccatcaggccatcctgggcaagtactaccagtcggacagccg  
 ctgggtcggccgcgcctgtgggaggactggcgcgactgccgctacgtcgtcccggacgcgccgaggacgactccgcgctctggttc  
 cacaagtgagtgagtgagaagagc

25

**SEQ ID NO:78**

Casete suc2 de *S. cerevisiae*

ctttcttcgctatgacacttccagcaaaaggtagggcgggctgcgagacggcttcccggcgctgcatgcaaacaccgatgatgcttcgacc  
 ccccgaagctccttcggggctgcatggcgctccgatgccgctccaggcgcgagcgtgttaaatagccaggcccccattgcaaaagaca  
 ttatagcagctaccaaaagccatattcaaacacctagatcactaccactctacacaggccactcagcttgtgatcgcactccgctaaagggg  
 30 gcgctcttctcttcgtttcagtcacaaccgcgaacggcgcgccATGctgctgcaggecttctgttctgctggccggcttcgccgcc  
 aagatcagcgcctccatgacgaacgagacgtccgaccgccccctggtgcacttaccaccaaaagggtggatgaacgaccccaacg  
 gcctgtggtacgacgagaaggacgccaagtggcactgtactccagtaaacccgaacgacaccgtctgggggacgcccttgttctggg  
 gccacgccactccgacgacctgaccaactgggaggaccagcccacgcccgaagcgaacgactccggcgccttctccgg  
 ctccatggtggtgactacaacaacacctccgcttctcaacgacaccatcagcccgcgcagcgtcgtggccatctggacctacaac  
 35 acccggagtccgaggagcagtagatctctacagcctggacggcggctacacctcaccgagtagcagaagaacccgtgctggccgc  
 caactccaccagttccgcgacccgaaggtcttctgttacgagcctcccagaagtgatcatgaccggccaagtccaggactacaa  
 gatcagatctactcctccgacgacctgaagtctggaagctggagtcgcgttcgccaacgagggcttctcggctaccagtagtg  
 cccggcctgatcaggtccccaccgagcaggaccccagcaagtctactgggtgatgttcatctccatcaacccggcgccccggccgg  
 cggctcctcaaccagtactcgtcggcagctcaacggcaccacttcgaggccttcgacaaccagtcccgcgtggtggacttcggcaag  
 40 gactactacgcctgcagaccttctcaacaccgaccgacctacgggagcgccttgggcatcgcgtgggctccaactgggagtactcc  
 gccttcgtcccaccaaccctggcgtcctccatgtcctcgtgcgcaagttctccctcaacaccgagtaccaggccaaccgggagacg  
 gagctgatcaacctgaaggccgagccgatcctgaacatcagcaacgccggccccctggagccggttcgccaccaacaccacgttgacgaa  
 ggccaacagctacaacgtcgaactgtccaacagcaccggcaccctggagttcagctggtgtacgccgtcaacaccaccagacgatctc  
 caagtccgtgtcgcggaccttccctctggttcaagggcctggaggaccccaggagtagctcctccgatgggcttcgaggtgtccgctcc  
 45 tcttcttctggaccgcgggaacagcaaggtgaagttcgtgaaggagaacccctacttcaaccaaccgcatgagcgtgaacaaccagccct  
 tcaagagcgagaacgacctgtcctactacaaggtgtacggcttctgtgaccagaacatcctggagctgtacttcaacgacggcgacgtcgt  
 gtccaccaacactacttcatgaccaccgggaacgccttggctccgtgaacatgacgacgggggtggacaacctgttctacatcgaaa  
 gttccaggtgcgcgaggtcaagTGACAattggcagcagcagctcggatagtagcagacactctggacgctggtcgtgtgatggactgt  
 tggccaccacttgccttgacctgtgaatccctgccgctttatcaaacagcctcagtggtttgatctgtgtacgcgcttttgcgagt

tgctagctgcttgctatttgcgaataaccacccccagcatcccctccctcgtttcatatcgcttgcacccaaccgcaacttatctacgctgtc  
ctgtatcccctcagcgtgctcctgctcctgctcactgccccctgcacageccttggttgggctcgcctgtattctctggactgcaacctgt  
aaaccagcactgcaatgctgatgcacgggaagttagtgggatgggaacacaaatgga

5 **SEQ ID NO:79**

Secuencia 5' de modificación dirigida genómica para pSZ1125 (FAD2C)

gctcttcgaggggctggtctgaatcctcagggcgggtgttaccgagaaagaaagggtgccgatttcaaagcagaccatgtgccgggccc  
ctgtggcctgtgttggcgctatgtagtaccacccccacccaattgtcgccagtttgcgactccataaactcaaacagcagcttctgagc  
10 tgcgctgttaagaacacctctggggttctcaccgcgaggtcgcagccagcatggctatcaagacgaacaggcagcctgtggagaa  
gcctccgttcacgatcgggacgctgcgaaggccatccccgcgactgttctgagcgtcggcgcttcgtagcagcatgtacctggccttt  
gacatcgcggcatgtcctgctctacgtcgcgtcaggtacatcgaccctgcaccgggtgcctacgtgggtcaagtacggcatcatgtggcc  
gctctactggttctccaggtgtgtttaggggtttggtgcccgtattgaggtcctggtggcgcgcatggaggagaaggcgctgtcccgt  
gaccccccggtaccctcccggcacctccagggcgcttcggcacgggtgtctgggtgtcgcgcacgagtgccggccaccaggcctt  
15 ttctccagccaggccatcaacgacggcgtgggctggtgtccacagcctgctgctggtgcctactactcctggaagcactcgcaccgg  
gtacc

**SEQ ID NO:80**

Secuencia 3' de modificación dirigida genómica para pSZ1125 (FAD2C)

20 ccgccaccactccaacacggggtgcctggacaaggacgaggtgttggccgccaccgcgcagtgggcgacagggcctggagtg  
ggaggagtggctgccatccgcatgggcaaggtgctggtcacctgaccctgggctggccgctgtacctcatgtcaacgtcgcctcgcg  
gccgtaccgcgcttcgcaaacactttgaccgtggtcgcctatctcagcaagcgcgagcgcacatcaggtggtcatctccgacctggcg  
ctggtggcggtgctcagcgggctcagcgtgctgggcccaccatgggctgggctggtcaagacctacgtggtgcctactctgatc  
25 gtgaacatgtggctcgtgctatcacgctgctccagcacacgcaccggcgctgccactactcagaaggactgggactggctgcgc  
ggcgccatggccaccgtggaccgctccatgggcccgccttcatggacaacatcctgcaccacatctccgacaccacgtgctgcaccac  
ctcttcagcaccatcccactaccacgccgaggaggcctccgcccatcaggccatcctgggcaagtactaccagtcgcagaccg  
ctgggtcggcgccgcccctgtgggaggactggcgcgactgccgctacgtcgtcccggacgcgccgaggacgactccgcgctctggtc  
cacaagtgagtgagtgagaagagc

30 **SEQ ID NO:81**

Secuencia 5' dadora genómica para 6S

35 GCTCTTCGCCGCGCCACTCCTGCTCGAGCGCGCCCGCGCGTGCGCCGCCAGCGCCT  
TGGCCTTTTCGCCGCGCTCGTGC GCGTGCCTGATGTCCATCACCAGGTCCATGAGGT  
CTGCCTTTCGCCGCGCTGAGCCACTGCTTCGTCCGGGCGGCCAAGAGGAGCATGAGG  
GAGGACTCCTGGTCCAGGGTCCCTGACGTGGTTCGCGGCTCTGGGAGCGGGCCAGCAT  
CATCTGGCTCTGCCGCACCGAGGCCGCTCCAACCTGGTCTCCAGCAGCCGCAGTGC  
CCGCCGACCCTGGCAGAGGAAGACAGGTGAGGGGGGTATGAATTGTACAGAACAA  
40 CCACGAGCCTTGTCTAGGCAGAATCCCTACCAGTCATGGCTTTACCTGGATGACGGC  
CTGCGAACAGCTGTCCAGCGACCCTCGCTGCCGCCGCTTCTCCCGCACGCTTCTTTCC  
AGCACCGTGATGGCGCGAGCCAGCGCCGCACGCTGGCGCTGCGCTTCGCCGATCTG  
AGGACAGTCGGGGAACCTCTGATCAGTCTAAACCCCTTGC GCGTTAGTGTGCCATC  
CTTTGCAGACCGGTGAGAGCCGACTTGTGTGCGCCACCCCCACACCACCTCCTCC  
45 CAGACCAATTCTGTCACCTTTTTGGCGAAGGCATCGGCCTCGGCCTGCAGAGAGGAC  
AGCAGTGCCAGCCGCTGGGGGTTGGCGGATGCACGCTCAGGTACC

**SEQ ID NO:82**

Constructo de expresión relevante para la tioesterasa de *Cinnamomum camphora*  
(βtub::neo::nitred::βtub::C.camphora TE::nitred)

5 CTTTCTTGCGCTATGACACTTCCAGCAAAGGTAGGGCGGGCTGCGAGACGGCTTCC  
 CGGCGCTGCATGCAACACCGATGATGCTTCGACCCCCGAAGCTCCTTCGGGGCTGC  
 ATGGGCGCTCCGATGCCGCTCCAGGGCGAGCGCTGTTTAAATAGCCAGGCCCCCGA  
 TTGCAAAGACATTATAGCGAGCTACCAAAGCCATATTCAAACACCTAGATCACTACC  
 ACTTCTACACAGGCCACTCGAGCTTGTGATCGCACTCCGCTAAGGGGGCGCCTCTTC  
 CTCTTCGTTTCAGTCACAACCCGCAAACCTCTAGAATATCAATGATCGAGCAGGACGG  
 10 CCTCCACGCCGGCTCCCCCGCCGCTGGGTGGAGCGCCTGTTTCGGCTACGACTGGGC  
 CCAGCAGACCATCGGCTGCTCCGACGCCGCCGTGTTCCGCCTGTCCGCCAGGGCCG  
 CCCCCTGCTGTTTCGTGAAGACCGACCTGTCCGGCGCCCTGAACGAGCTGCAGGACG  
 AGGCCGCCCGCCTGTCCTGGCTGGCCACCACCGGCGTGCCCTGCGCCGCCGTGCTGG  
 ACGTGGTGACCGAGGCCGGCCGCGACTGGCTGCTGCTGGGCGAGGTGCCCGGCCAG  
 15 GACCTGCTGTCCTCCACCTGGCCCCCGCCGAGAAGGTGTCCATCATGGCCGACGCC  
 ATGCGCCGCTGCACACCCTGGACCCCGCCACCTGCCCTTCGACCACCAGGCCAAG  
 CACCGCATCGAGCGCGCCCGCACCCGCATGGAGGCCGGCCTGGTGGACCAGGACGA  
 CCTGGACGAGGAGCACCAGGGCCTGGCCCCCGCCGAGCTGTTCCGCCGCTGAAGG  
 CCCGCATGCCCGACGGCGAGGACCTGGTGGTGACCCACGGCGACGCCTGCCTGCC  
 20 AACATCATGGTGGAGAACGGCCGCTTCTCCGGCTTCATCGACTGCGGCCGCTGGGC  
 GTGGCCGACCGCTACCAGGACATCGCCCTGGCCACCCGCGACATCGCCGAGGAGCT  
 GGGCGGCGAGTGGGCCGACCGCTTCTGGTGTGTACGGCATCGCCGCCCCCGACTC  
 CCAGCGCATCGCCTTCTACCGCCTGCTGGACGAGTTCTTCTGACAATTGGCAGCAGC  
 AGCTCGGATAGTATCGACACACTCTGGACGCTGGTCTGTGTGATGGACTGTTGCCGCC  
 25 ACACTTGCTGCCTTGACCTGTGAATATCCCTGCCGCTTTTATCAAACAGCCTCAGTGT  
 GTTTGATCTTGTGTGTACGCGCTTTTTCGAGTTGCTAGCTGCTTGTGCTATTTGCGAA  
 TACCACCCCCAGCATCCCCTTCCCTCGTTTCATATCGCTTGCATCCCAACCGCAACTT  
 ATCTACGCTGTCCTGCTATCCCTCAGCGCTGCTCCTGCTCCTGCTCACTGCCCTCGC  
 ACAGCCTTGGTTTGGGCTCCGCCTGTATTCTCCTGGTACTGCAACCTGTAAACCAGC  
 30 ACTGCAATGCTGATGCACGGGAAGTAGTGGGATGGGAACACAAATGGAGGATCCCG  
 CGTCTCGAACAGAGCGCGCAGAGGAACGCTGAAGGTCTCGCCTCTGTTCGCACCTCA  
 GCGCGGCATACACCACAATAACCACCTGACGAATGCGCTTGGTTCTTCGTCCATTAG  
 CGAAGCGTCCGGTTCACACACGTGCCACGTTGGCGAGGTGGCAGGTGACAATGATC  
 GGTGGAGCTGATGGTTCGAAACGTTACAGCCTAGGGATATCGAATTCCTTTCTTGCG  
 35 CTATGACACTTCCAGCAAAGGTAGGGCGGGCTGCGAGACGGCTTCCCGGCCGCTGC  
 ATGCAACACCGATGATGCTTCGACCCCCGAAGCTCCTTCGGGGCTGCATGGGCGCT  
 CCGATGCCGCTCCAGGGCGAGCGCTGTTTAAATAGCCAGGCCCCCGATTGCAAAGA  
 CATTATAGCGAGCTACCAAAGCCATATTCAAACACCTAGATCACTACCACTTCTACA  
 CAGGCCACTCGAGCTTGTGATCGCACTCCGCTAAGGGGGCGCCTCTTCCTCTTCGTT  
 40 TCAGTCACAACCCGCAAACACTAGTATGGCCACCGCATCCACTTCTCGGGCGTTCAA  
 TGCCCGCTGCGGGCGACCTGCGTCGCTCGGCGGGCTCCGGGCCCCCGGCGCCAGCGA  
 GGCCCCCTCCCCGTGCGCGGGCGCGCCCCCGACTGGTCCATGCTGTTTCGCCGTGATCA  
 CCACCATCTTCTCCGCCGCCGAGAAGCAGTGGACCAACCTGGAGTGAAGCCCAAG  
 CCCAACCCCCCAGCTGCTGGACGACCACTTCGGCCCCCACGGCCTGGTGTTCGGC  
 45 CGCACCTTCGCCATCCGCAGCTACGAGGTGGGCCCCGACCGCTCCACCAGCATCGTG  
 GCCGTGATGAACCACCTGCAGGAGGCCGCCCTGAACCACGCCAAGTCCGTGGGCAT  
 CCTGGGCGACGGCTTCGGCACCAACCCTGGAGATGTCCAAGCGCGACCTGATCTGGG  
 TGGTGAAGCGCACCCACGTGGCCGTGGAGCGCTACCCCGCCTGGGGCGACACCGTG  
 GAGGTGGAGTGCTGGGTGGGCGCCTCCGGCAACAACGGCCGCCGCCACGACTTCT

GGTGC GCGACTGCAAGACCGGCGAGATCCTGACCCGCTGCACCTCCCTGAGCGTGA  
 TGATGAACACCCGCACCCGCCGCTGAGCAAGATCCCCGAGGAGGTGCGCGGCGAG  
 ATCGGCCCCGCCTTCATCGACAACGTGGCCGTGAAGGACGAGGAGATCAAGAAGCC  
 CCAGAAGCTGAACGACTCCACCGCCGACTACATCCAGGGGCGGCCTGACCCCCGCT  
 5 GGAACGACCTGGACATCAACCAGCACGTGAACAACATCAAGTACGTGGACTGGATC  
 CTGGAGACCGTGCCCGACAGCATCTTCGAGAGCCACCACATCTCCTCCTTCACCATC  
 GAGTACCGCCGCGAGTGCACCATGGACAGCGTGCTGCAGTCCCTGACCACCGTGAG  
 CGGCGGCTCCTCCGAGGCCGCGCCTGGTGTGCGAGCACCTGCTGCAGCTGGAGGGCG  
 GCAGCGAGGTGCTGCGCGCCAAGACCGAGTGGCGCCCCAAGCTGACCGACTCCTTC  
 10 CGCGGCATCAGCGTGATCCCCGCCGAGTCCAGCGTGATGGACTACAAGGACCACGA  
 CGGCGACTACAAGGACCACGACATCGACTACAAGGACGACGACGACAAGTGACTCG  
 AGGCAGCAGCAGCTCGGATAGTATCGACACACTCTGGACGCTGGTCGTGTGATGGA  
 CTGTTGCCGCCACACTTGCTGCCTTGACCTGTGAATATCCCTGCCGCTTTTATCAAAC  
 AGCCTCAGTGTGTTTGATCTTGTGTGTACGCGCTTTTGCAGTTGCTAGCTGCTTGTG  
 15 CTATTTGCGAATACCACCCCCAGCATCCCCTTCCCTCGTTTCATATCGCTTGCATCCC  
 AACCGCAACTTATCTACGCTGTCTGCTATCCCTCAGCGCTGCTCCTGCTCCTGCTCA  
 CTGCCCTCGCACAGCCTTGGTTTGGGCTCCGCCTGTATTCTCCTGGTACTGCAACCT  
 GTAAACCAGCACTGCAATGCTGATGCACGGGAAGTAGTGGGATGGGAACACAAATG  
 GAAAGCTT

20

**SEQ ID NO:83**

5'UTR /promotor de transportador de azúcar SugT de *Prototheca moriformis*

CCAGGCAGGCGGTAGGGTTGCCGATTGCTTGAGCGAATTGGAAGATATAATTTTTTG  
 25 TGGTGTCCCTGGACGCTGTTTGTGGCGCTCCTTTTTGGAGAAGATTGCGTGGGGGAG  
 CTTTCCATGTACCACGCTTCCTTCTGAAAGGATTCTGGCCGAGTCCCTGATGAGCCCA  
 AAGAAAACACCTGCCTTTCAGTGCTGGCACTCTGAAAACGTCAACAGATGATTATAC  
 ATGTCACAAAAGGCAGCCGATTAGGAACGGGAGCTCTGGCCGTTTCGTTTGGCTGCCT  
 GGGCTGATTGAAGTGATCCACCCTGTTTGAATGAAGGCGGTTCGAGTCGAATTATCG  
 30 ACCGGAGCTGTCCGGAAGGCGTCCGGGGCAGAGTGAGGTGCTGCGGCCTGGTTGTC  
 GTTCAAAAAGACCCCGGTAGCCCAACAATCACGAACGAAAGGAATATAATTGCTTG  
 CATACTATACATTTCAGTTTCTATGTGGCGGGTAGACAAGTCTCATGGGCTTCTAAAG  
 GCTGTCCCTTGAAGGCTACTTATAAAAACTTGCTGCGCCATGGCACGGATCGCGCTT  
 GCGCAGGCTGCAACCCTGCGCGCAAGGTCAAATACACAGCAAAGATACTAACAGA  
 35 ATTTCTAAAAACATTTAAATATTTGTTTCGACCAGCCAATTGTGGTCGTAGGCACGC  
 AAAAGACTTTGTTTTGCGCCACCGAGCATCCACGCTGGCAGTCAAGCCAGTCCGAT  
 GTGCATTGCGTGGCAGCATCGAGGAGCATCAAAAACCTCGTGCACGCTTTTCTGTCA  
 ATCATCATCAACCACTCCACCATGTATACCCGATGCATCGCGGTGCGCAGCGCGCCA  
 CGCGTCCCAGACCCGCCCAAAAACCCAGCAGCGGCGAAAGCAAATCTTCACTTGCC  
 40 CGAAACCCCGAGCAGCGGCATTACACGTGGGCGAAAACCCCACTTGCCCTAACAG  
 GCGTATGTCTGCTGTCACGATGCCTGACAACGGTATTATAGATATACTGATTAAT  
 GTTTGAGTGTGTGCGAGTCGCGAATCAGGAATGAATTGCTAGTAGGCACTCCGACC  
 GGGCGGGGGCCGAGGGACCA

