

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 759 017**

51 Int. Cl.:

C12N 1/16 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.12.2015 PCT/IB2015/060031**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.07.2016 WO16108185**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.12.2015 E 15823819 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2019 EP 3240887**

54 Título: **Variante de levadura oleaginosa, método para obtener la misma y uso de la misma para la producción de lípidos**

30 Prioridad:

31.12.2014 IT MI20142292

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

07.05.2020

73 Titular/es:

**ENI S.P.A. (100.0%)
Piazzale E. Mattei 1
00144 Roma, IT**

72 Inventor/es:

**FRANZOSI, GIULIANA;
CUCCHETTI, DANIELA;
BIANCHI, DANIELE;
GALAFASSI, SILVIA y
COMPAGNO, CONCETTA**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 759 017 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

Variante de levadura oleaginosa, método para obtener la misma y uso de la misma para la producción de lípidos

5 La presente invención se relaciona con el campo de la biotecnología. En particular, la presente invención se refiere a una variante de levadura oleaginosa de la especie *Rhodosporidium azoricum* caracterizada por mayores rendimientos de biomasa y acumulación de lípidos intracelulares, en condiciones determinadas, con respecto a la cepa de tipo salvaje de la misma especie.

10 Además, la invención se refiere a un método a través del cual se obtuvo dicha variante de levadura oleaginosa de la especie *Rhodosporidium azoricum*.

La invención se refiere además a la producción de lípidos por medio de dicha cepa variante de levadura oleaginosa de la especie *Rhodosporidium azoricum*.

15 Los lípidos así obtenidos pueden usarse ventajosamente como intermedios de síntesis, particularmente en el campo denominado "química verde", o en la producción de biocombustibles tales como, por ejemplo, "biodiésel" o "diésel verde", que pueden usarse como tales, o en mezcla con otros combustibles para motores.

20 La producción de lípidos por procesos microbianos es una alternativa ventajosa a los métodos de producción actuales a partir de fuentes renovables. En comparación con la extracción de lípidos de la planta, los procesos microbianos son de menos coste desde el punto de vista económico, porque son escalables de una manera más fácil, requieren menos mano de obra y aprovechan la propiedad de los microorganismos de la reproducción rápida en sustratos de bajo coste como, por ejemplo, derivados de la hidrólisis de materiales lignocelulósicos. Además, son independientes de los factores climáticos y no compiten con la explotación agrícola del suelo con fines alimentarios.

Para este propósito, las levaduras oleaginosas son particularmente prometedoras, específicamente las levaduras que son capaces de acumular lípidos en condiciones de cultivo específicas, especialmente triglicéridos, por más del 25 % de su peso seco. El uso de levaduras oleaginosas para la producción de lípidos es conocido en la técnica. [Meng X., Yang J., Xu X., Zhang L., Nie Q., Xian M. (2009), "Biodiesel production from oleaginous microorganisms", *Renewable Energy*, vol. 34, p. 1-5; Galafassi S., Cucchetti D., Pizza F., Franzosi G., Bianchi D., Compagno C. (2012), "Lipid production for second generation biodiesel by the oleaginous yeast *Rhodotorula graminis*". *Bioresource Technol.*, vol. 111, p. 398-403].

30 El documento WO 2014/179748 (Junta de Regentes, Sistema de la Universidad de Texas) describe composiciones, organismos oleaginosos y métodos útiles para producir lípidos, precursores de lípidos y/u oleoquímicos. En particular, esta solicitud de patente describe una célula de levadura genéticamente modificada en donde el peso seco de dicha célula de levadura comprende más del 60 % p/p de lípidos, precursores de lípidos y oleoquímicos. La solicitud también describe un método para aislar una célula de levadura genéticamente modificada de una pluralidad de células de levadura.