45

**SEQ ID NO:84**

Secuencia de UTR/promotor amt03

GGCCGACAGGACGCGCGTCAAAGGTGCTGGTTCGTGTATGCCCTGGCCGGCAGGTCCG  
 TTGCTGCTGCTGGTTAGTGATTCCGCAACCCTGATTTTGGCGTCTTATTTTGGCGTGG

CAAACGCTGGCGCCCGCGAGCCGGGCCGGCGGCGATGCGGTGCCCCACGGCTGCCG  
 GAATCCAAGGGAGGCAAGAGCGCCCGGGTCAGTTGAAGGGCTTTACGCGCAAGGTA  
 CAGCCGCTCCTGCAAGGCTGCGTGGTGAATTGGACGTGCAGGTCCCTGCTGAAGTTC  
 CTCCACCGCCTCACCAGCGGACAAAGCACCGGTGTATCAGGTCCGTGTCATCCACTC  
 5 TAAAGAGCTCGACTACGACCTACTGATGGCCCTAGATTCTTCATCAAAAACGCCTGA  
 GACTTTGCCAGGATTGAAACTCCCTGAAGGGACCACCAGGGGCCCTGAGTTGTT  
 CCTCCCCCGTGGCGAGCTGCCAGCCAGGCTGTACCTGTGATCGAGGCTGGCGGGA  
 AAATAGGCTTCGTGTGCTCAGGTCATGGGAGGTGCAGGACAGCTCATGAAACGCCA  
 ACAATCGCACAAATTCATGTCAAGCTAATCAGCTATTTCTCTTCACGAGCTGTAATT  
 10 GTCCCAAATTCCTGGTCTACCGGGGGTGTATCCTTCGTGTACGGGCCCTTCCCTCAAC  
 CCTAGGTATGCGCGCATGCGGTCGCCGCGCAACTCGCGCGAGGGCCGAGGGTTTGG  
 GACGGGCCGTCCCGAAATGCAGTTGCACCCGGATGCGTGGCACCTTTTTTGGGATAA  
 TTTATGCAATGGACTGCTCTGCAAAATTCTGGCTCTGTGCGCAACCCTAGGATCAGC  
 GGCGTAGGATTCGTAATCATTCGTCTCTGATGGGGAGCTACCGACTACCCTAATATC  
 15 AGCCCGACTGCCTGACGCCAGCGTCCACTTTTGTGCACACATTCCATTTCGTGCCCAA  
 GACATTTTCATTGTGGTGCGAAGCGTCCCCAGTTACGCTCACCTGTTTCCCGACCTCCT  
 TACTGTTCTGTGCGACAGAGCGGGCCACAGGCCGGTTCGCAGCC

**SEQ ID NO:85**

3'UTR de la nitrato-reductasa de *Chlorella vulgaris*

GCAGCAGCAGCTCGGATAGTATCGACACACTCTGGACGCTGGTTCGTGTGATGGACT  
 GTTGCCGCCACACTTGCTGCCTTGACCTGTGAATATCCCTGCCGCTTTTATCAAACAG  
 CCTCAGTGTGTTTGTATCTTGTGTGTACGCGCTTTTGGGAGTTGCTAGCTGCTTGTGCT  
 ATTTGCGAATACCACCCCCAGCATCCCCTTCCCTCGTTTCATATCGCTTGCATCCCAA  
 25 CCGCAACTTATCTACGCTGTCTGCTATCCCTCAGCGCTGCTCCTGCTCCTGCTCACT  
 GCCCTCGCACAGCCTTGGTTTGGGCTCCGCCTGTATTCTCCTGGTACTGCAACCTGT  
 AAACCAGCACTGCAATGCTGATGCACGGGAAGTAGTGGGATGGGAACACAAATGG  
 AGGATCC

**SEQ ID NO:86**

Secuencia de ADNc del péptido de tránsito de la estearoil-ACP-desaturasa de *Chlorella protothecoides* (UTEX 250) con codones optimizados.

ACTAGTATGGCCACCGCATCCACTTTCTCGGCGTTCAATGCCCGCTGCGGGCGACCTG  
 35 CGTCGCTCGGCGGGCTCCGGGCCCGGCGCCAGCGAGGCCCTCCCCGTGCGCGG  
 GCGCGCC

**SEQ ID NO:87**

Secuencia codificante con codones optimizados de la ACP-tioesterasa de *Ricinus communis* con el péptido de tránsito de la estearoil-ACP-desaturasa de *Chlorella protothecoides* UTEX250 de pSZ1375

ACTAGTATGGCCACCGCATCCACTTTCTCGGCGTTCAATGCCCGCTGCGGGCGACCTG  
 CGTCGCTCGGCGGGCTCCGGGCCCGGCGCCAGCGAGGCCCTCCCCGTGCGCGG  
 45 GCGCGCCCGCTCCTACGAGGTGGGCATCAACAAGACCGCCACCGTGGAGACCATCG  
 CCAACCTGCTGCAGGAGGTGGGCTGCAACCACGCCAGTCCGTGGGCTTCTCCACCG  
 ACGGCTTCGCCACCACCTCCATGCGCAAGATGCACCTGATCTGGGTGACCGCCC  
 GCATGCACATCGAGATCTACAAGTACCCCGCCTGGTCCGACGTGGTGGAGGTGGAG  
 ACCTGGTGCCAGTCCGAGGGCCGCATCGGCACCCGCCGCGACTGGATCCTGACCGA

CTACGCCACCGGCCAGATCATCGGCCGCGCCACCTCCAAGTGGGTGATGATGAACC  
 AGGACACCCGCGCCTGCAGAAGGTGACCGACGACGTGCGCGAGGAGTACCTGGTG  
 TTCTGCCCCCGCGAGCTGCGCCTGGCCTTCCCCGAGGAGAACAACCGCTCCTCCAAG  
 AAGATCTCCAAGCTGGAGGACCCCGCCCAGTACTCCAAGCTGGGCCTGGTGCCCCG  
 5 CCGCGCCGACCTGGACATGAACCAGCACGTGAACAACGTGACCTACATCGGCTGGG  
 TGCTGGAGTCCATCCCCAGGAGATCATCGACACCCACGAGCTGCAGACCATCACC  
 CTGGACTACCGCCGCGAGTGCCAGCACGACGACATCGTGGACTCCCTGACCTCCGTG  
 GAGCCCTCCGAGAACCTGGAGGCCGTGTCCGAGCTGCGCGGCACCAACGGCTCCGC  
 CACCACCACCGCCGGCGACGAGGACTGCCGCAACTTCTGCACCTGCTGCGCCTGTC  
 10 CGGCGACGGCCTGGAGATCAACCGCGGCCGCACCGAGTGGCGCAAGAAGTCCGCC  
 GCATGGACTACAAGGACCACGACGGCGACTACAAGGACCACGACATCGACTACAAG  
 GACGACGACGACAAGTGAATCGAT

**SEQ ID NO:88**

15 Secuencia de aminoácidos de la ACP-tioesterasa de *Ricinus communis* (N.º de acceso  
 ABS30422.1)

MLKVPCCNATDPIQSLSSQCRFLTHFNRPYFTRRPSIPTFFSSKNSSASLQAVVSDISSVE  
 SAACDSLANRLRLGKLTEDGFSYKEKFIIVRSYEVGINKTATVETIANLLQEVGCNHAQS  
 VGFSTDGFATTTSMRKMHLIWVTARMHIEIYKYPAWSDVVEVETWCQSEGRIGTRRDW  
 20 ILTDYATGQIIGRATSKWVMMNQDTRRLQKVTDDVREEYLVFCPRELRLAFPEENNRSS  
 KKISKLEDPAQYSKLGKLVPRRADLDMNQHVNNVTYIGWVLESIPQEIIDTHELQTITLDY  
 RRECQHDDIVDSLTSVEPESENLEAVSELRGTNGSATTTAGDEDCRNFLHLLRLSGDGLI  
 NRGRTIEWRKKKSAR

25

**SEQ ID NO:89**

5' UTR/promotor de TUB2 de *Chlamydomonas reinhardtii*

CTTTCTTGCCTATGACACTTCCAGCAAAGGTAGGGCGGGCTGCGAGACGGCTTCC  
 30 CGGCGCTGCATGCAACACCGATGATGCTTCGACCCCCGAAGCTCCTTCGGGGCTGC  
 ATGGGCGCTCCGATGCCGCTCCAGGGCGAGCGCTGTTTAAATAGCCAGGCCCCCGA  
 TTGCAAAGACATTATAGCGAGCTACCAAAGCCATATTCAAACACCTAGATCACTACC  
 ACTTCTACACAGGCCACTCGAGCTTGTGATCGCACTCCGCTAAGGGGGCGCCTCTTC  
 CTCTTCGTTTCAGTCACAACCCGCAAAC

35

**SEQ ID NO:90**

Porción de FADc del casete de expresión de ARN horquillado de pSZ1468

ACTAGTATGGCTATCAAGACGAACAGGCAGCCTGTGGAGAAGCCTCCGTTACGAT  
 40 CGGGACGCTGCGCAAGGCCATCCCCGCGCACTGTTTCGAGCGCTCGGCGCTTCGTAG  
 CAGCATGTACCTGGCCTTTGACATCGCGGTCATGTCCCTGCTCTACGTCGCGTCGAC  
 GTACATCGACCCTGCACCGGTGCCTACGTGGGTCAAGTACGGCATCATGTGGCCGCT  
 CTACTGGTTCTTCCAGGTGTGTTTGAAGGTTTTGGTTGCCCCGTATTGAGGTCCTGGTG  
 45 GCGCGCATGGAGGAGAAGGCGCCTGTCCCGCTGACCCCCCGGCTACCCTCCCGGC  
 ACCTTCCAGGGCGCGTACGGGAAGAACCAGTAGAGCGGCCACATGATGCCGTA  
 GACCCACGTAGGCACCGGTGCAGGGTCGATGTACGTCGACGCGACGTAGAGCAGGG  
 ACATGACCGCGATGTCAAAGGCCAGGTACATGCTGCTACGAAGCGCCGAGCGCTCG

AAACAGTGC GCGGGGATGGCCTTGC G CAGCGTCCCGATCGTGAACGGAGGCTTCTC  
CACAGGCTGCCTGTTCTGTTGATAGCCAT

**SEQ ID NO:91**

5 Porción relevante del casete de expresión de ARN horquillado para FADc de pSZ1468

GCTCTTCGCCGCGCCACTCCTGCTCGAGCGCGCCCGCGCGTGCGCCGCCAGCGCCT  
TGGCCTTTTCGCCGCGCTCGTGC GCGTCTGATGTCCATCACCAGGTCCATGAGGT  
CTGCCTTTCGCCGCGCTGAGCCACTGCTTCGTCCGGGCGGCCAAGAGGAGCATGAGG  
10 GAGGACTCCTGGTCCAGGGTCCCTGACGTGGTTCGCGGCTCTGGGAGCGGGCCAGCAT  
CATCTGGCTCTGCCGCACCGAGGCCGCTCCA ACTGGTCTCCAGCAGCCG CAGTCCG  
CCGCCGACCCTGGCAGAGGAAGACAGGTGAGGGGGGTATGAATTGTACAGAACAA  
CCACGAGCCTTGTCTAGGCAGAATCCCTACCAGTCATGGCTTTACCTGGATGACGGC  
CTGCGAACAGCTGTCCAGCGACCCTCGCTGCCGCCGCTTCTCCCGCACGCTTCTTTCC  
15 AGCACCGTGATGGCGCGAGCCAGCGCCGCACGCTGGCGCTGCGCTTCGCCGATCTG  
AGGACAGTCGGGGA ACTCTGATCAGTCTAAACCCCTTGC GCGTTAGTGTGCCATC  
CTTTGCAGACCGGTGAGAGCCGACTTGTGTGCGCCACCCCCACACCACCTCCTCC  
CAGACCAATTCTGTCACCTTTTTTGGCGAAGGCATCGGCCCTCGGCCTGCAGAGAGGAC  
AGCAGTGCCAGCCGCTGGGGGTTGGCGGATGCACGCTCAGGTACCCTTTCTTGCGC  
20 TATGACACTTCCAGCAAAAGGTAGGGCGGGCTGCGAGACGGCTTCCCGGCGCTGCA  
TGCAACACCGATGATGCTTCGACCCCCCGAAGCTCCTTCGGGGCTGCATGGGCGCTC  
CGATGCCGCTCCAGGGCGAGCGCTGTTTAAATAGCCAGGCCCCCGATTGCAAAGAC  
ATTATAGCGAGCTACCAAAGCCATATTCAAACACCTAGATCACTACCCTTCTACAC  
AGGCCACTCGAGCTTGTGATCGCACTCCGCTAAGGGGGCGCCTCTTCTCTTCGTTT  
25 CAGTACAACCCGCAAACGGCGCGCCATGCTGCTGCAGGCCTTCTGTTCTGCTGG  
CCGGCTTCGCCGCAAAGATCAGCGCCTCCATGACGAACGAGACGTCCGACCGCCCC  
CTGGTGCACCTTACCCCCAACAAGGGCTGGATGAACGACCCCAACGGCCTGTGGTA  
CGACGAGAAGGACGCCAAGTGGCACCTGTACTTCCAGTACAACCCGAACGACACCG  
TCTGGGGGACGCCCTTGTCTGGGGCCACGCCACGTCCGACGACCTGACCAACTGGG  
30 AGGACCAGCCCATCGCCATCGCCCCGAAGCGCAACGACTCCGGCGCCTTCTCCGGCT  
CCATGGTGGTGGACTACAACAACACCTCCGGCTTCTTCAACGACACCATCGACCCGC  
GCCAGCGCTGCGTGGCCATCTGGACCTACAACACCCCGGAGTCCGAGGAGCAGTAC  
ATCTCCTACAGCCTGGACGGCGGCTACACCTTACCGAGTACCAGAAGAACCCCGT  
GCTGGCCGCCAACTCCACCCAGTTCCGCGACCCGAAGGTCTTCTGGTACGAGCCCTC  
35 CCAGAAGTGGATCATGACCGCGGCCAAGTCCCAGGACTACAAGATCGAGATCTACT  
CCTCCGACGACCTGAAGTCTTGAAGCTGGAGTCCGCGTTCCGCAACGAGGGCTTCC  
TCGGCTACCAGTACGAGTGCCCCGGCCTGATCGAGGTCCCCACCGAGCAGGACCCC  
AGCAAGTCTACTGGGTGATGTTTCATCTCCATCAACCCCGGCGCCCCGGCCGGCGGC  
TCCTTCAACCAGTACTTCGTGCGCAGCTTCAACGGCACCCACTTCGAGGCCTTCGAC  
40 AACCAGTCCCGCGTGGTGGACTTCGGCAAGGACTACTACGCCCTGCAGACCTTCTTC  
AACACCGACCCGACCTACGGGAGCGCCCTGGGCATCGCGTGGGCTCCA ACTGGGA  
GTA CTCCGCTTCGTGCCACCAACCCCTGGCGCTCCTCCATGTCCCTCGTGCGCAA  
GTTCTCCCTCAACACCGAGTACCAGGCCAACCCGGAGACGGAGCTGATCAACCTGA  
AGGCCGAGCCGATCCTGAACATCAGCAACGCCGGCCCCCTGGAGCCGGTTCGCCACC  
45 AACACCACGTTGACGAAGGCCAACAGCTACAACGTGACCTGTCCAACAGCACCCGG  
CACCCCTGGAGTTCGAGCTGGTGTACGCCGTCAACACCACCCAGACGATCTCCAAGTC  
CGTGTTCGCGGACCTTCCCTCTGGTTCAAGGGCCTGGAGGACCCCGAGGAGTACCT  
CCGCATGGGCTTCGAGGTGTCCGCGTCTCCTTCTTCTTCTGGACCGCGGGAACAGCAA  
GGTGAAGTTCGTGAAGGAGAACCCCTACTTCAACCAACCGCATGAGCGTGAACAACC