35 Sin embargo, se describen algunas limitaciones referidas al uso de levaduras oleaginosas, que están relacionadas con sus mecanismos de control metabólico. Se demostró que algunas especies de levadura oleaginosa pueden acumular lípidos hasta el 60 % de su peso, sin embargo, la acumulación se inhibe por las altas concentraciones de algunos nutrientes normalmente incluidos en el medio de cultivo para promover la producción de biomasa (como, por ejemplo, nitrógeno, fuentes de azufre y fósforo). De hecho, en la técnica se divulga que la acumulación intracelular de lípidos aumenta significativamente a medida que, con el progreso del cultivo de estas levaduras oleaginosas, las proporciones molares en el medio de cultivo entre carbono y nitrógeno (C/N), o entre carbono y azufre (C/S), o entre carbono y fósforo (C/P) se equilibran a favor del carbono [Granger L.-M., Perlot P., Goma G., Pareilleux A. (1993) "Effect of various nutrient limitations on fatty acid production by *Rhodotorula glutinis*". *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 38 (6), p. 784-789; Wu S., Hu C., Jin G., Zhao X., Zhao Z.K. (2010) "Phosphate-limitation mediated lipid production by *Rhodosporidium toruloides*". *Bioresource Technol.*, vol. 101, p. 6124-6129; Wu S., Zhao X., Shen H., Wang Q., Zhao Z.K. (2011), "Microbial lipid production by *Rhodosporidium toruloides* under sulfate-limited conditions". *Bioresource Technol.*, vol. 102, p. 1803-1807].

40 Para superar dicha limitación y, por lo tanto, apoyar la acumulación de lípidos dentro de estas células de levadura, se desarrollaron configuraciones fermentativas y condiciones de cultivo que proporcionan concentraciones limitantes de nitrógeno en el medio de cultivo. [Zhao X., Hu C., Wu S., Shen, H., Zhao Z.K. (2011), "Lipid production by *Rhodosporidium toruloides* Y4 using different substrate feeding strategies", *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 38 (5), p. 627-632; Li Y., Zhao Z.K., Bai F. (2007), "High-density cultivation of oleaginous yeast *Rhodosporidium toruloides* Y4 in fed-batch culture", *Enzyme Microbial Technology*, vol. 41 p. 312-317].

45 En los documentos citados, para contrastar el efecto negativo de la deficiencia de fuentes de nutrientes en el rendimiento de la biomasa, los autores utilizan procedimientos de fermentación muy laboriosos, que proporcionan el uso de medios de cultivo con una composición definida y altos costes. Todo aquello limita la explotación de estos procedimientos con fines industriales.

5 Por lo tanto, el solicitante se ha enfrentado al problema de proporcionar una levadura oleaginosa capaz de acumular significativamente lípidos dentro de la célula, independientemente del método de fermentación y el uso de medios de cultivo de fuentes no seleccionadas, como, por ejemplo, hidrolizados de material lignocelulósico, de modo que el cultivo de dicha levadura permite obtener altos rendimientos de lípidos, sin utilizar métodos de cultivo laboriosos y poco económicos.

El solicitante ha encontrado ahora una levadura oleaginosa que supera la limitación de la técnica anterior.

10 Específicamente, la invención se refiere a una variante de *Rhodospiridium azoricum*, depositada el 10 de octubre de 2014 de acuerdo con el Tratado de Budapest en Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH-Inhoffenstraße 7 B 38124 Braunschweig (Alemania), número de depósito DSM 29495, que demostró rendimientos de acumulación intracelular de lípidos significativamente más altos que la cepa de tipo salvaje de la misma especie de *Rhodospiridium azoricum* cuando se cultiva en un medio de cultivo enriquecido en fuentes de nitrógeno.

15 De acuerdo con un segundo aspecto, la invención se relaciona con un método para obtener levaduras oleaginosas mutagenizadas que permitió la selección de la variante *Rhodospiridium azoricum* DSM 29495. Dicho método puede usarse ventajosamente para producir, mediante técnicas de mutagénesis aleatorias, y aislar variantes hiperacumuladoras de cepas de levadura oleaginosa.

20 Un aspecto adicional de la presente invención se relaciona con un proceso de producción de lípidos a través del cultivo de dicha variante *Rhodospiridium azoricum* DSM 29495. De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, dicho proceso se lleva a cabo en un fermentador alimentado por lotes en el que un derivado de la hidrólisis del material lignocelulósico se usa como sustrato.

Para los propósitos de la presente descripción y las siguientes reivindicaciones, las definiciones de los intervalos numéricos siempre comprenden extremos a menos que se especifique lo contrario.

30 Para los propósitos de la presente descripción y las siguientes reivindicaciones, el término "que comprende" también incluye los términos "que consiste esencialmente en" o "que consiste en".

35 Para los propósitos de la presente invención, con el término "biodiésel" se pretende un combustible para motores diésel que comprende ésteres de alquilo (tales como, por ejemplo, ésteres de metilo, propilo o etilo) de ácidos grasos de cadena larga derivados de fuentes biológicas.

40 Para los propósitos de la presente invención, con el término "diésel verde" se pretende un combustible para motores diésel que comprende productos de la hidrogenación o desoxigenación de lípidos derivados de fuentes biológicas en presencia de hidrógeno y al menos un catalizador.

45 Para los propósitos de la presente invención, con las palabras "levadura oleaginosa" se entiende una especie de levadura que incluye, pero no se limita absolutamente, a las especies de los siguientes géneros: *Yarrowia*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Trichosporon*, *Torulopsis*, *Lipomyces*, *Rhodotorula* y *Rhodospiridium* y que es capaz de acumular lípidos en una cantidad igual o superior al 25 % de su peso seco celular.

Para los propósitos de la presente invención, con el término "hiperacumulador" se entiende una variante de levadura oleaginosa capaz de acumular lípidos en un porcentaje igual a o superior al 40 % referido a su peso seco celular.

50 Para los propósitos de la presente invención, las palabras "cultivar" y "cultivo" indican los procesos a través de los cuales las células de un microorganismo crecen y se reproducen en condiciones controladas por el hombre. En los procesos definidos a través de las expresiones citadas anteriormente, está comprendida la "fermentación" de la levadura oleaginosa, llevada a cabo en algunas realizaciones de la invención.

55 Para los propósitos de la presente invención, las palabras "medio de cultivo" indican un líquido, o un gel, preparado para soportar el crecimiento de microorganismos, tales como, por ejemplo, células de levadura oleaginosa. El medio de cultivo puede ser de composición definida (por ejemplo, medio "YEPD", medio "B", etc.) o puede derivarse del tratamiento de fuentes no seleccionadas, tales como, por ejemplo, aguas residuales, desechos del mercado o hidrolizados de material lignocelulósico.

60 Para los propósitos de la presente invención, con las palabras "un sistema alimentado por lotes" se entiende un modo de fermentación semicontinua de la levadura oleaginosa, que permite extender el tiempo de crecimiento celular antes de alcanzar el estado estacionario mediante la adición de medios frescos al cultivo de acuerdo con parámetros predeterminados.

65 Para los propósitos de la presente invención, con las palabras "fuente de carbono", "fuente de nitrógeno", "fuente de azufre" y "fuente de fósforo" se entiende sustancias orgánicas o inorgánicas, o composiciones de dichas sustancias a

base de carbono, a base de nitrógeno a base de azufre (por ejemplo, sulfatos) y fósforo (por ejemplo, fosfatos), respectivamente, contenidos en el medio de cultivo y que un microorganismo puede metabolizar para derivar energía.

5 Para los propósitos de la presente invención, con el término "biomasa" se entiende todas las células producidas durante las fermentaciones o en los otros modos de cultivo. De acuerdo con algunas realizaciones de la presente invención, la biomasa puede separarse del medio de cultivo por centrifugación o por microfiltración.