AGCCCTTCAAGAGCGAGAACGACCTGTCCTACTACAAGGTGTACGGCTTGCTGGAC  
 CAGAACATCCTGGAGCTGTACTTCAACGACGGCGACGTCGTGTCCACCAACACCTAC  
 TTCATGACCACCGGGAACGCCCTGGGCTCCGTGAACATGACGACGGGGGTGGACAA  
 CCTGTTCTACATCGACAAGTTCCAGGTGCGCGAGGTCAAGTGACAATTGGCAGCAG  
 5 CAGCTCGGATAGTATCGACACACTCTGGACGCTGGTTCGTGTGATGGACTGTTGCCGC  
 CAACTTGGCTGCCTTGACCTGTGAATATCCCTGCCGCTTTTATCAAACAGCCTCAGTG  
 TGTTTGATCTTGTGTGTACGCGCTTTTGGCAGTTGCTAGCTGCTTGTGCTATTTGCGA  
 ATACCACCCCAAGCATCCCCTTCCCTCGTTTCATATCGCTTGCATCCCAACCGCAACT  
 TATCTACGCTGTCTGCTATCCCTCAGCGCTGCTCCTGCTCCTGCTCACTGCCCTCG  
 10 CACAGCCTTGTTTTGGGCTCCGCTGTATTCTCCTGGTACTGCAACCTGTAAACCAG  
 CACTGCAATGCTGATGCACGGGAAGTAGTGGGATGGGAACACAAATGGAGGATCCC  
 GCGTCTCGAACAGAGCGCGCAGAGGAACGCTGAAGGTCTCGCCTCTGTGCGACCTC  
 AGCGCGGCATACACCACAATAACCACCTGACGAATGCGCTTGGTTCTTCGTCCATTA  
 GCGAAGCGTCCGGTTCACACACGTGCCACGTTGGCGAGGTGGCAGGTGACAATGAT  
 15 CGGTGGAGCTGATGGTCGAAACGTTACAGCCTAGGGATATCGAATTCGGCCGACA  
 GGACGCGCGTCAAAGGTGCTGGTCGTGTATGCCCTGGCCGGCAGGTTCGTTGCTGCTG  
 CTGGTTAGTGATTCCGCAACCCTGATTTTGGCGTCTTATTTTGGCGTGGCAAACGCTG  
 GCGCCCGCGAGCCGGGCCGGCGGGCGATGCGGTGCCCCACGGCTGCCGGAATCCAAG  
 GGAGGCAAGAGCGCCCGGGTCAGTTGAAGGGCTTTACGCGCAAGGTACAGCCGCTC  
 20 CTGCAAGGCTGCGTGGTGGAATTGGACGTGCAGGTCCTGCTGAAGTTCCTCCACCGC  
 CTCACCAGCGGACAAAGCACCGGTGTATCAGGTCCGTGTCATCCACTCTAAAGAGCT  
 CGACTACGACCTACTGATGGCCCTAGATTCTTCATCAAAAACGCCTGAGACACTTGC  
 CCAGGATTGAAACTCCCTGAAGGGACCACCAGGGGCCCTGAGTTGTTCCCTTCCCCC  
 GTGGCGAGCTGCCAGCCAGGCTGTACCTGTGATCGAGGCTGGCGGGAAAATAGGCT  
 25 TCGTGTGCTCAGGTCATGGGAGGTGCAGGACAGCTCATGAAACGCCAACAATCGCA  
 CAATTCATGTCAAGCTAATCAGCTATTTCTCCTTTCACGAGCTGTAATTGTCCAAAAT  
 TCTGGTCTACCGGGGGTGATCCTTCGTGTACGGGCCCTTCCCTCAACCCTAGGTATG  
 CGCGCATGCGGTCCGCCGCAACTCGCGCGAGGGCCGAGGGTTTGGGACGGGCCGT  
 CCCGAAATGCAGTTGCACCCGGATGCGTGGCACCTTTTTTGGGATAATTTATGCAAT  
 30 GGACTGCTCTGCAAAAATTCTGGCTCTGTCGCCAACCCTAGGATCAGCGGCGTAGGAT  
 TTCGTAATCATTCGTCTGATGGGGAGCTACCGACTACCCTAATATCAGCCCGACTG  
 CCTGACGCCAGCGTCCACTTTTGTGCACACATTCCATTTCGTGCCCAAGACATTTCAAT  
 GTGGTGCAGCGTCCCGAGTTACGCTCACCTGTTTCCCGACCTCCTTACTGTTCTGT  
 CGACAGAGCGGGCCACAGGCCGGTTCGCAGCCACTAGTATGGCTATCAAGACGAAC  
 35 AGGCAGCCTGTGGAGAAGCCTCCGTTACGATCGGGACGCTGCGCAAGGCCATCCC  
 CGCGCACTGTTTCGAGCGCTCGGCGCTTCGTAGCAGCATGTACCTGGCCTTTGACAT  
 CGCGGTCATGTCCCTGCTCTACGTCGCGTTCGACGTACATCGACCCTGCACCGGTGCC  
 TACGTGGGTCAAGTACGGCATCATGTGGCCGCTCTACTGGTTCTTCCAGGTGTGTTT  
 GAGGGTTTTGGTTGCCCGTATTGAGGTCTGGTGGCGCGCATGGAGGAGAAGGCGC  
 40 CTGTCCCGCTGACCCCCCGGCTACCCTCCCGGCACCTTCCAGGGCGCGTACGGGAA  
 GAACCAGTAGAGCGGCCACATGATGCCGTAATTGACCCACGTAGGCACCGGTGCAG  
 GGTCGATGTACGTCGACGCGACGTAGAGCAGGGACATGACCGCGATGTCAAAGGCC  
 AGGTACATGCTGCTACGAAGCGCCGAGCGCTCGAAACAGTGCGCGGGGATGGCCTT  
 GCGCAGCGTCCCGATCGTGAACGGAGGCTTCTCCACAGGCTGCCTGTTCTGCTTGT  
 45 AGCCATCTCGAGGCAGCAGCAGCTCGGATAGTATCGACACACTCTGGACGCTGGTC  
 GTGTGATGGACTGTTGCCGCCCACTTGTGCTGCCTTACCTGTGAATATCCCTGCCGC  
 TTTTATCAAACAGCCTCAGTGTGTTTGTGATCTTGTGTGTACGCGCTTTTGGCAGTTGCT  
 AGCTGCTTGTGCTATTTGCGAATAACCACCCCAAGCATCCCCTTCCCTCGTTTCATATC  
 GCTTGCATCCCAACCGCAACTTATCTACGCTGTCTGCTATCCCTCAGCGCTGCTCCT

GCTCCTGCTCACTGCCCCCTCGCACAGCCTTGGTTTGGGCTCCGCCTGTATTCTCCTGG  
 TACTGCAACCTGTAAACCAGCACTGCAATGCTGATGCACGGGAAGTAGTGGGATGG  
 GAACACAAATGGAAAGCTGTAGAGCTCTTGTTTTCCAGAAGGAGTTGCTCCTTGAGC  
 CTTTCATTCTCAGCCTCGATAACCTCCAAAGCCGCTCTAATTGTGGAGGGGGTTTCGA  
 5 ATTTAAAAGCTTGGAATGTTGGTTCGTGCGTCTGGAACAAGCCCAGACTTGTTGCTC  
 ACTGGGAAAAGGACCATCAGCTCCAAAAAACTTGCCGCTCAAACCGCGTACCTCTG  
 CTTTCGCGCAATCTGCCCTGTTGAAATCGCCACCACATTCATATTGTGACGCTTGAG  
 CAGTCTGTAATTGCCTCAGAATGTGGAATCATCTGCCCCCTGTGCGAGCCCATGCCA  
 GGCATGTGCGGGGCGAGGACACCCGCCACTCGTACAGCAGACCATTATGCTACCTC  
 10 ACAATAGTTCATAACAGTGACCATATTTCTCGAAGCTCCCCAACGAGCACCTCCATG  
 CTCTGAGTGGCCACCCCCCGGCCCTGGTGCTTGCGGAGGGCAGGTCAACCGGCATG  
 GGGCTACCGAAATCCCCGACCGGATCCCACCACCCCCGCGATGGGAAGAATCTCTC  
 CCCGGGATGTGGGCCACCACCAGCACAACCTGCTGGCCCAGGCGAGCGTCAAACC  
 ATACCACACAAATATCCTTGGCATCGGCCCTGAATTCTTCTGCCGCTCTGCTACCC  
 15 GGTGCTTCTGTCCGAAGCAGGGGTTGCTAGGGATCGCTCCGAGTCCGCAAACCCTTG  
 TCGCGTGGCGGGGCTTGTTCGAGCTTGAAGAGC

**SEQ ID NO:92**

Porción de FADc del casete de expresión de ARN horquillado de pSZ1469

20 ACTAGTATGGCTATCAAGACGAACAGGCAGCCTGTGGAGAAGCCTCCGTTACAGAT  
 CGGGACGCTGCGCAAGGCCATCCCCGCGCACTGTTTCGAGCGCTCGGCGCTTCGTAG  
 CAGCATGTACCTGGCCTTTGACATCGCGGTTCATGTCCCTGCTCTACGTGCGGTCGAC  
 GTACATCGACCCTGCACCGGTGCCTACGTGGGTCAAGTACGGCATCATGTGGCCGCT  
 25 CTACTGGTTCCTCCAGGTGTGTTTGAGGGTTTTGGTTGCCCGTATTGAGGTCCTGGTG  
 GCGCGCATGGAGGAGAAGGCGCCTGTCCCGCTGACCCCCCGGCTACCCTCCCGGC  
 ACCTTCCAGGGCGCGTACGGGAAGAACCAGTAGAGCGGCCACATGATGCCGTA  
 GACCCACGTAGGCACCGGTGCAGGGTCGATGTACGTCGACGCGACGTAGAGCAGGG  
 ACATGACCGCGATGTCAAAGGCCAGGTACATGCTGCTACGAAGCGCCGAGCGCTCG  
 30 AAACAGTGC GCGGGGATGGCCTTGCGCAGCGTCCCGATCGTGAACGGAGGCTTCTC  
 CACAGGCTGCCTGTTCGTCTTGATAGCCAT

**SEQ ID NO:93**

Porción relevante del casete de expresión de ARN horquillado para FADc de pSZ1469

35 GCTCTTCGCCGCGCCACTCCTGCTCGAGCGCGCCCGCGCGTGCGCCGCCAGCGCCT  
 TGGCCTTTTCGCCGCGCTCGTGC GCGTGCCTGATGTCCATCACCAGGTCCATGAGGT  
 CTGCCTTGCGCCGGCTGAGCCACTGCTTCGTCCGGGCGGCCAAGAGGAGCATGAGG  
 GAGGACTCCTGGTCCAGGGTCTGACGTGGTTCGCGGCTCTGGGAGCGGGCCAGCAT  
 40 CATCTGGCTCTGCCGCACCGAGGCCGCCTCCAACCTGGTCTCCAGCAGCCGCGAGTCG  
 CCGCCGACCCTGGCAGAGGAAGACAGGTGAGGGGGGTATGAATTGTACAGAACAA  
 CCACGAGCCTTGTCTAGGCAGAATCCCTACCAGTCATGGCTTTACCTGGATGACGGC  
 CTGCGAACAGCTGTCCAGCGACCCTCGCTGCCGCCGCTTCTCCCGCACGCTTCTTTCC  
 AGCACCGTGATGGCGCGAGCCAGCGCCGCACGCTGGCGCTGCGCTTCGCCGATCTG  
 45 AGGACAGTCGGGGAACCTCTGATCAGTCTAAACCCCTTGCGCGTTAGTGTGTCATC  
 CTTTGCAGACCGGTGAGAGCCGACTTGTGTTGTGCGCCACCCCCACACCACCTCCTCC  
 CAGACCAATTCTGTACCTTTTTGGCGAAGGCATCGGCCTCGGCCTGCAGAGAGGAC  
 AGCAGTGCCAGCCGCTGGGGGTTGGCGGATGCACGCTCAGGTACCCTTTCTTGCGC  
 TATGACACTTCAGCAAAAGGTAGGGCGGGCTGCGAGACGGCTTCCCGGCGCTGCA

TGCAACACCGATGATGCTTCGACCCCCCGAAGCTCCTTCGGGGCTGCATGGGGCGCTC  
 CGATGCCGCTCCAGGGCGAGCGCTGTTTAAATAGCCAGGCCCCCGATTGCAAAGAC  
 ATTATAGCGAGCTACCAAAGCCATATTCAAACACCTAGATCACTACCACTTCTACAC  
 AGGCCACTCGAGCTTGTGATCGCACTCCGCTAAGGGGGCGCCTCTTCTCTTCGTTT  
 5 CAGTCACAACCCGCAAACGGCGCGCCATGCTGCTGCAGGCCTTCTGTTCTGCTGG  
 CCGGCTTCGCCGCCAAGATCAGCGCCTCCATGACGAACGAGACGTCCGACCGCCCC  
 CTGGTGCACCTCACCCCCAACAAAGGGCTGGATGAACGACCCCAACGGCCTGTGGTA  
 CGACGAGAAGGACGCCAAGTGGCACCTGTACTTCCAGTACAACCCGAACGACACCG  
 TCTGGGGGACGCCCTTGTCTGGGGCCACGCCACGTCCGACGACCTGACCAACTGGG  
 10 AGGACCAGCCCATCGCCATCGCCCCGAAGCGCAACGACTCCGGCGCCTTCTCCGGCT  
 CCATGGTGGTGGACTACAACAACACCTCCGGCTTCTTCAACGACACCATCGACCCGC  
 GCCAGCGCTGCGTGGCCATCTGGACCTACAACACCCCGGAGTCCGAGGAGCAGTAC  
 ATCTCCTACAGCCTGGACGGCGGCTACACCTTACCGAGTACCAGAAGAACCCCGT  
 GCTGGCCGCCAACTCCACCCAGTTCCGCGACCCGAAGGTCTTCTGGTACGAGCCCTC  
 15 CCAGAAGTGGATCATGACCGCGGCCAAGTCCCAGGACTACAAGATCGAGATCTACT  
 CCTCCGACGACCTGAAGTCCTGGAAGCTGGAGTCCGCGTTCGCCAACGAGGGCTTCC  
 TCGGCTACCAGTACGAGTGCCCCGGCCTGATCGAGGTCCCCACCGAGCAGGACCCC  
 AGCAAGTCTACTGGGTGATGTTTCATCTCCATCAACCCCGGCGCCCCGGCCGGCGGC  
 TCCTTCAACCAGTACTTCGTGCGCAGCTTCAACGGCACCCACTTCGAGGCCTTCGAC  
 20 AACAGTCCC GCGTGGTGGACTTCGGCAAGGACTACTACGCCCTGCAGACCTTCTTC  
 AACACCGACCCGACCTACGGGAGCGCCCTGGGCATCGCGTGGGCCTCCA ACTGGGA  
 GACTCCGCCTTCGTGCCACCAACCCCTGGCGCTCCTCCATGTCCCTCGTGCGCAA  
 GTTCTCCCTCAACACCGAGTACCAGGCCAACCCGGAGACGGAGCTGATCAACCTGA  
 AGGCCGAGCCGATCCTGAACATCAGCAACGCCGGCCCCCTGGAGCCGGTTCGCCACC  
 25 AACACCACGTTGACGAAGGCCAACAGCTACAACGTGACCTGTCCAACAGCACCCGG  
 CACCCTGGAGTTCGAGCTGGTGTACGCCGTCAACACCACCCAGACGATCTCCAAGTC  
 CGTGTTCGCGGACCTCTCCCTCTGGTTCAAGGGCCTGGAGGACCCCGAGGAGTACCT  
 CCGCATGGGCTTCGAGGTGTCCGCGTCTCCTTCTTCTGACCGCGGGAACAGCAA  
 GGTGAAGTTCGTGAAGGAGAACCCCTACTTCAACCAACCGCATGAGCGTGAACAACC  
 30 AGCCCTTCAAGAGCGAGAACGACCTGTCCTACTACAAGGTGTACGGCTTGCTGGAC  
 CAGAACATCCTGGAGCTGTACTTCAACGACGGCGACGTCGTGTCCACCAACACCTAC  
 TTCATGACCACCGGGAACGCCCTGGGCTCCGTGAACATGACGACGGGGGTGGACAA  
 CCTGTTCTACATCGACAAGTTCCAGGTGCGCGAGGTCAAGTGACAATTGGCAGCAG  
 CAGCTCGGATAGTATCGACACACTCTGGACGCTGGTTCGTGTGATGGACTGTTGCCGC  
 35 CACACTTGCTGCCTTGACCTGTGAATATCCCTGCCGCTTTTATCAAACAGCCTCAGTG  
 TGTTTGATCTTGTGTGTACGCGCTTTTGCAGTTGCTAGCTGCTTGTGCTATTTGCGA  
 ATACCACCCCGAGCATCCCCTTCCCTCGTTTCATATCGCTTGCATCCCAACCGCAACT  
 TATCTACGCTGTCTGCTATCCCTCAGCGCTGCTCCTGCTCCTGCTCACTGCCCTCG  
 CACAGCCTTGTTTTGGGCTCCGCTGTATTCTCCTGGTACTGCAACCTGTAAACCAG  
 40 CACTGCAATGCTGATGCACGGGAAGTAGTGGGATGGGAACACAAATGGAGGATCCC  
 GCGTCTCGAACAGAGCGCGCAGAGGAACGCTGAAGGTCTCGCCTCTGTGCGACCTC  
 AGCGCGGCATACACCACAATAACCACCTGACGAATGCGCTTGGTTCTTCGTCCATTA  
 GCGAAGCGTCCGGTTCACACACGTGCCACGTTGGCGAGGTGGCAGGTGACAATGAT  
 CGGTGGAGCTGATGGTCGAAACGTTACAGCCTAGGGATATCGAATTCCTTTCTTGC  
 45 GCTATGACACTTCCAGCAAAAGGTAGGGCGGGCTGCGAGACGGCTTCCCGGCGCTG  
 CATGCAACACCGATGATGCTTCGACCCCCCGAAGCTCCTTCGGGGCTGCATGGGGCGC  
 TCCGATGCCGCTCCAGGGCGAGCGCTGTTTAAATAGCCAGGCCCCCGATTGCAAAG  
 ACATTATAGCGAGCTACCAAAGCCATATTCAAACACCTAGATCACTACCACTTCTAC  
 ACAGGCCACTCGAGCTTGTGATCGCACTCCGCTAAGGGGGCGCCTCTTCTCTTCGT

TTCAGTCACAACCCGCAAACACTAGTATGGCTATCAAGACGAACAGGCAGCCTGTG  
 GAGAAGCCTCCGTTACGATCGGGACGCTGCGCAAGGCCATCCCCGCGCACTGTTTC  
 GAGCGCTCGGGCCTTCGTAGCAGCATGTACCTGGCCTTTGACATCGCGGTCATGTCC  
 CTGCTCTACGTCGCGTCGACGTACATCGACCCTGCACCGGTGCCTACGTGGGTCAAG  
 5 TACGGCATCATGTGGCCGCTCTACTGGTTCCTCCAGGTGTGTTTGGGGTTTTGGTTG  
 CCCGTATTGAGGTCCTGGTGGCGCGCATGGAGGAGAAGGCGCCTGTCCCCTGACC  
 CCCCCGGCTACCCTCCCAGGACCTTCCAGGGGCGCGTACGGGAAGAACCAGTAGAGC  
 GGCCACATGATGCCGTACTTGACCCACGTAGGCACCGGTGCAGGGTTCGATGTACGT  
 CGACGCGACGTAGAGCAGGGACATGACCGCGATGTCAAAGGCCAGGTACATGCTGC  
 10 TACGAAGCGCCGAGCGCTCGAAACAGTGCAGCGGGGATGGCCTTGCGCAGCGTCCCC  
 ATCGTGAACGGAGGCTTCTCCACAGGCTGCCTGTTGCTTTGATAGCCATCTCGAGG  
 CAGCAGCAGCTCGGATAGTATCGACACACTCTGGACGCTGGTCTGTGATGGACTGT  
 TGCCGCCACACTTGCTGCCTTGACCTGTGAATATCCCTGCCGCTTTTATCAAACAGCC  
 TCAGTGTGTTTGATCTTGTGTGTACGCGCTTTTGCAGTTGCTAGCTGCTTGTGCTAT  
 15 TTGCGAATACCACCCCCAGCATCCCCTTCCCTCGTTTCATATCGCTTGCATCCCAACC  
 GCAACTTATCTACGCTGTCTGCTATCCCCTCAGCGCTGCTCCTGCTCCTGCTCACTGC  
 CCCTCGCACAGCCTTGGTTTGGGCTCCGCTGTATTCTCCTGGTACTGCAACCTGTAA  
 ACCAGCACTGCAATGCTGATGCACGGGAAGTAGTGGGATGGGAACACAAATGGAA  
 AGCTGTAGAGCTCTTGTGTTTCCAGAAGGAGTTGCTCCTTGAGCCTTTCATTCTCAGCC  
 20 TCGATAACCTCCAAAGCCGCTCTAATTGTGGAGGGGGTTCGAATTTAAAAGCTTGGA  
 ATGTTGGTTCGTGCGTCTGGAACAAGCCAGACTTGTGCTCACTGGGAAAAGGACC  
 ATCAGCTCCAAAAAATTTGCCGCTCAAACCGCGTACCTCTGCTTTCGCGCAATCTGC  
 CCTGTTGAAATCGCCACCACATTCATATTGTGACGCTTGAGCAGTCTGTAATTGCCT  
 CAGAATGTGGAATCATCTGCCCCCTGTGCGAGCCCATGCCAGGCATGTCGCGGGCG  
 25 AGGACACCCGCCACTCGTACAGCAGACCATTATGCTACCTCACAATAGTTCATAACA  
 GTGACCATATTTCTCGAAGCTCCCCAACGAGCACCTCCATGCTCTGAGTGGCCACCC  
 CCCGGCCCTGGTGTGCTTGCAGGAGGGCAGGTCAACCGGCATGGGGCTACCGAAATCCC  
 CGACCGGATCCCACCACCCCCGCGATGGGAAGAATCTCTCCCCGGGATGTGGGCCC  
 ACCACCAGCACAACTGCTGGCCCAGGCGAGCGTCAAACCATAACCACACAAATATC  
 30 CTTGGCATCGGCCCTGAATTCCTTCTGCCGCTCTGCTACCCGGTGTCTCTGTCCGAAG  
 CAGGGGTTGCTAGGGATCGCTCCGAGTCCGCAAACCCTTGTGCGGTGGCGGGGCTTG  
 TTCGAGCTTGAAGAGC