10 Para los propósitos de la presente invención, con los términos "material lignocelulósico" y "biomasa lignocelulósica" se entiende una estructura compleja de origen vegetal que comprende celulosa, hemicelulosa y lignina. De este material a través de tratamientos químico-físicos y enzimáticos conocidos en la técnica anterior, se obtienen azúcares que pueden usarse como fuentes de carbono en procesos de fermentación de microorganismos para la producción de alcoholes y/o lípidos. Por ejemplo, de acuerdo con un método divulgado en la solicitud internacional de patente WO 2012/042544, el material lignocelulósico, después de la trituración y la molienda, se pretrata en un reactor presurizado con vapor de agua durante un tiempo predeterminado. Al final, después de una despresurización lenta, se separa la fase líquida enriquecida en azúcares derivada de la hidrólisis de la hemicelulosa. La fase sólida restante se somete a un nuevo tratamiento con vapor de agua en el reactor presurizado. Al final de esta segunda etapa, la presión establecida en el reactor se libera instantáneamente, para causar la explosión de vapor en las células de biomasa lignocelulósica que desenreda la estructura de la lignina y la celulosa. El material obtenido, combinado con la fase líquida obtenida previamente, se transfiere a un biorreactor junto con una suspensión enzimática que, teniendo más accesibilidad al material en vista del pretratamiento anterior, completa el proceso de hidrólisis de polisacáridos. La preparación obtenida puede llamarse "hidrolizado lignocelulósico".

Otras características y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada.

25 Por lo tanto, la presente invención se relaciona con la variante DSM 29495 de levadura oleaginosa de la especie *Rhodospodium azoricum*, caracterizada por la acumulación de lípidos intracelulares, depositada en Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Inhoffenstraße 7 B 38124 Braunschweig (Alemania), el 10 de octubre de 2014, con el número de depósito DSM 29495.

30 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, esta levadura se caracteriza por una acumulación de lípidos intracelulares en una cantidad mayor o igual al 60 % de su peso seco celular, preferiblemente en una cantidad comprendida entre 62 % y 70 %, cuando se cultiva en medios de cultivo ricos en fuentes de nitrógeno.

35 De acuerdo con una realización preferida, esta levadura se caracteriza por una acumulación de lípidos intracelulares en una cantidad mayor o igual al 40 %, preferiblemente en una cantidad comprendida entre el 45 % y el 60 % de su peso seco celular cuando se cultiva usando hidrolizados de materiales lignocelulósicos como fuentes de nutrientes, preferiblemente cuando dichos sustratos son hidrolizados de Arundo donax (caña común).

40 El genotipo de la cepa variante DSM 29495 se caracterizó comparando la secuencia de su ADN genómico con la secuencia de la cepa de tipo salvaje de *Rhodospodium azoricum*, como se describe en el ejemplo 2 que se informa a continuación.

45 Se encontraron 124 mutaciones. Entre estas, 116 están incluidas en las regiones de codificación del genoma, o en las áreas adyacentes a las zonas de codificación y, por lo tanto, probablemente están involucradas en los procesos de expresión y traducción en dichas áreas de codificación (por ejemplo, promotores o secuencias intrónicas), mientras que 8 están en áreas del genoma no codificantes de manera putativa. Con base en la comparación con el ADN transcrito (o "transcriptoma") de la cepa de tipo salvaje, fue posible atribuir mutaciones a 49 transcripciones génicas, para algunas de las cuales se observaron homologías con genes implicados en ubiquitinación, glicosilación, ribosilación, procesos de reciclaje de cofactores reducción oxidación (NADH deshidrogenasas) y con genes de algunos portadores de membrana.

50 Sin estar sujetos a ninguna teoría, dichas mutaciones (y, entre ellas, en particular las mutaciones en forma homocigótica) pueden explicar el comportamiento diferente de la variante DSM 29495 con respecto a la cepa de tipo salvaje, ya que interviene en las enzimas responsables del cofactor de nucleótidos de reoxidación y en sistemas que actúan como reguladores transcripcionales o posttranscripcionales, podrían actuar indirectamente sobre las rutas biosintéticas con relación a la producción de lípidos.

55 En la siguiente Tabla I se presentan mutaciones detectadas en el ADN genómico de la cepa variante DSM 29495 con respecto a la cepa de tipo salvaje. Para cada mutación, se indica la posición del denominado "contig", específicamente, en una de las regiones contiguas de ADN genómico que, ensambladas de acuerdo con su secuencia de nucleótidos, permiten la reconstrucción del genoma. Además, en la tabla se indican: el tipo de mutación (SNV: "variación de un solo nucleótido", mutación de un solo nucleótido; MNV: "variación de múltiples nucleótidos", mutación de más nucleótidos en secuencia; Ins: inserción de uno o más nucleótidos; Del: eliminación de uno o más nucleótidos), el número de nucleótidos involucrados, el nucleótido o los nucleótidos variaron (por mutación, inserción o eliminación) respectivamente en el genoma de la cepa de tipo salvaje y en el genoma de la cepa DSM 29495, la indicación de que

ES 2 759 017 T3

la mutación se observa en un gen presente en una sola copia (homocigoto) o en más copias (heterocigoto) en el genoma.

TABLA I

Región contigua	Posición	Tipo	Longitud	Tipo salvaje	Mut.	Copias
contig_118 (1..179119)						Homocigoto
	88613	SNV	1	G	A	
contig_125 (1..6454)						Heterocigoto
	838	SNV	1	G	A	
	3799	SNV	1	G	A	

ES 2 759 017 T3

Región contigua	Posición	Tipo	Longitud	Tipo salvaje	Mut.	Copias
	4304	SNV	1	G	A	Heterocigoto
	4331	SNV	1	G	A	Heterocigoto
contig_134 (1..24300)						
	23417	SNV	1	A	G	Homocigoto
	23420	SNV	1	T	G	Homocigoto
	23417	SNV	1	A	G	Heterocigoto
	23420	SNV	1	T	G	Heterocigoto
	23746	SNV	1	A	T	Heterocigoto
	23985	SNV	1	A	G	Heterocigoto
	23995	SNV	1	A	G	Heterocigoto
contig_135 (1..78168)						
	44534	SNV	1	G	T	Heterocigoto
	44537	SNV	1	G	C	Heterocigoto
	44549	SNV	1	T	A	Heterocigoto
	44552	SNV	1	G	C	Heterocigoto
	44688	SNV	1	G	A	Heterocigoto
	44691	SNV	1	A	C	Heterocigoto
	44697	SNV	1	G	C	Heterocigoto
	44701	SNV	1	G	T	Heterocigoto
	44981	SNV	1	C	T	Heterocigoto
	45008	SNV	1	C	G	Heterocigoto
	45047	SNV	1	G	A	Heterocigoto
	45059	SNV	1	T	C	Heterocigoto
	47692	SNV	1	C	T	Heterocigoto
	47707	SNV	1	T	C	Heterocigoto
	47904	SNV	1	C	T	Heterocigoto
	47917	SNV	1	G	C	Heterocigoto
	47935	SNV	1	C	A	Heterocigoto
	49371	SNV	1	C	G	Heterocigoto
	49377	SNV	1	C	G	Heterocigoto
	49383	SNV	1	T	G	Heterocigoto
contig_147 (1..47414)						
	46833	SNV	1	A	G	Heterocigoto
	46971	SNV	1	A	G	Heterocigoto
	46973	SNV	1	G	A	Heterocigoto
contig_148 (1..52523)						
	7780	SNV	1	C	T	Homocigoto
	7805	Del	3	TCC	-	Homocigoto
contig_17 (1..199344)						