**SEQ ID NO:94**

35 Porción de FADc del casete de expresión de ARN horquillado de pSZ1470

ACTAGTTCACTTGTGGAACCAGAGCGCGGAGTCGTCCTCGGGCGCGTCCGGGACGA  
 CGTAGCGGCAGTCGCGCCAGTCCTCCCACAGGGCGCGGCCGACCCAGCGGCTGTCC  
 GACTGGTAGTACTTGCCCAGGATGGGCTGATGGCGGCGGAGGCCTCCTCGGCGTG  
 40 GTAGTGCGGGATGGTGTGTAAGAGGTGGTGCAGCACGTGGGTGTGCGGAGATGTGGT  
 GCAGGATGTTGTCCATGAAGGGCGGGCCCATGGAGCGGTCCACGGTGGCCATGGCG  
 CCGCGCAGCCAGTCCCAGTCCTTCTCGAAGTAGTGCAGGACGCGCCGGGTGCGTGTGC  
 TGGAGCAGCGTGATGAGCACGAGCCACATGTTACGATCAGGTAGGGCACCACGTA  
 GGTCTTGACCAGCCAGGCCAGCCCAGCCCATGGTGCAGGCCAGCACGCTGAGCCCCTGA  
 45 GCACCGCCACCAGCGCCAGGTTCGGAGATGACCACCTCGATGCGCTCGCGCTTGTG  
 AAGATGGGCGACCACGGGTCAAAGTGGTTGGCGAAGCGCGGGTACGGCCGCGAGG  
 CGACGTTGAACATGAGGTACAGCGGCCAGCCCAGGGTTCAGGGTACAGCACCTTG  
 CCCATGCGGATGGGCAGCCACTCCTCCCCTCCAGGCCCTCGTGCAGCCACTGCGCGG  
 TCGGCGGCACAAACACCTCGTCCTTGTCCAGGCACCCCGTGTGGAGTGGTGGCGG

CGGTGCGAGTGCTTCCAGGAGTAGTAGGGCACCAGCAGCAGGCTGTGGAACACCAG  
 GCCCACGCCGTCGTTGATGGCCTGGCTGGAGGAAAAGGCCTGGTGGCCGCACTCGT  
 GCGCGCACACCCAGACACCCGTCGCGAAGGCGCCCTGGAAGGTGCCGGGAGGGTAG  
 CCGGGGGGGTTCAGCGGGACAGGCGCCTTCTCCTCCATGCGCGCCACCAGGACCTCA  
 5 ATACGGGCAACCAAAACCCTCAAACACACCTGGAAGAACCAGTAGAGCGGCCACAT  
 GATGCCGTACTIONTACCCACGTAGGCACCCGGTGCAGGGTCGATGTACGTCGACGCGA  
 CGTAGAGCAGGGACATGACCGCGATGTCAAAGGCCAGGTACATGCTGCTACGAAGC  
 GCCGAGCGCTCGAAACAGTGCAGCGGGGATGGCCTTGCAGCAGCGTCCCGATCGTGAA  
 CGGAGGCTTCTCCACAGGCTGCCTGTTTCGTCTTGATAGCCAT

**SEQ ID NO:95**

Porción relevante del casete de expresión de ARN horquillado para FADc de pSZ1470

GCTCTTCGCCGCGCCACTCCTGCTCGAGCGCGCCCGCGCGTGCGCCGCCAGCGCCT  
 15 TGGCCTTTTCGCCGCGCTCGTGCAGCGCTCGTGTCCATCACCAGGTCCATGAGGT  
 CTGCCTTTCGCCGCGCTGAGCCACTGCTTCGTCCGGGCGGCCAAGAGGAGCATGAGG  
 GAGGACTCCTGGTCCAGGGTCCAGCGTGGTTCGCGGCTCTGGGAGCGGGCCAGCAT  
 CATCTGGCTCTGCCGCACCGAGGCCCGCCTCCAACCTGGTCCCTCCAGCAGCCGCAGTGC  
 CCGCCGACCCTGGCAGAGGAAGACAGGTGAGGGGGGTATGAATTGTACAGAACAA  
 20 CCACGAGCCTTGTCTAGGCAGAATCCCTACCAGTCATGGCTTTACCTGGATGACGGC  
 CTGCGAACAGCTGTCCAGCGACCCTCGCTGCCGCCGCTTCTCCCGCACGCTTCTTTCC  
 AGCACCGTGATGGCGCGAGCCAGCGCCGCACGCTGGCGCTGCGCTTCGCCGATCTG  
 AGGACAGTCGGGGAACCTGATCAGTCTAAACCCCTTGCAGCGTTAGTGTGCCATC  
 CTTTGCAGACCCGGTGAGAGCCGACTTGTGTGCGCCACCCCCACACCACCTCCTCC  
 25 CAGACCAATTCTGTACCTTTTTGGCGAAGGCATCGGCCTCGGCCTGCAGAGAGGAC  
 AGCAGTGCCAGCCGCTGGGGGTTGGCGGATGCACGCTCAGGTACCCTTTCTTGCAG  
 TATGACACTTCCAGCAAAAGGTAGGGCGGGCTGCGAGACGGCTTCCCGGCGCTGCA  
 TGCAACACCGATGATGCTTCGACCCCCCGAAGCTCCTTCGGGGCTGCATGGGCGCTC  
 CGATGCCGCTCCAGGGCGAGCGCTGTTTAAATAGCCAGGCCCCCGATTGCAAAGAC  
 30 ATTATAGCGAGCTACCAAAGCCATATTCAAACACCTAGATCACTACCACTTCTACAC  
 AGGCCACTCGAGCTTGTGATCGCACTCCGCTAAGGGGGCGCCTCTTCTCTTCGTTT  
 CAGTACAACCCGCAAACGGCGCGCCATGCTGCTGCAGGCCTTCTGTTCTCTGCTGG  
 CCGGCTTCGCCGCCAAGATCAGCGCCTCCATGACGAACGAGACGTCCGACCCGCCCC  
 CTGGTGCACCTTACCCCCAACAAAGGGCTGGATGAACGACCCCAACGGCCTGTGGTA  
 35 CGACGAGAAGGACGCCAAGTGGCACCTGTACTTCCAGTACAACCCGAACGACACCG  
 TCTGGGGGACGCCCTTGTCTGGGGCCACGCCACGTCCGACGACCTGACCAACTGGG  
 AGGACCAGCCCATCGCCATCGCCCCGAAGCGCAACGACTCCGGCGCCTTCTCCGGCT  
 CCATGGTGGTGGACTACAACAACACCTCCGGCTTCTTCAACGACACCATCGACCCGC  
 GCCAGCGCTGCGTGGCCATCTGGACCTACAACACCCCGGAGTCCGAGGAGCAGTAC  
 40 ATCTCCTACAGCCTGGACGGCGGCTACACCTTACCGAGTACCAGAAGAACCCCGT  
 GCTGGCCGCCAACTCCACCCAGTTCGCGACCCGAAGGTCTTCTGGTACGAGCCCTC  
 CCAGAAGTGGATCATGACCGCGGCCAAGTCCCAGGACTACAAGATCGAGATCTACT  
 CCTCCGACGACCTGAAGTCTTGGAAAGCTGGAGTCCGCGTTCGCCAACGAGGGCTTCC  
 TCGGCTACCAGTACGAGTGCCCCGGCCTGATCGAGGTCCCCACCGAGCAGGACCCC  
 45 AGCAAGTCTACTGGGTGATGTTTCATCTCCATCAACCCCGGCGCCCCGGCCGGCGGC  
 TCCTTCAACCAGTACTTCGTGCGCAGCTTCAACGGCACCCACTTCGAGGCCTTCGAC  
 AACAGTCCCAGTGGTGGACTTCGGCAAGGACTACTACGCCCTGCAGACCTTCTTC  
 AACACCGACCCGACCTACGGGAGCGCCCTGGGCATCGCGTGGGCCCTCCAACCTGGGA  
 GTACTCCGCTTCGTGCCACCAACCCCTGGCGCTCCTCCATGTCCCTCGTGCGCAA

GTTCTCCCTCAACACCGAGTACCAGGCCAACCCGGAGACGGAGCTGATCAACCTGA  
 AGGCCGAGCCGATCCTGAACATCAGCAACGCCGGCCCTGGAGCCGGTTCGCCACC  
 AACACCACGTTGACGAAGGCCAACAGCTACAACGTTCGACCTGTCCAACAGCACCGG  
 CACCCTGGAGTTCGAGCTGGTGTACGCCGTAAACACCACCCAGACGATCTCCAAGTC  
 5 CGTGTTCGCGGACCTCTCCCTCTGGTTCAAGGGCCTGGAGGACCCCGAGGAGTACCT  
 CCGCATGGGCTTCGAGGTGTCCGCGTCCTCCTTCTTCTGACCGCGGGAACAGCAA  
 GGTGAAGTTCGTGAAGGAGAACCCCTACTTCACCAACCGCATGAGCGTGAACAACC  
 AGCCCTTCAAGAGCGAGAACGACCTGTCCTACTACAAGGTGTACGGCTTGCTGGAC  
 CAGAACATCCTGGAGCTGTACTTCAACGACGGCGACGTCGTGTCCACCAACACCTAC  
 10 TTCATGACCACCGGGAACGCCCTGGGCTCCGTGAACATGACGACGGGGGTGGACAA  
 CCTGTTCTACATCGACAAGTTCAGGTGCGCGAGGTCAAGTGACAATTGGCAGCAG  
 CAGCTCGGATAGTATCGACACACTCTGGACGCTGGTCGTGTGATGGACTGTTGCCGC  
 CAACTTGGCTGCCTTGACCTGTGAATATCCCTGCCGCTTTTATCAAACAGCCTCAGTG  
 TGTGATCTTGTGTGTACGCGCTTTTGGCAGTTGCTAGCTGCTTGTGCTATTTGCGA  
 15 ATACCACCCAGCATCCCCTTCCCTCGTTTCATATCGCTTGCATCCCAACCGCAACT  
 TATCTACGCTGTCTGCTATCCCTCAGCGCTGCTCCTGCTCCTGCTCACTGCCCTCG  
 CACAGCCTTGGTTTGGGCTCCGCTGTATTCTCCTGGTACTGCAACCTGTAAACCAG  
 CACTGCAATGCTGATGCACGGGAAGTAGTGGGATGGGAACACAAATGGAGGATCCC  
 GCGTCTCGAACAGAGCGCGCAGAGGAACGCTGAAGGTCTCGCCTCTGTGCGCACCTC  
 20 AGCGCGGCATACACCACAATAACCACCTGACGAATGCGCTTGGTTCTTCGTCCATTA  
 GCGAAGCGTCCGGTTCACACACGTGCCACGTTGGCGAGGTGGCAGGTGACAATGAT  
 CGGTGGAGCTGATGGTCGAAACGTTACAGCCTAGGGATATCGAATTCGGCCGACA  
 GGACGCGCGTCAAAGGTGCTGGTCGTGTATGCCCTGGCCGGCAGGTTCGTTGCTGCTG  
 CTGGTTAGTGATTCCGCAACCCTGATTTTGGCGTCTTATTTTGGCGTGGCAAACGCTG  
 25 GCGCCCGCGAGCCGGGCCGGCGGCGATGCGGTGCCCCACGGCTGCCGGAATCCAAG  
 GGAGGCAAGAGCGCCCGGGTCAGTTGAAGGGCTTACGCGCAAGGTACAGCCGCTC  
 CTGCAAGGCTGCGTGGTGGAAATTGGACGTGCAGGTCTGCTGAAGTTCCTCCACCGC  
 CTCACCAGCGGACAAAGCACCGGTGTATCAGGTCCGTGTCATCCACTCTAAAGAGCT  
 CGACTACGACCTACTGATGGCCCTAGATTCTTCATCAAAAACGCCTGAGACACTTGC  
 30 CCAGGATTGAAACTCCCTGAAGGGACCACCAGGGGCCCTGAGTTGTTCCCTTCCCCC  
 GTGGCGAGCTGCCAGCCAGGCTGTACCTGTGATCGAGGCTGGCGGGAAAATAGGCT  
 TCGTGTGCTCAGGTCATGGGAGGTGCAGGACAGCTCATGAAACGCCAACAATCGCA  
 CAATTCATGTCAAGCTAATCAGCTATTTCTTTCACGAGCTGTAATTGTCCAAAAT  
 TCTGGTCTACCGGGGGTGTATCCTTCGTGTACGGGCCCTTCCCTCAACCCTAGGTATG  
 35 CGCGCATGCGGTCCCGCGCAACTCGCGCGAGGGCCGAGGGTTTGGGACGGGCCGT  
 CCCGAAATGCAGTTGCACCCGGATGCGTGGCACCTTTTTTGGGATAATTTATGCAAT  
 GGACTGCTCTGCAAAATTCTGGCTCTGTCGCCAACCCCTAGGATCAGCGGCGTAGGAT  
 TTCGTAATCATTCGTCTCTGATGGGGAGCTACCGACTACCCTAATATCAGCCCGACTG  
 CCTGACGCCAGCGTCCACTTTTGTGCACACATTCCATTTCGTGCCCAAGACATTTCAAT  
 40 GTGGTGCGAAGCGTCCCCAGTTACGCTCACCTGTTTCCCGACCTCCTTACTGTTCTGT  
 CGACAGAGCGGGCCACAGGCCGGTTCGCAGCCACTAGTTCACTTGTGGAACCAGAG  
 CGCGGAGTCGTCTCGGGCGCGTCCGGGACGACGTAGCGGCAGTCGCGCCAGTCCT  
 CCCACAGGGCGCGGCCGACCCAGCGGCTGTCGGACTGGTAGTACTTGCCAGGATG  
 GGCTGATGGCGGCGGAGGCCTCCTCGGCGTGGTAGTGCGGGATGGTGTGTAAGAG  
 45 GTGGTGCAGCACGTGGGTGTCCGAGATGTGGTGCAGGATGTTGTCCATGAAGGGCG  
 GGCCCATGGAGCGGTCCACGGTGGCCATGGCGCCGCGCAGCCAGTCCCAGTCCTTCT  
 CGAAGTAGTGCGGCAGCGCCGGGTGCGTGTGCTGGAGCAGCGTGATGAGCACGAGC  
 CACATGTTACGATCAGGTAGGGCACACGTAGGTCTTGACCAGCCAGGCCAGCC  
 CATGGTGCGGCCAGCACGCTGAGCCCGCTGAGCACCGCCACCAGCGCCAGGTCCG

AGATGACCACCTCGATGCGCTCGCGCTTGCTGAAGATGGGCGACCACGGGTCAAAG  
 TGGTTGGCGAAGCGCGGGTACGGCCGCGAGGCGACGTTGAACATGAGGTACAGCGG  
 CCAGCCCAGGGTCAGGGTGACCAGCACCTTGCCCATGCGGATGGGCAGCCACTCCT  
 CCCACTCCAGGCCCTCGTGCGCCACTGCGCGGTGCGGGCGGCACAAACACCTCGTCCT  
 5 TGTCCAGGCACCCCGTGTGGAGTGGTGGCGGGCGGTGCGAGTGCTTCCAGGAGTAG  
 TAGGGCACCAGCAGCAGGCTGTGGAACACCAGGCCACGCCGTCGTTGATGGCCTG  
 GCTGGAGGAAAAGGCCTGGTGGCCGCACTCGTGCGCGCACACCCAGACACCCGTGC  
 CGAAGGCGCCCTGGAAGGTGCCGGGAGGGTAGCCGGGGGGGTCAGCGGGACAGGC  
 GCCTTCTCCTCCATGCGCGCCACCAGGACCTCAATACGGGCAACCAAAACCTCAAA  
 10 CACACCTGGAAGAACCAGTAGAGCGGCCACATGATGCCGTACTTGACCCACGTAGG  
 CACCGGTGCAGGGTTCGATGTACGTGACGCGACGTAGAGCAGGGACATGACCCGCGA  
 TGTCAAAGGCCAGGTACATGCTGCTACGAAGCGCCGAGCGCTCGAAACAGTGCGCG  
 GGGATGGCCTTGCGCAGCGTCCCGATCGTGAACGGAGGCTTCTCCACAGGCTGCCTG  
 TTCGTCTTGATAGCCATCTCGAGGCAGCAGCAGCTCGGATAGTATCGACACACTCTG  
 15 GACGCTGGTCGTGTGATGGACTGTTGCCGCCACACTTGCTGCCTTGACCTGTGAATA  
 TCCCTGCCGCTTTTATCAAACAGCCTCAGTGTGTTTGATCTTGTGTGTACGCGCTTTT  
 GCGAGTTGCTAGCTGCTTGTGCTATTTGCGAATACCACCCCCAGCATCCCCTTCCCTC  
 GTTTCATATCGCTTGCATCCCAACCGCAACTTATCTACGCTGTCTGCTATCCCTCAG  
 CGCTGCTCCTGCTCCTGCTCACTGCCCTCGCACAGCCTTGGTTTGGGCTCCGCCTGT  
 20 ATTCTCCTGGTACTGCAACCTGTAAACCAGCACTGCAATGCTGATGCACGGGAAGTA  
 GTGGGATGGGAACACAAATGGAAAGCTGTAGAGCTCTTGTTTTCCAGAAGGAGTTG  
 CTCCTTGAGCCTTTCATTCTCAGCCTCGATAACCTCCAAAGCCGCTCTAATTGTGGAG  
 GGGGTTCGAATTTAAAAGCTTGGAAATGTTGGTTTCGTGCGTCTGGAACAAGCCCAGAC  
 TTGTTGCTCACTGGGAAAAGGACCATCAGCTCCAAAAAACTTGCCGCTCAAACCGC  
 25 GTACCTCTGCTTTCGCGCAATCTGCCCTGTTGAAATCGCCACCACATTCATATTGTGA  
 CGCTTGAGCAGTCTGTAATTGCCTCAGAATGTGGAATCATCTGCCCCCTGTGCGAGC  
 CCATGCCAGGCATGTCGCGGGCGAGGACACCCGCCACTCGTACAGCAGACCATTAT  
 GCTACCTCACAATAGTTCATAACAGTGACCATATTTCTCGAAGCTCCCCAACGAGCA  
 CCTCCATGCTCTGAGTGGCCACCCCCGGCCCTGGTGTGCTTGCAGGAGGGCAGGTCAAC  
 30 CGGCATGGGGCTACCGAAATCCCCGACCGGATCCCACCACCCCGCGATGGGAAGA  
 ATCTCTCCCCGGGATGTGGGCCACCACCAGCACAACTGCTGGCCCAGGCGAGCG  
 TCAAACCATAACCACACAAATATCCTTGGCATCGGCCCTGAATTCCTTCTGCCGCTCT  
 GCTACCCGGTGTCTTCTGTCCGAAGCAGGGGTTGCTAGGGATCGCTCCGAGTCCGCAA  
 ACCCTTGTCGCGTGGCGGGGCTTGTTCGAGCTTGAAGAGC  
 35