ES 2 759 017 T3

Región contigua	Posición	Tipo	Longitud	Tipo salvaje	Mut.	Copias
	188703	Ins	6	-	ATGCCC	Homocigoto
contig_217 (1..91046)						
	790	SNV	1	A	G	Heterocigoto
	794	SNV	1	G	C	Heterocigoto
contig_287 (1..108965)						
	10951	SNV	1	C	T	Heterocigoto
contig_293 (1..4167)						
	432	SNV	1	C	T	Heterocigoto
	1565	SNV	1	C	G	Heterocigoto
	1930	SNV	1	G	A	Heterocigoto
	2318	SNV	1	C	G	Heterocigoto
	2652	Del	1	A	-	Homocigoto
	2652	Del	1	A	-	Heterocigoto
contig_311 (1..2053)						
	321	SNV	1	T	C	Homocigoto
	321	SNV	1	T	C	Heterocigoto
contig_324 (1..40071)						
	18905	SNV	1	C	T	Homocigoto
contig_330 (1..49930)						
	48496	SNV	1	A	G	Heterocigoto
contig_358 (1..8393)						
	6638	SNV	1	T	C	Heterocigoto
	6650	SNV	1	A	C	Heterocigoto
	6869	SNV	1	T	C	Heterocigoto
	6873	SNV	1	A	G	Heterocigoto
	6889	SNV	1	G	C	Heterocigoto
contig_381 (1..3531)						
	1962	SNV	1	C	A	Heterocigoto
contig_421 (1..324)						
	183	SNV	1	T	G	Heterocigoto
	196	SNV	1	T	C	Heterocigoto
contig_465 (1..4081)						
	1294	SNV	1	A	G	Heterocigoto
	1299	SNV	1	T	C	Heterocigoto
	1306	SNV	1	T	A	Heterocigoto
	1309	SNV	1	G	A	Heterocigoto
	1341	MNV	2	TG	CA	Heterocigoto
	1362	Del	1	C	-	Heterocigoto
	1370	SNV	1	G	A	Heterocigoto

ES 2 759 017 T3

Región contigua	Posición	Tipo	Longitud	Tipo salvaje	Mut.	Copias
contig_467 (1..7174)						
	2721	SNV	1	A	G	Heterocigoto
	2683	SNV	1	G	A	Heterocigoto
	2690	SNV	1	C	T	Heterocigoto
	2698	SNV	1	A	G	Heterocigoto
contig_468 (1..895)						
	304	SNV	1	G	A	Heterocigoto
	331	SNV	1	C	T	Heterocigoto
	174	SNV	1	G	A	Heterocigoto
contig_469 (1..687)						
	338	MNV	2	CA	TG	Heterocigoto
	343	SNV	1	A	G	Heterocigoto
	359	SNV	1	T	C	Heterocigoto
contig_51 (1..125008)						
	117390	SNV	1	C	T	Heterocigoto
	117400	SNV	1	G	A	Heterocigoto
	117407	SNV	1	T	C	Heterocigoto
	117409	SNV	1	C	T	Heterocigoto
	117418	SNV	1	C	T	Heterocigoto
	117579	SNV	1	G	T	Heterocigoto
contig_56 (1..124207)						
	523	MNV	2	TC	AA	Homocigoto
	3297	SNV	1	G	A	Heterocigoto
	3299	SNV	1	A	T	Heterocigoto
	3446	SNV	1	G	A	Heterocigoto
	3515	SNV	1	C	T	Heterocigoto
	3681	SNV	1	T	C	Heterocigoto
	3689	SNV	1	A	G	Heterocigoto
	3693	SNV	1	G	A	Heterocigoto
	3702	SNV	1	C	T	Heterocigoto
contig_595 (1..265)						
	142	SNV	1	A	G	Heterocigoto
cointig_603 (1..331)						
	172	SNV	1	A	G	Heterocigoto
contig_673 (1..205)						
	46	MNV	2	TG	CA	Heterocigoto
contig_733 (1..347)						
	241	SNV	1	G	C	Heterocigoto
contig_75 (1..8581)						