**SEQ ID NO:96**

Porción de FADc del casete de expresión de ARN horquillado de pSZ1471

ACTAGTTCACTTGTGGAACCAGAGCGCGGAGTCGTCCTCGGGCGCGTCCGGGACGA  
 40 CGTAGCGGCAGTCGCGCCAGTCCTCCCACAGGGCGCGGCCGACCCAGCGGCTGTGC  
 GACTGGTAGTACTTGCCCAGGATGGGCCCTGATGGCGGGCGGAGGCCCTCCTCGGCGTG  
 GTAGTGCGGGATGGTGTGTAAGAGGTGGTGCAGCACGTGGGTGTGCGGAGATGTGGT  
 GCAGGATGTTGTCCATGAAGGGCGGGCCCATGGAGCGGTCCACGGTGGCCATGGCG  
 CCGCGCAGCCAGTCCCAGTCTTCTCGAAGTAGTGCGGCAGCGCCGGGTGCGTGTGC  
 45 TGGAGCAGCGTGATGAGCACGAGCCACATGTTACGATCAGGTAGGGCACCACGTA  
 GGTCTTGACCAGCCAGGCCAGCCCATGGTGCAGGCCAGCACGCTGAGCCCGCTGA  
 GCACCGCCACCAGCGCCAGGTTCGGAGATGACCACCTCGATGCGCTCGCGCTTGTG  
 AAGATGGGCGACCACGGGTCAAAGTGGTTGGCGAAGCGCGGGTACGGCCGCGAGG  
 CGACGTTGAACATGAGGTACAGCGGCCAGCCAGGGTCAGGGTGACCAGCACCTTG

CCCATGCGGATGGGCAGCCACTCCTCCCCTCCAGGCCCTCGTGCGCCACTGCGCGG  
 TGCGGCGGCACAAACACCTCGTCCTTGTCCAGGCACCCCGTGTTGGAGTGGTGGCGG  
 CGGTGCGAGTGCTTCCAGGAGTAGTAGGGCACCAGCAGCAGGCTGTGGAACACCGAG  
 GCCACGCCGTCGTTGATGGCCTGGCTGGAGGAAAAGGCCTGGTGGCCGCACTCGT  
 5 GCGCGCACACCCAGACACCCGTGCCGAAGGCGCCCTGGAAGGTGCCGGGAGGGTAG  
 CCGGGGGGGTTCAGCGGGACAGGCGCCTTCTCCTCCATGCGCGCCACCAGGACCTCA  
 ATACGGGCAACCAAAACCTCAAACACACCTGGAAGAACCAGTAGAGCGGCCACAT  
 GATGCCGTACTIONTACCCACGTAGGCACCGGTGCAGGGTTCGATGTACGTCGACGCGA  
 CGTAGAGCAGGGACATGACCGCGATGTCAAAGGCCAGGTACATGCTGCTACGAAGC  
 10 GCCGAGCGCTCGAAACAGTGCGCGGGGATGGCCTTGCAGCGTCCCGATCGTGAA  
 CGGAGGCTTCTCCACAGGCTGCCTGTTCTGATAGCCAT

**SEQ ID NO:97**

Porción relevante del casete de expresión de ARN horquillado para FADc de pSZ1471

15 GCTCTTCGCCGCGCCACTCCTGCTCGAGCGCGCCCGCGCGTGCGCCGCCAGCGCCT  
 TGGCCTTTTCGCCGCGCTCGTGCGGTCGCTGATGTCCATCACCAGGTCCATGAGGT  
 CTGCCTTTCGCCGCGCTGAGCCACTGCTTCGTCCGGGCGGCCAAGAGGAGCATGAGG  
 GAGGACTCCTGGTCCAGGGTCCAGGTCCTGACGTGGTTCGCGGCTCTGGGAGCGGGCCAGCAT  
 20 CATCTGGCTCTGCCGCACCGAGGCCCGCCTCCAACCTGGTCCCTCCAGCAGCCGCAGTCCG  
 CCGCCGACCCTGGCAGAGGAAGACAGGTGAGGGGGGTATGAATTGTACAGAACAA  
 CCACGAGCCTTGTCTAGGCAGAATCCCTACCAGTCATGGCTTTACCTGGATGACGGC  
 CTGCGAACAGCTGTCCAGCGACCCTCGCTGCCGCGCTTCTCCCGCACGCTTCTTTCC  
 AGCACCGTGATGGCGCGAGCCAGCGCCGCACGCTGGCGCTGCGCTTCGCCGATCTG  
 25 AGGACAGTCGGGGAACCTCTGATCAGTCTAAACCCCTTGCAGCGTTAGTGTGTCATC  
 CTTTGCAGACCGGTGAGAGCCGACTTGTGTGCGCCACCCCCACACCACCTCCTCC  
 CAGACCAATTCTGTACCTTTTTGGCGAAGGCATCGGCCTCGGCCTGCAGAGAGGAC  
 AGCAGTGCCAGCCGCTGGGGGTTGGCGGATGCACGCTCAGGTACCCTTTCTTGCGC  
 TATGACACTTCCAGCAAAAGGTAGGGCGGGCTGCGAGACGGCTTCCCGGCGCTGCA  
 30 TGCAACACCGATGATGCTTCGACCCCCGAAGCTCCTTCGGGGCTGCATGGGGCGCTC  
 CGATGCCGCTCCAGGGCGAGCGCTGTTTAAATAGCCAGGCCCCCGATTGCAAAGAC  
 ATTATAGCGAGCTACCAAAGCCATATTCAAACACCTAGATCACTACCACTTCTACAC  
 AGGCCACTCGAGCTTGTGATCGCACTCCGCTAAGGGGGCGCCTCTTCTCTTCTGTTT  
 CAGTCACAACCCGCAAACGGCGCGCCATGCTGCTGCAGGCCTTCTGTTCTGCTGG  
 35 CCGGCTTCGCCGCCAAGATCAGCGCCTCCATGACGAACGAGACGTCCGACCGCCCC  
 CTGGTGCCTTACCCCCAACAAAGGGCTGGATGAACGACCCCAACGGCCTGTGGTA  
 CGACGAGAAGGACGCCAAGTGGCACCTGTACTTCCAGTACAACCCGAACGACACCG  
 TCTGGGGGACGCCCTTGTCTGGGGCCACGCCACGTCCGACGACCTGACCAACTGGG  
 AGGACCAGCCCATCGCCATCGCCCCGAAGCGCAACGACTCCGGCGCCTTCTCCGGCT  
 40 CCATGGTGGTGGACTACAACAACACCTCCGGCTTCTTCAACGACACCATCGACCCGC  
 GCCAGCGCTGCGTGGCCATCTGGACCTACAACACCCCGGAGTCCGAGGAGCAGTAC  
 ATCTCCTACAGCCTGGACGGCGGCTACACCTTACCGAGTACCAGAAGAACCCCGT  
 GCTGGCCGCCAACTCCACCCAGTTCCGCGACCCGAAGGTCTTCTGGTACGAGCCCTC  
 CCAGAAGTGGATCATGACCGCGGCCAAGTCCCAGGACTACAAGATCGAGATCTACT  
 45 CCTCCGACGACCTGAAGTCTTGGAAAGCTGGAGTCCGCGTTCCGCCAACGAGGGCTTCC  
 TCGGCTACCAGTACGAGTGCCCCGGCCTGATCGAGGTCCCCACCGAGCAGGACCCC  
 AGCAAGTCTACTGGGTGATGTTTCATCTCCATCAACCCCGGCGCCCCGGCCGGCGGC  
 TCCTTCAACCAGTACTTCGTGCGCAGCTTCAACGGCACCCACTTCGAGGCCTTCGAC  
 AACCAGTCCCGCGTGGTGGACTTCGGCAAGGACTACTACGCCCTGCAGACCTTCTTC

AACACCGACCCGACCTACGGGAGCGCCCTGGGCATCGCGTGGGCCTCCAACCTGGGA  
 G TACTCCGCCTTCGTGCCACCAACCCCTGGCGCTCCTCCATGTCCCTCGTGCGCAA  
 GTTCTCCCTCAACACCGAGTACCAGGCCAACCCGGAGACGGAGCTGATCAACCTGA  
 AGGCCGAGCCGATCCTGAACATCAGCAACGCCGGCCCTGGAGCCGGTTCGCCACC  
 5 AACACCACGTTGACGAAGGCCAACAGCTACAACGTGACCTGTCCAACAGCACCGG  
 CACCCTGGAGTTCGAGCTGGTGTACGCCGTCAACACCACCCAGACGATCTCCAAGTC  
 CGTGTTCGCGGACCTCTCCCTCTGGTTCAAGGGCCTGGAGGACCCCGAGGAGTACCT  
 CCGCATGGGCTTCGAGGTGTCCGCGTCCTCCTTCTTCTGGACCGCGGGAACAGCAA  
 GGTGAAGTTCGTGAAGGAGAACCCCTACTTCACCAACCGCATGAGCGTGAACAACC  
 10 AGCCCTTCAAGAGCGAGAACGACCTGTCCTACTACAAGGTGTACGGCTTGCTGGAC  
 CAGAACATCCTGGAGCTGTACTTCAACGACGGCGACGTCGTGTCCACCAACACCTAC  
 TTCATGACCACCGGGAACGCCCTGGGCTCCGTGAACATGACGACGGGGGTGGACAA  
 CCTGTTCTACATCGACAAGTTCAGGTGCGCGAGGTCAAGTGACAATTGGCAGCAG  
 CAGCTCGGATAGTATCGACACACTCTGGACGCTGGTCGTGTGATGGACTGTTGCCGC  
 15 CACACTTGCTGCCTTGACCTGTGAATATCCCTGCCGCTTTTATCAAACAGCCTCAGTG  
 TGTTTGATCTTGTGTGTACGCGCTTTTGCAGTTGCTAGCTGCTTGTGCTATTTGCGA  
 ATACCACCCCGAGCATCCCTTCCCTCGTTTCATATCGCTTGCATCCCAACCGCAACT  
 TATCTACGCTGTCTGTATCCCTCAGCGCTGCTCCTGCTCCTGCTCACTGCCCTCG  
 CACAGCCTTGTTTTGGGCTCCGCTGTATTCTCCTGGTACTGCAACCTGTAAACCAG  
 20 CACTGCAATGCTGATGCACGGGAAGTAGTGGGATGGGAACACAAATGGAGGATCCC  
 GCGTCTCGAACAGAGCGCGCAGAGGAACGCTGAAGGTCTCGCCTCTGTCGCACCTC  
 AGCGCGGCATACACCACAATAACCACCTGACGAATGCGCTTGGTTCTTCGTCCATTA  
 GCGAAGCGTCCGGTTCACACACGTGCCACGTTGGCGAGGTGGCAGGTGACAATGAT  
 CGGTGGAGCTGATGGTCGAAACGTTACAGCCTAGGGATATCGAATTCCCTTTCTTGC  
 25 GCTATGACACTTCCAGCAAAAGGTAGGGCGGGCTGCGAGACGGCTTCCCGGCGCTG  
 CATGCAACACCGATGATGCTTCGACCCCGAAGCTCCTTCGGGGCTGCATGGGCGC  
 TCCGATGCCGCTCCAGGGCGAGCGCTGTTTAAATAGCCAGGCCCCCGATTGCAAAG  
 ACATTATAGCGAGCTACCAAAGCCATATTCAAACACCTAGATCACTACCACTTCTAC  
 ACAGGCCACTCGAGCTTGTGATCGCACTCCGCTAAGGGGGCGCCTCTTCTCTTCGT  
 30 TTCAGTCACAACCCGCAAACACTAGTTCATTGTGGAACCAGAGCGCGGAGTCGTCC  
 TCGGGCGCGTCCGGGACGACGTAGCGGCAGTCGCGCCAGTCCTCCACAGGGGCGCG  
 GCCGACCCAGCGGCTGTCGGACTGGTAGTACTTGCCCAGGATGGGCCTGATGGCGG  
 CGGAGGCCTCCTCGGCGTGGTAGTGCGGGATGGTGTGTAAGAGGTGGTGCAGCACG  
 TGGGTGTCGGAGATGTGGTGCAGGATGTTGTCCATGAAGGGCGGGCCCATGGAGCG  
 35 GTCCACGGTGGCCATGGCGCCGCGCAGCCAGTCCCAGTCCTTCTCGAAGTAGTGCGG  
 CAGCGCCGGGTGCGTGTGCTGGAGCAGCGTGATGAGCACGAGCCACATGTTACGA  
 TCAGGTAGGGCACCACGTAGGTCTTGACCAGCCAGGCCAGCCCAGCCCATGGTGCGGCC  
 AGCACGCTGAGCCCGCTGAGCACCGCCACCAGCGCCAGGTCCGAGATGACCACCTC  
 GATGCGCTCGCGCTTGCTGAAGATGGGCGACCACGGGTCAAAGTGGTTGGCGAAGC  
 40 GCGGGTACGGCCGCGAGGGCAGCGTTGAACATGAGGTACAGCGGCCAGCCCAGGGTC  
 AGGGTGAACCAGCACCTTGCCCATGCGGATGGGCAGCCACTCCTCCCACTCCAGGCC  
 TCGTGCGCCACTGCGCGGTGCGGCGGCACAAACACCTCGTCCTTGTCCAGGCACCCC  
 GTGTTGGAGTGGTGGCGGCGGTGCGAGTGCTTCCAGGAGTAGTAGGGCACCAGCAG  
 CAGGCTGTGGAACACCAGGCCACGCCGTCGTTGATGGCCTGGCTGGAGGAAAAGG  
 45 CCTGGTGGCCGCACTCGTGCGCGCACACCCAGACACCCGTGCCGAAGGCGCCCTGG  
 AAGGTGCCGGGAGGGTAGCCGGGGGGGTCAGCGGGACAGGCGCCTTCTCCTCCATG  
 CGCGCCACCAGGACCTCAATACGGGCAACCAAAACCCCTCAAACACACCTGGAAGAA  
 CCAGTAGAGCGGCCACATGATGCCGTACTTGACCCACGTAGGCACCGGTGCAGGGT  
 CGATGTACGTGACGCGACGTAGAGCAGGGACATGACCGCGATGTCAAAGGCCAGG

TACATGCTGCTACGAAGCGCCGAGCGCTCGAAACAGTGCGCGGGGATGGCCTTGCG  
 CAGCGTCCCGATCGTGAACGGAGGCTTCTCCACAGGCTGCCTGTTTCGTCTTGATAGC  
 CATCTCGAGGCAGCAGCAGCTCGGATAGTATCGACACACTCTGGACGCTGGTCGTGT  
 GATGGACTGTTGCCGCCACACTTGCTGCCTTGACCTGTGAATATCCCTGCCGCTTTTA  
 5 TCAAACAGCCTCAGTGTGTTTGTATCTTGTGTGTACGCGCTTTTTCGAGTTGCTAGCTG  
 CTTGTGCTATTTGCGAATACCACCCCCAGCATCCCCCTTCCCTCGTTTCATATCGCTTG  
 CATCCCAACCGCAACTTATCTACGCTGTCTGTATCCCTCAGCGCTGCTCCTGCTCC  
 TGCTCACTGCCCCTCGCACAGCCTTGGTTTGGGCTCCGCCTGTATTCTCCTGGTACTG  
 CAACCTGTAAACCAGCACTGCAATGCTGATGCACGGGAAGTAGTGGGATGGGAACA  
 10 CAAATGGAAAGCTGTAGAGCTCTTGTTTTCCAGAAGGAGTTGCTCCTTGAGCCTTTC  
 ATTCTCAGCCTCGATAACCTCCAAAGCCGCTCTAATTGTGGAGGGGGTTTCGAATTTA  
 AAAGCTTGAATGTTGGTTCGTGCGTCTGGAACAAGCCAGACTTGTGCTCACTGG  
 GAAAAGGACCATCAGCTCCAAAAAACTTGCCGCTCAAACCGCGTACCTCTGCTTTCG  
 CGCAATCTGCCCTGTTGAAATCGCCACCACATTCATATTGTGACGCTTGAGCAGTCT  
 15 GTAATTGCCTCAGAATGTGGAATCATCTGCCCCCTGTGCGAGCCCATGCCAGGCATG  
 TCGCGGGCGAGGACACCCGCCACTCGTACAGCAGACCATTATGCTACCTACAATA  
 GTTCATAACAGTGACCATATTTCTCGAAGCTCCCCAACGAGCACCTCCATGCTCTGA  
 GTGGCCACCCCCCGGCCCTGGTGCTTGCGGAGGGCAGGTCAACCGGCATGGGGCTA  
 CCGAAATCCCCGACCGGATCCCACCACCCCCGCGATGGGAAGAATCTCTCCCCGGG  
 20 ATGTGGGCCACCACCAGCACAACTGCTGGCCAGGCGAGCGTCAAACCATACCA  
 CACAAATATCCTTGGCATCGGCCCTGAATTCTTCTGCCGCTCTGCTACCCGGTGCTT  
 CTGTCCGAAGCAGGGGTTGCTAGGGATCGCTCCGAGTCCGCAAACCCTTGTGCGGTG  
 GCGGGGCTTGTTTCGAGCTTGAAGAGC

25 **SEQ ID NO:98**

Secuencia codificante con codones optimizados de la esteroil-ACP-desaturasa de *Olea europaea* con el péptido de tránsito de esteroil-ACP de *Chorella protothecoides* UTEX250 de pSZ1377