ES 2 759 017 T3

Región contigua	Posición	Tipo	Longitud	Tipo salvaje	Mut.	Copias
	2409	SNV	1	C	A	Heterocigoto
contig_76 (1..86377)						
	468	SNV	1	C	T	Heterocigoto
	469	SNV	1	T	C	Homocigoto
contig_793 (1..216)						
	177	SNV	1	C	T	Heterocigoto
	180	SNV	1	C	T	Heterocigoto
contig_82 (1..127699)						
	50031	SNV	1	T	G	Heterocigoto
	50049	SNV	1	T	G	Heterocigoto
	50073	SNV	1	C	G	Heterocigoto
	50076	SNV	1	G	C	Heterocigoto
	50087	SNV	1	G	A	Heterocigoto
	50090	SNV	1	A	G	Heterocigoto
	48500	SNV	1	G	C	Heterocigoto
	48506	SNV	1	G	A	Heterocigoto
	48518	SNV	1	C	G	Heterocigoto
	48537	SNV	1	A	G	Heterocigoto
	48552	SNV	1	C	G	Heterocigoto
	48554	SNV	1	A	G	Heterocigoto
	48566	SNV	1	A	T	Heterocigoto
	48575	SNV	1	G	A	Heterocigoto
contig_887 (1..296)						
	134	SNV	1	C	G	Heterocigoto
	149	SNV	1	C	T	Heterocigoto
contig_93 (1..338791)						
	4048	SNV	1	T	G	Homocigoto
contig_99 (1..119178)						
	29299	SNV	1	C	A	Heterocigoto
	29307	SNV	1	C	T	Heterocigoto
	29310	SNV	1	A	T	Heterocigoto
	29320	SNV	1	G	C	Heterocigoto
	29336	SNV	1	G	A	Heterocigoto
	29341	SNV	1	T	G	Heterocigoto
	29349	SNV	1	G	A	Heterocigoto

La capacidad de acumulación de lípidos de la variante *Rhodosporidium azoricum* DSM 29495, en comparación con la cepa de tipo salvaje, se probó mediante varios experimentos, algunos de los cuales se describen en los ejemplos presentados a continuación, en los que se determinó la producción de biomasa y la cantidad de lípidos acumulados durante la fermentación.

Un aspecto adicional de la presente invención se relaciona con un método para obtener variantes de levadura oleaginosa, preferiblemente seleccionadas de las especies que incluyen *Yarrowia* spp., *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Trichosporon* spp., *Torulopsis* spp., *Lipomyces* spp., *Rhodotorula* spp. y *Rhodospiridium* spp., que comprende las etapas de:

i. exponer las células de una cepa de levadura oleaginosa a un agente mutagénico para generar mutaciones aleatorias en el ADN genómico;

ii. inocular y cultivar en un medio de cultivo las células tratadas con el agente mutagénico, caracterizándose dicho medio de cultivo por la presencia de al menos una fuente de carbono a concentraciones comprendidas entre 20 g/l y 100 g/l, preferiblemente entre 30 g/l y 50 g/l, y en donde está presente al menos una fuente de nitrógeno, preferiblemente a concentraciones comprendidas entre 3 g/l y 40 g/l, más preferiblemente entre 5 g/l y 20 g/l;

iii. separar del cultivo celular las células de levadura caracterizadas por una menor densidad.

Todas las etapas del método descrito anteriormente se llevan a cabo preferiblemente en condiciones estériles, para evitar la contaminación del cultivo por microorganismos presentes en el medio ambiente, y más preferiblemente en la secuencia descrita.

De acuerdo con una realización preferida, la etapa de cultivo ii. de dicho método puede llevarse a cabo durante un tiempo comprendido entre 16 y 48 horas, a una temperatura comprendida entre 10 °C y 40 °C, más preferiblemente entre 20 °C y 30 °C.