30 ACTAGTATGGCCACCGCATCCACTTTCTCGGCGTTCAATGCCCGCTGCGGGCGACCTG  
 CGTCGCTCGGCGGGCTCCGGGCCCCGGCGCCAGCGAGGCCCTCCCCGTGCGCGG  
 GCGCGCCGAGGTGCACGTGCAGGTGACCCACTCCCTGGCCCCGAGAAGCGCGAGA  
 TCTTCAACTCCCTGAACAACTGGGCCCAGGAGAACATCCTGGTGCTGCTGAAGGAC  
 GTGGACAAGTGTGCTGGCAGCCCTCCGACTTCTGCCCCGACTCCGCCTCCGAGGGCTTC  
 35 GACGAGCAGGTGATGGAGCTGCGCAAGCGCTGCAAGGAGATCCCCGACGACTACTT  
 CATCGTGCTGGTGGGCGACATGATCACCGAGGAGGCCCTGCCACCTACCAGACCA  
 TGCTGAACACCCTGGACGGCGTGCGCGACGAGACCGGCGCCTCCCTGACCCCCTGG  
 GCCATCTGGACCCGCGCCTGGACCGCCGAGGAGAACCGCCACGGCGACCTGCTGAA  
 CAAGTACCTGTACCTGTCCGGCCGCGTGGACATGAAGCAGATCGAGAAGACCATCC  
 40 AGTACCTGATCGGCTCCGGCATGGACCCCCGCACCGAGAACAACCCCTACCTGGGC  
 TTCATCTACACCTCCTTCCAGGAGCGCGCCACCTTCATCTCCCACGGCAACACCGCC  
 CGCCTGGCCAAGGAGCACGGCGACCTGAAGCTGGCCCAGATCTGCGGCATCATCGC  
 CGCCGACGAGAAGCGCCACGAGACCGCCTACACCAAGATCGTGGAGAAGCTGTTTCG  
 AGATCGACCCCGACGGCACCGTGCTGGCCCTGGCCGACATGATGCGCAAGAAGGTG  
 45 TCCATGCCCGCCCACCTGATGTACGACGGCCAGGACGACAACCTGTTTCGAGAACTTC  
 TCCTCCGTGGCCCAGCGCCTGGGCGTGTACACCGCCAAGGACTACGCCGACATCCTG  
 GAGTTCCTGGTGGGCCGCTGGGACATCGAGAAGCTGACCGGCCTGTCCGGCGAGGG  
 CCGCAAGGCCAGGACTACGTGTGCACCCTGCCCCCCCCGCATCCGCCGCTGGAGG  
 AGCGCGCCCAGTCCCGCGTGAAGAAGGCTCCGCCACCCCTTCTCCTGGATCTTCG

GCCGCGAGATCAACCTGATGGACTACAAGGACCACGACGGCGACTACAAGGACCAC  
GACATCGACTACAAGGACGACGACGACAAGTGAATCGAT

**SEQ ID NO:99**

5 Secuencia de aminoácidos de la estearoil-ACP-desaturasa de *Olea europaea* (N.º de acceso AAB67840.1)

MALKLCFPPHKMPSFPDARIRSHRVFMASSTIHSMEVGVKVKKPFTPPPREVHVQVTHSL  
APEKREIFNSLNNWAQENILVLLKDVDKVCWQPSDFLPDSASEGFDEQVMELRKRCKEIP  
10 DDYFIVLVGDMITEEALPTYQTMLNLTLDGVRDETGASLTPWAIWTRAWEENRHGDL  
LNKYL YLSGRVDMKQIEKTIQYLIGSGMDPRTEENPYLGFYITSFQERATFISHGNTARL  
AKEHGDLKLAQICGIIAADEKRHETAYTKIVEKLFIDPDGTVLALADMMRKKVSMPAH  
LMYDGQDDNLFENFSSVAQRLGVYTA KDYADILEFLVGRWDIEKLTGLSGEGRKAQDY  
VCTLPPRIRLEERAQSRVKKASATPFSWIFGREINL

15

**SEQ ID NO:100**

Secuencia 5' dadora genómica para 6S de *Prototheca moriformis*

GCTCTTCGCCGCGCCACTCCTGCTCGAGCGCGCCCGCGCGTGCGCCGCCAGCGCCT  
20 TGGCCTTTTCGCCGCGCTCGTGC GCGCTCGTGTCCATCACCAGGTCCATGAGGT  
CTGCCTTGCGCCGGCTGAGCCACTGCTTCGTCCGGGCGGCCAAGAGGAGCATGAGG  
GAGGACTCCTGGTCCAGGGTCTGACGTGGTCGCGGCTCTGGGAGCGGGCCAGCAT  
CATCTGGCTCTGCCGCACCGAGGCCGCTCCA ACTGGTCTCCAGCAGCCGCAGTCG  
25 CCGCCGACCCTGGCAGAGGAAGACAGGTGAGGGGGGTATGAATTGTACAGAACAA  
CCACGAGCCTTGTCTAGGCAGAATCCCTACCAGTCATGGCTTTACCTGGATGACGGC  
CTGCGAACAGCTGTCCAGCGACCCTCGCTGCCGCCGCTTCTCCCGCACGCTTCTTTCC  
AGCACCGTGATGGCGCGAGCCAGCGCCGCACGCTGGCGCTGCGCTTCGCCGATCTG  
AGGACAGTCGGGGA ACTCTGATCAGTCTAAACCCCTTGCGCGTTAGTGTGTCATC  
CTTTGCAGACCGGTGAGAGCCGACTTGTGTGCGCCACCCCCACACCACCTCCTCC  
30 CAGACCAATTCTGTACCTTTTTGGCGAAGGCATCGGCCTCGGCCTGCAGAGAGGAC  
AGCAGTGCCAGCCGCTGGGGGTTGGCGGATGCACGCTCAGGTACC

**SEQ ID NO:101**

Secuencia 3' dadora genómica para 6S de *Prototheca moriformis*

35

GAGCTCCTTGTTTTCCAGAAGGAGTTGCTCCTTGAGCCTTTCATTCTCAGCCTCGATA  
ACCTCCAAAGCCGCTCTAATTGTGGAGGGGGTTCGAATTTAAAAGCTTGG AATGTTG  
GTTCGTGCGTCTGGAACAAGCCAGACTTGTGCTCACTGGGAAAAGGACCATCAG  
CTCCAAAAAACTTGCCGCTCAAACCGCGTACCTCTGCTTTCGCGCAATCTGCCCTGT  
40 TGAAATCGCCACCACATTCATATTGTGACGCTTGAGCAGTCTGTAATTGCCTCAGAA  
TGTGGAATCATCTGCCCCCTGTGCGAGCCCATGCCAGGCATGTGCGGGGCGAGGAC  
ACCCGCCACTCGTACAGCAGACCATTATGCTACCTCACAATAGTTCATAACAGTGAC  
CATATTTCTCGAAGCTCCCCAACGAGCACCTCCATGCTCTGAGTGGCCACCCCCCG  
CCCTGGTGCTTGCGGAGGGCAGGTCAACCGGCATGGGGCTACCGAAATCCCCGACC  
45 GGATCCACACCCCCGCGATGGGAAGAATCTCTCCCCGGGATGTGGGCCACAC  
CAGCACAACCTGCTGGCCAGGCGAGCGTCAAACCATAACCACAAATATCCTTGG  
CATCGGCCCTGAATTCCTTCTGCCGCTCTGCTACCCGGTGCTTCTGTCCGAAGCAGG  
GGTTGCTAGGGATCGCTCCGAGTCCGCAAACCCTTGTCGCGTGGCGGGGCTTGTTCC  
AGCTTGAAGAGC

**SEQ ID NO:102**

Secuencia 5' de ADN donante de constructo de modificación dirigida por recombinación homóloga para la desactivación de FADc de *Prototheca moriformis*

5  
 GGGCTGGTCTGAATCCTTCAGGCGGGTGTACCCGAGAAAGAAAGGGTGCCGATTT  
 CAAAGCAGACCCATGTGCCGGGCCCTGTGGCCTGTGTTGGCGCCTATGTAGTCACCC  
 CCCCTCACCCAATTGTCGCCAGTTTGC GCACTCCATAAACTCAAACAGCAGCTTCT  
 GAGCTGCGCTGTTCAAGAACACCTCTGGGGTTTGCTCACCCGCGAGGTCGACGCCA  
 10 GCATGGCTATCAAGACGAACAGGCAGCCTGTGGAGAAGCCTCCGTTACGATCGGG  
 ACGCTGCGCAAGGCCATCCCCGCGCACTGTTTCGAGCGCTCGGCGCTTCGTAGCAGC  
 ATGTACCTGGCCTTTGACATCGCGGTCATGTCCCTGCTCTACGTCGCGTCGACGTAC  
 ATCGACCCTGCACCGGTGCCTACGTGGGTCAAGTACGGCATCATGTGGCCGCTCTAC  
 TGGTTCTTCCAGGTGTGTTTGGAGGGTTTTGGTTGCCCGTATTGAGGTCCTGGTGGCGC  
 15 GCATGGAGGAGAAGGCGCCTGTCCCGCTGACCCCCCGGCTACCCTCCCGGCACCTT  
 CCAGGGCGCCTTCGGCACGGGTGTCTGGGTGTGCGCGCACGAGTGC GGCCACCAGG  
 CCTTTTCCCTCCAGCCAGGCCATCAACGACGGCGTGGGCCTGGTGTTCACAGCCTGC  
 TGCTGGTGCCCTACTACTCCTGGAAGCACTCGCACCG

**SEQ ID NO:103**

Secuencia 3' de ADN donante de constructo de modificación dirigida por recombinación homóloga para la desactivación de FADc de *Prototheca moriformis*

25  
 CCGCCACCACTCCAACACGGGGTGCCTGGACAAGGACGAGGTGTTTGTGCCGCCGC  
 ACCGCGCAGTGGCGCACGAGGGCCTGGAGTGGGAGGAGTGGCTGCCATCCGCATG  
 GGCAAGGTGCTGGTCACCCTGACCCTGGGCTGGCCGCTGTACCTCATGTTCAACGTC  
 GCCTCGCGGCCGTACCCGCGCTTCGCCAACCCTTTGACCCGTGGTCGCCATCTTC  
 AGCAAGCGCGAGCGCATCGAGGTGGTCATCTCCGACCTGGCGCTGGTGGCGGTGCT  
 CAGCGGGCTCAGCGTGCTGGGCCGCACCATGGGCTGGGCCTGGCTGGTCAAGACCT  
 30 ACGTGGTGCCCTACCTGATCGTGAACATGTGGCTCGTGCTCATCACGCTGCTCCAGC  
 ACACGCACCCGGCGCTGCCGCACTACTTCGAGAAGGACTGGGACTGGCTGCGCGGC  
 GCCATGGCCACCGTGGACCGCTCCATGGGCCCGCCCTTCATGGACAACATCCTGCAC  
 CACATCTCCGACACCCACGTGCTGCACCACCTCTTCAGCACCATCCCGCACTACCAC  
 GCCGAGGAGGCCTCCGCCGCCATCAGGCCATCCTGGGCAAGTACTACCAGTCCGA  
 35 CAGCCGCTGGGTCCGCCGCGCCCTGTGGGAGGACTGGCGCGACTGCCGCTACGTCCG  
 TCCCGGACGCGCCCCGAGGACGACTCCGCGCTCTGGTTCCACAAGTGAGTGAGTGA

**SEQ ID NO:104**

Proteína portadora de oleoil-acil-tioesterasa (CtOTE) de *Carthamus tinctorius* con el péptido de tránsito de estearoil-ACP-desaturasa de *Chlorella protothecoides* (UTEX 250) (39 residuos, subrayados) y 3xFLAG (negrita)

45  
MATASTFSAFNARCGDLRRSAGSGPRRPARPLPVRGRAATGEQPSGVASLREADKEKSL  
GNRLRLGSLTEDGLSYKEKFVIRCYEVGINKTATIETIANLLQE VGGNHAQGVGFSTDGF  
 ATTTTMRKLHLIWTARMHIEIYRYPAWSDVIEIETWVQEGKVGTRRDWILKDYANG  
 EVIGRATSKWVMMNEDTRRLQKVSDDVREEYL VFCPRTLRLAFPEENNNSMKKIPKLE  
 DPAEYSRLGLVPRRSDLDMNKHVNNVTYIGWALESIPPEIIDTHELQAITLDYRRECQRD  
 DIVDSLTSREPLGNAAGVKFKEINGSVSPKKDEQDLSRFMHLLRSAGSGLEINRCRTEWR  
**KKPAKRMDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK**

**SEQ ID NO:105**

Secuencia proteica de la tioesterasa FatB2 de *Cuphea wrightii* (CwTE2); N.º de acceso a GenBank U56104

5 MVVAAAASSAFFPVPAPRPTPKPGKFGNWPSSLSQPFPKPSNPNGRFQVKANVSPHPKA  
 NGSVSLKSGSLNTLEDPPSSPPPRTFLNQLPDWSRLRTAITTVFVAAEKQFTRLDRKSK  
 RPDMLVDWFGSETIVQDGLVFRERFSIRS YEIGADRTAS IETLMNHLQD TSLNHCKSVGL  
 LNDGFGRTPEMCTRDLIWVLT KMQIVVNRYPTWGD TVEINSWFSQSGKIGMGREWLIS  
 DCNTGEILVRATSAWAMMNQKTRRFSKLPCEVRQEIAPHFVDAPPVIEDNDRKLHKFD  
 10 VKTGD SICKGLTPGWNDFD VNQHVS NVKYIGWILESMPT EVLETQELCSLTLEYRRECG  
 RESVVESV TSMNPSKVGDRSQYQHLLRLEDGADIMKGRTEWRPKNAGTNRAIST

**SEQ ID NO:106**

Secuencia con codones optimizados para la proteína portadora de oleoil-acil-tioesterasa (CtOTE) de *Carthamus tinctorius* con el péptido de tránsito de estearoil-ACP-desaturasa de *Chlorella protothecoides* (UTEX 250) y 3x marcador FLAG

ATGGCCACCGCATCCACTTTCTCGGCGTTCAATGCCCGCTGCGGGCGACCTGCGTCGC  
 TCGGCGGGCTCCGGGCCCCGGCGCCAGCGAGGCCCTCCCCGTGCGCGGGGCGCGC  
 20 CGCCACCGGCGAGCAGCCCTCCGGCGTGGCCTCCCTGCGCGAGGCCGACAAGGAGA  
 AGTCCCTGGGCAACCGCCTGCGCCTGGGCTCCCTGACCGAGGACGGCCTGTCTTACA  
 AGGAGAAGTTCGTGATCCGCTGCTACGAGGTGGGCATCAACAAGACCGCCACCATC  
 GAGACCATCGCCAACCTGCTGCAGGAGGTGGGCGGCAACCACGCCAGGGCGTGGG  
 CTTCTCCACCGACGGCTTCGCCACCACCACCACCATGCGCAAGCTGCACCTGATCTG  
 25 GGTGACCGCCCGCATGCACATCGAGATCTACCGCTACCCCGCCTGGTCCGACGTGAT  
 CGAGATCGAGACCTGGGTGCAGGGCGAGGGCAAGGTGGGCACCCGCCGCGACTGG  
 ATCCTGAAGGACTACGCCAACGGCGAGGTGATCGGCCGCGCCACCTCCAAGTGGGT  
 GATGATGAACGAGGACACCCGCCGCTGCAGAAGGTGTCCGACGACGTGCGCGAGG  
 AGTACCTGGTGTCTGCCCCCGCACCTGCGCCTGGCCTTCCCCGAGGAGACAACA  
 30 ACTCCATGAAGAAGATCCCCAAGCTGGAGGACCCCGCCGAGTACTCCCGCCTGGGC  
 CTGGTGCCCGCCGCTCCGACCTGGACATGAACAAGCACGTGAACAACGTGACCTA  
 CATCGGCTGGGCCCTGGAGTCCATCCCCCGAGATCATCGACACCCACGAGCTGCA  
 GGCCATCACCTGGACTACCGCCGCGAGTGCCAGCGCGACGACATCGTGGACTCCC  
 TGACCTCCCGCGAGCCCCCTGGGCAACGCCGCCGGCGTGAAGTTCAAGGAGATCAAC  
 35 GGCTCCGTGTCCCCAAGAAGGACGAGCAGGACCTGTCCCGCTTCATGCACCTGCTG  
 CGCTCCGCCGGCTCCGGCCTGGAGATCAACCGCTGCCGCACCGAGTGGCGCAAGAA  
 GCCCGCCAAGCGCATGGACTACAAGGACCACGACGGCGACTACAAGGACCACGAC  
 ATCGACTACAAGGACGACGACGACAAGTGA

**SEQ ID NO:107**

Secuencia con codones optimizados para la tioesterasa FatB2 de *Cuphea wrightii* (CwTE2)

ATGGTGGTGGCCGCCGCCAGCAGCGCCTTCTTCCCCGTGCCCGCCCC  
 CCGCCCCACCCCAAGCCCGGCAAGTTCGGCAACTGGCCCAGCAGCCTGA  
 45 GCCAGCCCTTCAAGCCCAAGAGCAACCCCAACGGCCGCTTCCAGGTGAAG  
 GCCAACGTGAGCCCCACGGGCGCGCCCCCAAGGCCAACGGCAGCGCCGT  
 GAGCCTGAAGTCCGGCAGCCTGAACACCCTGGAGGACCCCCCAGCAGCC  
 CCCCCCCCCGACCTTCTGAACCAGCTGCCCGACTGGAGCCGCCTGCGC  
 ACCGCCATCACCAACCGTGTTCGTGGCCGCCGAGAAGCAGTTCACCCGCCT

GGACCGCAAGAGCAAGCGCCCCGACATGCTGGTGGACTGGTTCGGCAGCG  
 AGACCATCGTGCAGGACGGCCTGGTGTTCGCGAGCGCTTCAGCATCCGC  
 AGCTACGAGATCGGCGCCGACCGCACCAGCAGCATCGAGACCCTGATGAA  
 CCACCTGCAGGACACCAGCCTGAACCACTGCAAGAGCGTGGGCCTGCTGA  
 5 ACGACGGCTTCGGCCGCACCCCCGAGATGTGCACCCGCGACCTGATCTGG  
 GTGCTGACCAAGATGCAGATCGTGGTGAACCGCTACCCACCTGGGGCGA  
 CACCGTGGAGATCAACAGCTGGTTCAGCCAGAGCGGCAAGATCGGCATGG  
 GCCGCGAGTGGCTGATCAGCGACTGCAACACCGGCGAGATCCTGGTGCGC  
 GCCACCAGCGCCTGGGCCATGATGAACCAGAAGACCCGCCGCTTCAGCAA  
 10 GCTGCCCTGCGAGGTGCGCCAGGAGATCGCCCCCACTTCGTGGACGCCC  
 CCCCCGTGATCGAGGACAACGACCGCAAGCTGCACAAGTTCGACGTGAAG  
 ACCGGCGACAGCATCTGCAAGGGCCTGACCCCGGCTGGAACGACTTCGA  
 CGTGAACCAGCACGTGAGCAACGTGAAGTACATCGGCTGGATTCTGGAGA  
 GCATGCCACCGAGGTGCTGGAGACCCAGGAGCTGTGCAGCCTGACCCTG  
 15 GAGTACCGCCGCGAGTGCGGCCGCGAGAGCGTGGTGGAGAGCGTGACCAG  
 CATGAACCCAGCAAGGTGGGCGACCGCAGCCAGTACCAGCACCTGCTGC  
 GCCTGGAGGACGGCGCCGACATCATGAAGGGCCGCACCGAGTGGCGCCCC  
 AAGAACGCCGGCACCAACCGCGCCATCAGCACCTGA

20 **SEQ ID NO:108**

Secuencia 5' de ADN donante de constructo de modificación dirigida por recombinación homóloga para la desactivación de FATA1 de *Prototheca moriformis*

GCTCTTCGGAGTCACTGTGCCACTGAGTTCGACTGGTAGCTGAATGGAGTCGCTGCT  
 25 CCACTAAACGAATTGTCAGCACCGCCAGCCGGCCGAGGACCCGAGTCATAGCGAGG  
 GTAGTAGCGCGCCATGGCACCGACCAGCCTGCTTGCCAGTACTGGCGTCTCTTCCGC  
 TTCTCTGTGGTCCTCTGCGCGCTCCAGCGCGTGGCGCTTTTCCGGTGGATCATGCGGTC  
 CGTGGCGCACCGCAGCGGCCGCTGCCATGCAGCGCCGCTGCTTCCGAACAGTGGC  
 GGTCAGGGCCGCACCCGCGGTAGCCGTCCGTCCGGAACCCGCCAAGAGTTTTGGG  
 30 AGCAGCTTGAGCCCTGCAAGATGGCGGAGGACAAGCGCATCTTCTGAGGAGCAC  
 CGGTGCGTGGAGGTCCGGGGCTGACCGGCCGTCGCATTCAACGTAATCAATCGCAT  
 GATGATCAGAGGACACGAAGTCTTGGTGGCGGTGGCCAGAAACTGTCCATTGCA  
 AGGGCATAGGGATGCGTTCCTTCACCTCTCATTTCTCATTTCTGAATCCCTCCCTGCT  
 CACTCTTTCTCCTCCTCCTTCCCGTTCACGCAGCATTCGGGGTACC

35

**SEQ ID NO:109**

Secuencia 3' de ADN donante de constructo de modificación dirigida por recombinación homóloga para la desactivación de FATA1 de *Prototheca moriformis*

GACAGGGTGGTTGGCTGGATGGGGAAACGCTGGTCGCGGGATTTCGATCCTGCTGCT  
 TATATCCTCCCTGGAAGCACACCCACGACTCTGAAGAAGAAAACGTGCACACACAC  
 AACCCAACCGGCCGAATATTTGCTTCCTTATCCCGGGTCCAAGAGAGACTGCGATGC  
 CCCCCTCAATCAGCATCCTCCTCCCTGCCGCTTCAATCTTCCCTGCTTGCCTGCGCCC  
 5 GCGGTGCGCCGTCTGCCCCGCCAGTCAGTCACTCCTGCACAGGCCCCCTTGTGCGCAG  
 TGCTCCTGTACCCTTTACCGCTCCTTCCATTCTGCGAGGCCCCCTATTGAATGTATTC  
 GTTGCCTGTGTGGCCAAGCGGGCTGCTGGGCGCGCCGCCGTGCGGCAGTGCTCGGC  
 GACTTTGGCGGAAGCCGATTGTTCTTCTGTAAGCCACGCGCTTGCTGCTTTGGGAAG  
 AGAAGGGGGGGGGTACTGAATGGATGAGGAGGAGAAGGAGGGGTATTGGTATTAT  
 10 CTGAGTTGGGTGAAGAGC

**SEQ ID NO:110**

Porción FATA del casete de expresión de ARN horquillado

15 ATGGCACCGACCAGCCTGCTTGCCAGTACTGGCGTCTCTTCCGCTTCTCTGTGGTCCT  
 CTGCGCGCTCCAGCGCGTGCCTTTTCCGGTGGATCATGCGGTCCGTGGCGCACCCG  
 AGCGGCCGCTGCCATGCAGCGCCGCTGCTTCCGAACAGTGGCGGTTCAGGGCCGCA  
 CCCGCGGTAGCCGTCCGTCCGGAACCCGCCCAAGAGTTTTGGGAGCAGCTTGAGCC  
 CTGCAAGATGGCGGAGGACAAGCGCATCTTCTGGAGGAGCACCGGTGCGTGGAGG  
 20 TCCGGGGCTGACCGGCCGTCGCATTCAACGTAATCAATCGCATGATGATCAGAGGA  
 CACGAAGTCTTGGTGGCGGTGGCCAGAAACTGTCCATTGCAAGGGCATAGGGAT  
 GCGTTCCTTACCTCTCATTCTCATTCTGAATCCCTCCCTGCTCACTCTTTCTCCTC  
 CTCCTTCCCGTTCACGCAGCATTCCGGGCAACGAGGTGGGCCCCTGCTCCTCCAGGA  
 AGATGCGCTTGTCTCCGCCATCTTGCAGGGCTCAAGCTGCTCCCAAACTCTTGGG  
 25 CGGGTTCCGGACGGACGGCTACCGCGGGTGCGGCCCTGACCGCCACTGTTCCGAAG  
 CAGCGGCGCTGCATGGGCAGCGGCCGCTGCGGTGCGCCACGGACCGCATGATCCAC  
 CGGAAAAGCGCACGCGCTGGAGCGCGCAGAGGACCACAGAGAAGCGGAAGAGACG  
 CCAGTACTGGCAAGCAGGCTGGTCGGTGCCAT

**SEQ ID NO:111**

Porción del constructo FATA1-CrbTub\_yInv\_nr-FATA1, que contiene una región para la integración en el genoma nuclear para desactivar el gen FATA1 endógeno y una región codificante de la sacarosa-invertasa *suc2* de *S. cerevisiae* bajo el control del promotor/5'UTR de  $\beta$ -tubulina de *C. reinhardtii* y 3' UTR de la nitrato-reductasa de *Chlorella vulgaris*

35 gctcttcggagtcactgtgccactgagttcgactggtagctgaatggagtcgctgctccactaaacgaattgtcagcaccgccagcc  
ggccgaggaccgagtcatagcgagggtagtagcgcgccatggcaccgaccagcctgcttgcagtaactggtctcttccgcttc  
tctgtggtcctctgcgctccagcgcgtgcttctccggtggatcatcggttcgctggcgaccgcagcggccgctgccatgca  
gcgcgctgcttccgaacagtggcggtcagggccgcaaccgcggtagccgctccggaaccgcccagagtttgggagcag  
 40 cttgagccctgcaagatggcggaggacaagcgcattcttctggaggagcaccggtgctggaggctcggggctgaccggccgctc  
gattcaacgtaataatcgatgatgatcagaggacagaaagtcttggggggtggccagaaactgtccattgcaagggcat  
agggatgcgttcttccactctcatttctcatttctgaatccctcctgctcactcttctcctccttccggttcacgcagcattcggg  
gtacccttcttgcgctatgacactccagcaaaaggtaggcgggctgcgagacggctcccgccgctgcatgcaaccgatgatgctt  
cgacccccgaagctccttcggggctgcatggcgctccgatgccgctccagggcgagcgtgttaaatagccagggccccgattgca

aagacattatagcgagctaccaaaagccatattcaaacacctagatcactaccacttctacacaggccactcgagcttgatcgactccgct  
aagggggcgctcttctctctgctttagtcacacaaccgcaaac**ggcggcc****ATG**ctgctgcaggccttctgttctgctggccggctt  
 cgccgccaagatcagcgctccatgacgaacgagacgtccgaccgcccctggtgcacttcccccaacaagggctggatgaacg  
 accccaacggcctgtggtacgacgagaaggacgccaagtggcactgtacttccagtacaaccgaacgacaccgtctgggggac  
 5 gcccctgttctggggccacgccacgtccgacacgtgaccaactgggaggaccagccatcgccatcgccccgaagcgcaacgact  
 ccggcgcttctccggctccatggtggtggactacaacaacacctccggcttcttaacgacaccatcgaccgcgccagcgctgcgtg  
 gccatctggactacaacccccggagtcgaggagcagtacatctctacagcctggacggcggtacaccttaccgagtaccag  
 aagaaccccgctgctggccccaactccaccagttccgagaccggaaggtcttctgtacgagccctcccagaagtggatcatgacc  
 gcgccaagteccaggactacaagatcgagatctactctccgacgacctgaagtcctggaagctggagtcgcgttcgccaacgag  
 10 ggttctctcggtaccagtacgagtccccggcctgatcgaggtcccaccgagcaggaccccagcaagtctactgggtgatgttca  
 tctccataaacccccggcgccccggcggcgtcttcaaccagtactctgctggcagcttcaacggcaccacactcgaggccttegac  
 aaccagtcccgctggtggacttcggcaaggactactacgacctgcagaccttcttaacaccgaccgacctacgggagcgccctg  
 ggcatcgctgggctccaactgggagtactccgcttctgcccaccaaccctggcgtctctccatgtccctctgtcgcaagtctcc  
 ctcaaacaccgagtaccaggccaaccggagacggagctgatcaacctgaaggccgagccgatctgaacatcagcaacggcgcc  
 15 cctggagccggctcgccaccaaccacggtgacgaaggccaacagctacaacgctgacctgtccaacagcaccggcaccctgga  
 gttcagctggtgtacccgtcaacaccaccagacgatctccaagtcctggttcgaggacctctccctctgttcaagggcctggagg  
 acccgaggagtacctccgatgggcttcgaggttccgctctctcttcttctggaccggggaacgcaaggtgaagttctgaa  
 ggagaacccctacttccaaccgcatgagcgtgaacaaccagccctcaagagcagagaacgacctgtctactacaaggtgtacg  
 gcttctggaccagaacatctggagctgtacttcaacgacggcgacgtctgtccaccaaacctacttcatgaccaccgggaacgc  
 20 cctgggctccgtgaacatgacgacgggggtggacaacctgttctacatcgacaagttccaggtgcgcgaggtcaag**TGA**caattgg  
cagcagcagctcggatagatcgacacactctggacgctgctcgtgctgatggactgttccgccacacttctgctgacctgtgaatatcc  
ctgccgctttatcaaacagcctcagtgctttagcttctgctgacgcgcttttgcgagttgctagctgcttctgctatttgcgaataccacccc  
agcatcccccttccctgcttcatatcgcttgcacccaaccgcaacttatctacgctgtcctgctatccctcagcgctgctcctgctcctgctcact  
gccccctgcacagccttggtttgggctccgctgtattctctggtactgcaacctgtaaacagcactgcaatgctgatgcacgggaagtag  
 25 tgggatgggaacacaaatggaggatcgtag**agctc**actagatcgatttcaagacaggggtggttggctggatggggaacgctggc  
**g**cgggatcgatctgctgcttatactccttgggaagcacaccacgactctgaagaagaaaactgcacacacacaaccaac  
cgccgaataattgttcttataccgggtccaagagagactgcgatgccccctcaatcagcactcctcctcctgcccgttcaatctt  
cctgcttgcctgccecggtgcccgtctgcccgccagtcactctgcacaggecccttgcgcagtgctcctgtaccc  
ttaccgctccttccattctgcgagggccccattgaaatgtattcgttgcctgtgtggccaagcgggctgctgggcgcgcgcccgtcgg  
 30 gcagtctcggcgactttggcggaagccgattgttctctgtaagccacgccttctgcttgggaagagaagggggggggtact  
gaatggatgaggaggagaaggaggggtattggtattatctgagttgggtgaagagc

**SEQ ID NO:112**

Porción del constructo FATA1-CrbTub\_yInv\_nr::amt03\_CwTE2\_nr-FATA1, que contiene una  
 35 región para la integración en el genoma nuclear para desactivar el gen FATA1 endógeno y una  
 región codificante de la sacarosa-invertasa *suc2* de *S. cerevisiae* bajo el control del  
 promotor/5'UTR de  $\beta$ -tubulina de *C. reinhardtii* y 3' UTR de la nitrato-reductasa de *Chlorella*  
*vulgaris*

40 gctcttcggagtcactgtgccactgagttcgactggtagctgaatggagtcgctgctccactaaacgaattgtcagcaccgccagcc  
ggccgaggaccgagtcatagcagggtagtagcgcgccatggcaccgaccagcctgcttgcagctactggcgtctcttccgcttc  
tctgtggtcctctgcgcgtccagcgcgtgcttctccgggtggatcatcggttccgtggcgaccgcagcggccgctgcccattgca  
gcgccgctgcttccgaacagtggcggtcagggccgcaccccggtgagccgtccggaacccgccaagagtttggggagcag  
 45 cttgagccctgcaagatggcggaggacaagcgcattctctggaggagcaccggtgctggaggtccggggctgaccggccgtc  
gcattcaacgtaataatcgatgatgacgaggacacgaagtcttggggcgtggccagaaacactgtccattgcaagggcat  
agggatgcgttcttcaactctcatttctcatttctgaatccctcctgctcactcttctcctccttccggttcaacgcagcattcggg  
gtacccttcttgcgctatgacacttccagcaaaaggtagggcgggctgcgagacggcttccggcgctgcatgcaaccgatgatgctt  
cgacccccgaagctccttggggctgcatggcgctccgatgccgctccagggcgagcgtgtttaaataagccagcccccgattgca  
aagacattatagcgagctaccaaaagccatattcaaacacctagatcactaccacttctacacaggccactcgagcttgatcgactccgct



5 *acaagttcgacgtgaagaccggcgacagcatctgcaaggcctgacccccggctggaacgacttcgacgtgaaccagcacgtgag  
 caacgtgaagtacatcggtggtgattctggagagcatgccaccgggtgctggagaccaggagctgtgcagcctgacccctggagta  
 ccgccgagtgccggccgagagcgtggtggagagcgtgaccagcatgaacccagcaaggtggcgaccgcagccagtacca  
 gcacctgctgcctggaggacggcgccgacatcatgaagggccgaccgagtgccgcccgaagaacgccggcaccacccgcgc  
 10 catcagcaccTGAAttaattaactcgaggcagcagcagctcgatagatcgacacactctggacgctgctgctgatggactgttgc  
 gccacacttgctgacctgacctgtgaatatccctgccgctttatcaaacagcctcagtgctgtttgatcttgtgtgtacgcgcttttcgagttgct  
 agctgctgtgctatttgcgaataccacccccagcatccccctccctcgtttcatatcgcttgcacccaaccgcaacttatctacgctgtcctgc  
 tatccctcagcgcctgctcctgctcctgctcactgcccctcgacagccttggttgggctccgctgtattctcctggtactgcaacctgtaaac  
 cagcactgcaatgctgatgcacgggaagtgtgggatgggaacacaaatggaaagcttgagctcttgtttccagaaggagttgctcctga  
 15 gctttcattctcagcctcgataacctccaaagccgctctaattgtggagggggttcgaagacaggggtggttggctggatggggaaacgc  
 tggteggggattcagctcctgctgttatatactcctggaagcacacccagcactctgaagaagaaaacgtgcacacacacaacc  
 caaccggccgaatatttgcctccttaccgggtccaagagagactgcgatccccctcaatcagcactcctcctcctgcccgttca  
 atcttccctgcttgcctgcgcccggtgcgcctgctcccgccagtcagtcactcctgcacagggcccccttgtgcgagtgctcctgt  
 acccttaccgctccttccattctgcgaggccccctattgaatgtattcgttgcctgtgtggccaagcgggctgctgggcgcccgcgcg  
 20 tcgggcagtgctcggcgactttggcggaagccgattgttctctgtaagccacgcgcttgccttgggaagagaagggggggggg  
tactgaatggatgaggaggagaaggaggggtattggtattatctgagttgggtgaagagc*

**SEQ ID NO:113**

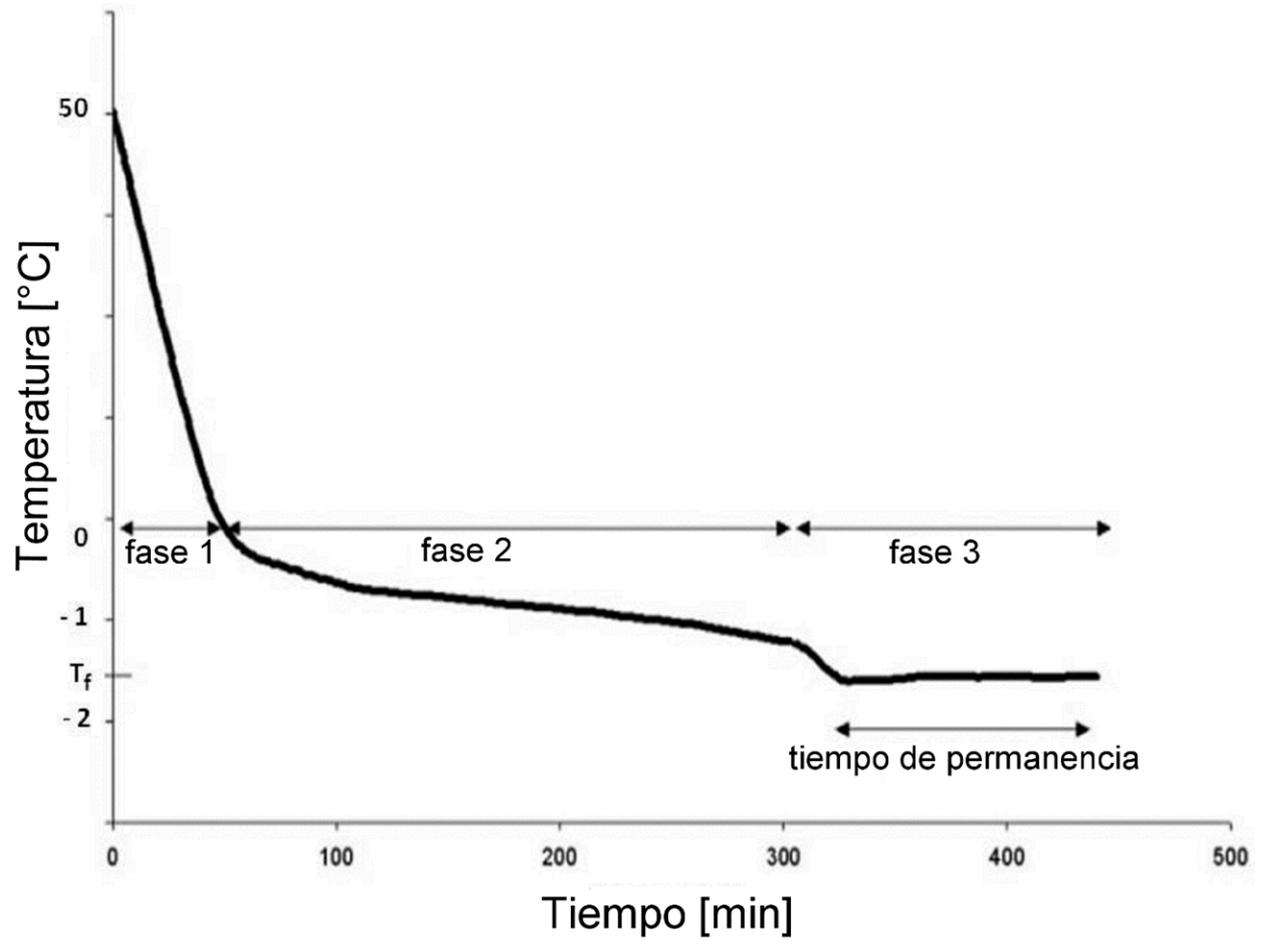
20 Porción del constructo 6S::β-Tub:suc2:nr:: β-tub:hairpin FatA:nr::6S, que contiene el primer  
 exón de la región codificante de FatA1, seguido del intrón endógeno y una unidad repetitiva del  
 primer exón en la orientación inversa

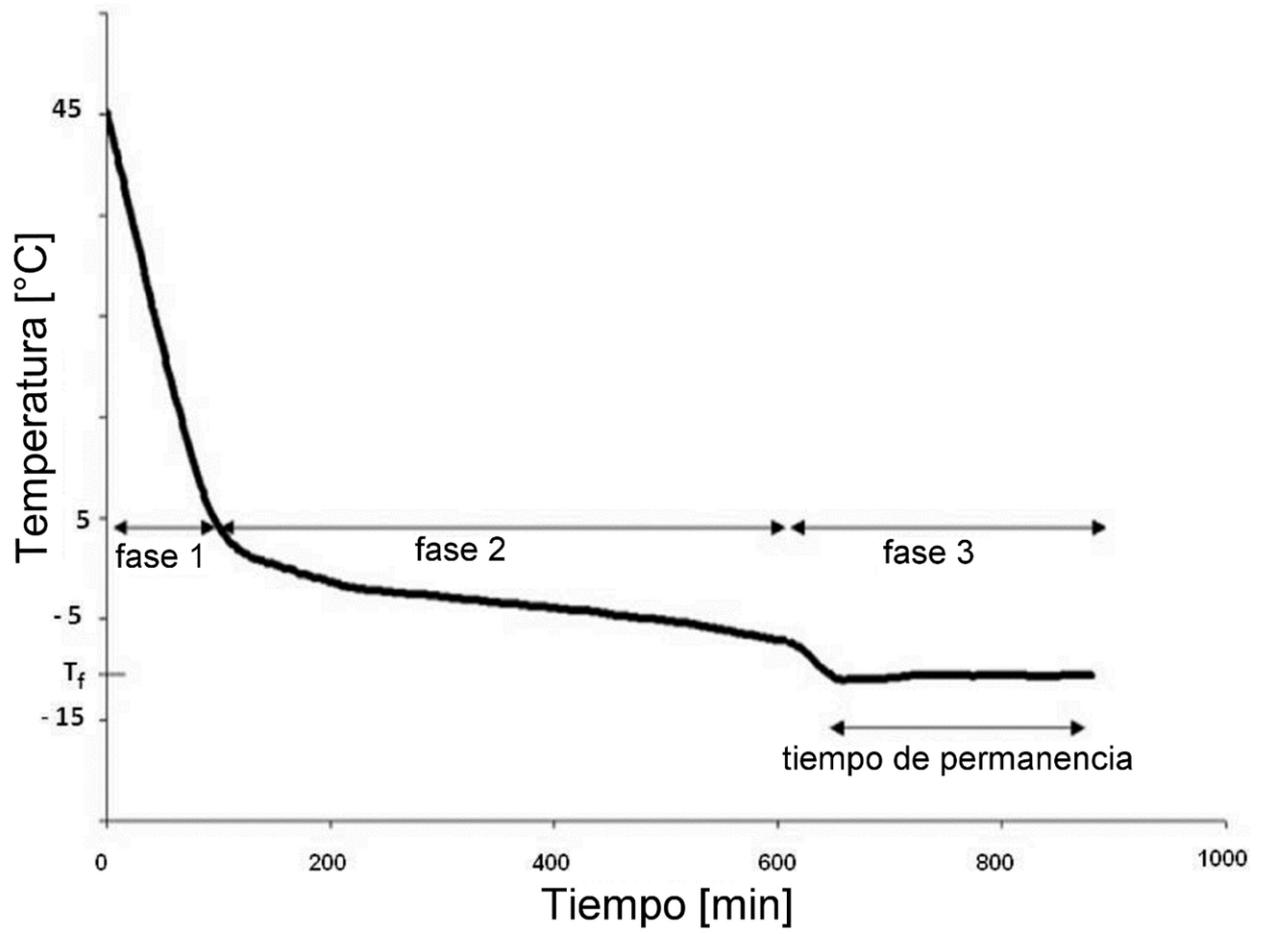
25 gctcttcgccgcccactcctgctcagcgcgcccgcgctgcccgccagcgccttggccttttcgccgctcgtgcgcgtcgt  
gatgtccatcaccaggtccatgaggtctgcttgcgccggtgagccactgcttcgctcggggcccaagaggagcatgaggag  
gactcctggtccagggtcctgacgtggteggctctgggagcgggcccagcatcatctggctctgccgaccgaggccgctccaa  
ctggtcctccagcagccgagtcgcccgcgaccctggcagaggaagacaggtgaggggggtatgaattgtacagaacaaccag  
agccttgtctaggcagaatccctaccagtcattgcttacctggatgacggcctgcgaacagctgtccagcagccctcgtgcgcc  
 30 gcttctcccgaacgcttcttccagcaccgtgatggcgagccagcgcgcgacgctggcgctgccttcgccgatctgaggacagt  
cggggaaactctgatcagctaaaccccttgcgcgtagtggcatcctttgcagaccggtgagagccgacttgtgtgcgccacc  
ccccacaccactcctccagaccaattctgcaaccttttggcgaaggcatcggcctcggcctgcagagaggacagcagtgcca  
gcccgtgggggttggcggtgacgctcaggtacccttcttgcgctatgacactccagcaaaaggtagggcgggctgcgagacggct  
tcccggcgctgcatgcaacaccgatgatgcttcgacccccgaagctccttcgggctgcatggcgctccgatgccgctccaggcgca  
gcgctgtttaaatagccaggccccgattgcaaagacattatagcgagctaccaaagccatattcaaacacctgactaccacttca  
 35 caggccactcgagcttgategcaactccgtaagggggcgcccttctccttcttcttcagtcacaacccgaaactctagaatatca**ATG**  
*ctgctgagcccttctgttctgctggccggttcgccccaagatcagcgcctccatgacgaacgagacgtccgaccgccccctggt  
 gcaactcaccaccaacaagggtggtgacgacccccagggcctgtggtacgacgagaaggacgccaagtggcaactgtacttcc  
 agtacaacccgaacgacaccgtctgggggacgcccttgttggggccacgccagctccgacgacctgaccaactgggaggaccag  
 cccatcgccatgccccgaagcgaacgactcggcgcccttccggctccatggtggtgactacaacaacactccgcttcttcaa  
 40 cgacaccatcgaccgcccagcgtgctggccatctggactacaacccccggagtcgaggagcagtagctcctacagcct  
 ggacggcggtacacctcaccgagtagcagaagaacccgctgctggccccaactcccccagttccgacccgaaggcttctg  
 gtacgagccctccagaagtggatcatgaccgcccgaagtcaccaggactacaagatcgagatctactcctccgacgacctgaatc  
 ctggaagctggagtccgcttcgccaacgagggcttctcggctaccagtagagtgccccgctgatcgaggtcccaccgagca  
 ggaccccagcaagtcactgggtgatgttcatctccatcaacccccggcgccccggcgctccttcaaccagtagcttctgcca  
 45 gcttcaacggcaccacttcgagccctcgacaaccagtcgccgctggtggacttcggcaaggactactacgcccctgcagaccttctc  
 aacaccgaccgacctacgggagcgccttggcctcgcgtggcctccaactgggagtagctccgcttctgcccaccaacccctgg  
 cgtcctccatgtccctcgtgcgaagttctccctcaacaccgagtagcaccggccaacccggagacggagctgatcaacctgaaggcc  
 gagccgatcctgaacatcagcaacgccggccccctggagccggttcgcccaacaccacggtgacgaaggccaacagctacaacg  
 tcgacctgccaacagcaccggcaccctggagttcagctggtgtacgccgtcaacaccaccagacgatctccaagtcctgttcgc*

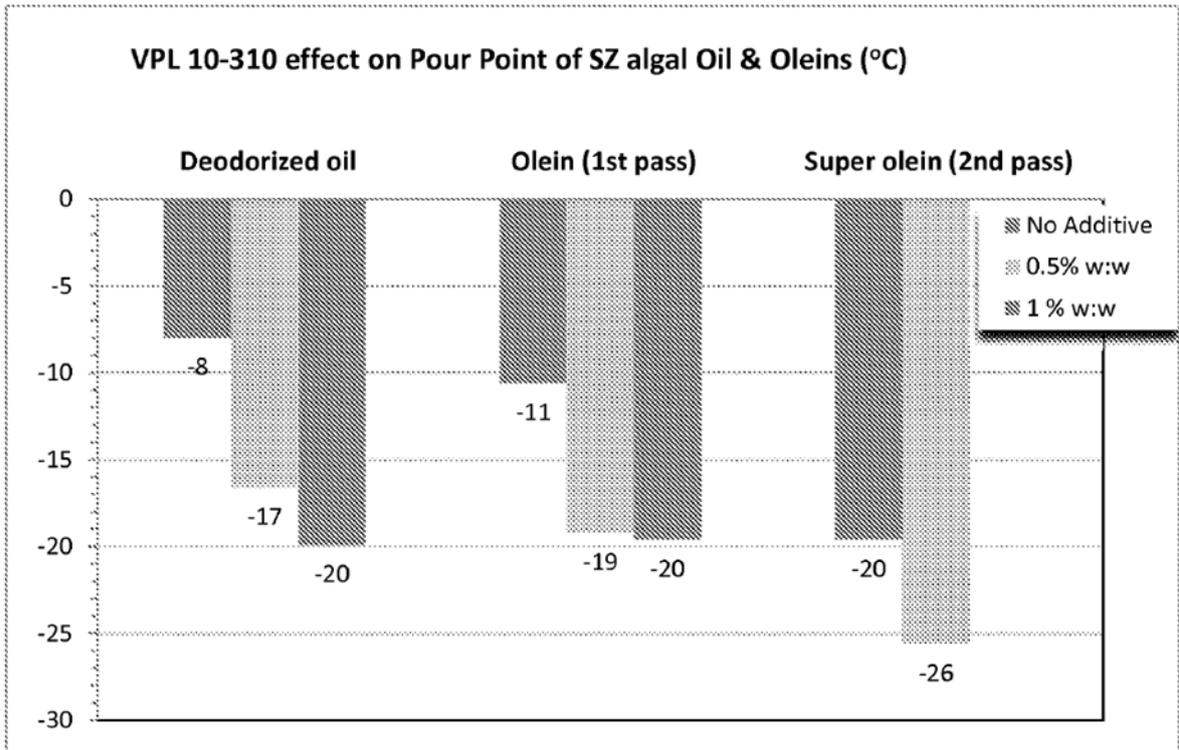
ggacctctccctctggttcaagggcctggaggaccccaggagtagctccgcgatgggcttcgaggtgtccgcgtcctccttcttctgga  
ccgcggggaacagcaaggtgaagttcgtgaaggagaaccctacttcaaccaaccgcgatgagcgtgaacaaccagccctcaagagc  
gagaacgacctgtcctactacaaggtgtacggcttgctggaccagaacatcctggagctgtacttcaacgacggcgacgtcgtgtcca  
ccaacacctacttcatgaccaccgggaacgccttgggctccgtgaacatgacgacgggggtggacaacctgttctacatcgacaagtt  
5 ccaggtgcgcgaggtcaag**TGAcaattggcagcagcagctcggatagtatcgacacactctggacgctgctcgtgtgatggactgttg**  
ccgccacacttgctgccttgacctgtgaatatccctgccgctttatcaaacagcctcagtggtttgatcttgtgtgtacgcgcttttgcgagttg  
ctagctgcttgtgctatfttgcgaataccacccccagcatccccttccctcgttccatcgccttgcacccaaccgcaacttatctacgctgtcct  
gctatccctcagcgcctgctcctgctcactgccctcgcacagccttggttgggctccgcctgtattctcctggtactgcaacctgtaa  
accagcactgcaatgctgatgcacgggaagtagtgggatgggaacacaaatggaggatcccgcgtctcgaacagagcgcgcagagga  
10 acgctgaaggtctcgcctctgtcgcacctcagcgcggcatacaccacaataaccacctgacgaatgcgcttggttctctgccattagcgaa  
gcgtccgggtcacacacgtgccacgttggcgaggtggcaggtgacaatgatcgggtggagctgatgctgaaacgttcacagcctagggat  
atcgaattccttcttgcgctatgacacttccagcaaaaggtaggggcgggctgcgagacggctcccggcgtgcatgcaaacaccgatg  
atgcttcgacccccgaagctccttcggggctgcatgggcgctccgatgccgctccagggcgagcgtgtttaaataagccaggcccc  
gattgcaaaagacattatagcgagctaccaaagccatattcaaacactagatcactaccacttctacacagccactcgagcttgtgat  
15 cgcactccgctaagggggcctcttctcttcttctcagtcacaaccggcaaac**actagtATGGCACCGACCAGCCTG**  
CTTGCCAGTACTGGCGTCTCTTCCGCTTCTCTGTGGTCCTCTGCGCGCTCCAGCGCGT  
GCGCTTTTCCGGTGGATCATGCGGTCCGTGGCGCACCCGACGCGGCCGCTGCCCATGC  
AGCGCCGCTGCTTCCGAACAGTGGCGGTCAGGGCCGCACCCGCGGTAGCCGTCCGT  
CCGGAACCCGCCCAAGAGTTTTGGGAGCAGCTTGAGCCCTGCAAGATGGCGGAGGA  
20 CAAGCGCATCTTCTTGAGGAGCACCGGTGCGTGGAGGTCCGGGGCTGACCGGCCG  
TCGCATTCAACGTAATCAATCGCATGATGATCAGAGGACACGAAAGTCTTGGTGGCG  
GTGGCCAGAAACTGTCCATTGCAAGGGCATAGGGATGCGTTCCTTCACCTCTCAT  
TTCTCATTTCTGAATCCCTCCCTGCTCACTCTTCTCCTCCTCCTTCCCGTTCACGCAG  
**CATTCGGGGCAACGAGGTGGGCCCGTGCTCCTCCAGGAAGATGCGCTTGTCTCCTCCGC**  
25 CATCTTGCAGGGCTCAAGCTGCTCCCAAACCTCTTGGGCGGGTTCCGGACGGACGGC  
TACCGCGGGTGCGGCCCTGACCGCCACTGTTCCGAAGCAGCGGCGCTGCATGGGCA  
GCGGCCGCTGCGGTGCGCCACGGACCGCATGATCCACCGGAAAAGCGCACGCGCTG  
GAGCGCGCAGAGGACCACAGAGAAGCGGAAGAGACGCCAGTACTGGCAAGCAGGC  
TGGTCCGGTGCCAT**atcgat**agatctttaagcagcagcagctcggatagtatcgacacactctggacgctgctcgtgtgatgg  
30 actgttccgcccacttgccttgacctgtgaatatccctgccgctttatcaaacagcctcagtggtttgatcttgtgtgtacgcgctttg  
cgagttgctagctgcttgcctatfttgcgaataccacccccagcatccccttccctcgttccatcgccttgcacccaaccgcaacttatctacg  
ctcctgctatccctcagcgcctgctcctgctcactgccctcgcacagccttggttgggctccgcctgtattctcctggtactgcaa  
cctgtaaacagcactgcaatgctgatgcacgggaagtagtgggatgggaacacaaatggaaagcttaatta**agagctcttgtttccaga**  
aggagttgctccttgagcctttcattctcagcctcgataacctccaagccgctctaattgtggagggggttgaatttaaagcttg  
35 gaatgttggttcgtgctctggaacaagcccagactgttgcctcactgggaaaaggaccatcagctccaaaaaacttcccgtcaa  
accgctacctctgcttgcgcgaatctgcctgtgaaatgccaccacattcatattgtgacgcttgagcagctgtgaattgctca  
gaatgtggaatcatctccccctgtgcgagcccatgccagcatgtcggggcgaggacacccgccactcgtacagcagaccatt  
atgetacctcaaatagttcataacagtgaccatatttctgaagctcccaacgagcactccatgetctgagtggccacccccg  
40 gccctggtgcttgcggagggcaggtcaaccggcatggggctaccgaaatccccgaccggatcccaccacccccgcgatgggaag  
aatctctccccgggatgtgggcccaccaccagcacaacctggtggcccaggcgagcgtcaaaccataccacacaaatatccttgg  
catcgccctgaattccttctgcccctctgctaccgggtcttctgtccgaagcaggggttctagggatcgtccgagtcgcgcaaac  
ccttctgcgctggcggggcttgttcgagcttgaagagc

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un fluido dieléctrico que comprende aceite microbiano, en donde el aceite microbiano tiene un punto de fluidez de menos de -5 ° C, y en donde la composición de ácidos grasos del aceite microbiano es al menos 50% C18: 1 y menos de 10% C18: 2; en donde el fluido dieléctrico comprende menos del 2% de C18: 2; y si el fluido dieléctrico comprende el aceite microbiano mezclado con otro aceite que no es un aceite microbiano, el contenido del otro aceite en el fluido dieléctrico es inferior al 30%.
- 10 2. El fluido dieléctrico de la reivindicación 1, en el que el fluido dieléctrico tiene un punto de fluidez de entre -10°C y -40°C.
3. El fluido dieléctrico de cualquier reivindicación precedente, en el que la composición de ácidos grasos del aceite microbiano es:
- 15 (i) al menos 60% de C18: 1; o  
(ii) al menos 70% C18: 1.
- 20 4. El fluido dieléctrico de cualquier reivindicación precedente, en el que el fluido dieléctrico tiene un punto de inflamación de 250°C a 375°C, o un punto de incendio de 300°C a 450°C.
5. El fluido dieléctrico de cualquier reivindicación precedente, en el que el valor de yodo del aceite microbiano está entre 25 y 200
- 25 6. El fluido dieléctrico de cualquier reivindicación precedente, que comprende además un depresor del punto de vertido.
7. El fluido dieléctrico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el fluido dieléctrico tiene un voltaje de ruptura de 20 kV a 75 kV, y / o una resistencia dieléctrica de 20 MV / m (RMS) a 75MV / m (RMS).
- 30 8. El fluido dieléctrico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el fluido dieléctrico comprende además un antioxidante, un desactivador de iones metálicos, un inhibidor de la corrosión, un demulsificador, un aditivo antidesgaste, un depresor del punto de vertido o un compuesto antihidrólisis .
- 35 9. El fluido dieléctrico de cualquier reivindicación precedente, en el que el aceite microbiano es producido por un microbio diseñado genéticamente para expresar uno o más genes exógenos.
10. El fluido dieléctrico de la reivindicación 9, en el que el microbio genéticamente modificado es *Prototheca* o *Chlorella*, opcionalmente *Prototheca moriformis*.
- 40 11. El fluido dieléctrico de la reivindicación 9 o la reivindicación 10, en el que el uno o más genes exógenos codificado (s):
- 45 (i) una invertasa de sacarosa;  
(ii) una acil-ACP tioesterasa grasa;  
(iii) dos o más tioesterasas acil-ACP grasas; o  
(iv) invertasa de sacarosa y una o más tioesterasas acil-ACP grasas.
- 50 12. El fluido dieléctrico de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el aceite microbiano es producido por un microbio diseñado genéticamente, y en el que el fluido dieléctrico tiene un punto de fluidez de entre -10 ° C y -40 ° C.
13. El fluido dieléctrico de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el fluido dieléctrico comprende al menos el 65% de C18: 1.
- 55 14. El fluido dieléctrico de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el fluido dieléctrico comprende menos del 30% de C16: 0.
- 60 15. Un componente eléctrico que comprende el fluido dieléctrico de cualquier reivindicación anterior, opcionalmente en el que el componente eléctrico es un transformador.

**Fig. 1**

**Fig. 2**



**Fig. 3**