La etapa iii. de dicho método comprende las subetapas de:

a) recolectar una muestra del cultivo y agregar al menos un agente espesante en una cantidad adecuada;

b) centrifugar la suspensión celular así obtenida a baja velocidad;

c) recolectar la fracción más alta del sobrenadante de centrifugación para aislar las células caracterizadas por una menor densidad del resto del cultivo celular;

d) inocular y cultivar la fracción del sobrenadante aislada en la subetapa c) de dicho método en un medio de cultivo, caracterizado por la presencia de al menos una fuente de carbono a concentraciones comprendidas entre 20 g/l y 100 g/l, preferiblemente entre 30 g/l y 50 g/l, y en donde está presente al menos una fuente de nitrógeno, preferiblemente a concentraciones comprendidas entre 3 g/l y 40 g/l, más preferiblemente entre 5 g/l y 20 g/l;

e) repetir las subetapas de a) a d), al menos 2 veces, preferiblemente al menos 5 a 20 veces;

f) aislar colonias mutantes individuales.

Los espesantes adecuados para los fines de la presente invención son productos y mezclas de productos adaptados para crear gradientes de densidad por centrifugación y compatibles con la supervivencia del microorganismo tratado. Dichos productos comprenden, preferiblemente, compuestos polihidroxílicos tales como, por ejemplo, glicerol, sacarosa, sorbitol y dextrano, que se usan, de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica anterior, para separar células procariotas, células eucariotas y componentes subcelulares de las mismas, por centrifugación de gradiente de densidad.

La subetapa a) descrita anteriormente se lleva a cabo añadiendo a la muestra de cultivo, como espesante, sorbitol hasta una concentración comprendida entre 1M y 3M.

Cabe destacar que el método de la presente invención aprovecha las características de menor densidad de células que acumulan grandes cantidades de lípidos con respecto a las células que acumulan menos cantidades de lípidos para seleccionar variantes de la cepa de levadura oleaginosa que se diferencian de la cepa de tipo salvaje por el hecho de poder crecer y acumular lípidos con un mayor grado, en dicho medio rico en fuentes de carbono y de nutrientes adicionales con respecto a lo que ocurre en las células de la cepa de tipo salvaje.

De acuerdo con una realización preferida, el cultivo de la subetapa d) de dicho método puede llevarse a cabo durante un tiempo comprendido entre 16 y 48 horas, a una temperatura comprendida entre 10 °C y 40 °C, más preferiblemente entre 20 °C y 30 °C.

El aislamiento de las colonias mutantes individuales [subetapa f)] puede llevarse a cabo mediante procedimientos conocidos en la técnica anterior tales como, por ejemplo, la dilución en serie o la distribución de la suspensión celular en un medio que contiene agar u otros agentes solidificantes.

ES 2 759 017 T3

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, la levadura oleaginosa utilizada puede ser *Rhodospordium azoricum*.

5 De acuerdo con una realización preferida adicional de la presente invención, la levadura oleaginosa mutante obtenida mediante el uso de dicho método puede ser la variante de la cepa *Rhodospordium azoricum* DMS 29495.

De hecho, debe observarse que dicho método se usó ventajosamente para obtener la variante de la cepa *Rhodospordium azoricum* DSM 29495.

10 El método descrito anteriormente se puede utilizar de manera rentable para seleccionar variantes que acumulen lípidos en medios ricos no solo en fuentes de nitrógeno, sino también en fuentes de fósforo y azufre, tanto inorgánicas como orgánicas, así como de otros elementos de nutrientes que, de acuerdo con las enseñanzas de la técnica anterior, de manera similar a lo que ocurre para las fuentes de nitrógeno, cuando está presente en concentraciones adecuadas para el cultivo de levadura, incluso estimulando el crecimiento de biomasa, muestra un efecto inhibitorio sobre el proceso de acumulación de lípidos dentro del microorganismo.

15 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, en el medio de cultivo utilizado en dicho método, la al menos una fuente de nitrógeno puede reemplazarse por al menos una fuente de azufre, orgánico o inorgánico, a una concentración comprendida entre 3 g/l y 40 g/l, preferiblemente entre 5 g/l y 20 g/l.

20 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, en el medio de cultivo utilizado en dicho método, la al menos una fuente de nitrógeno puede reemplazarse por al menos una fuente de fósforo, orgánico o inorgánico, a concentraciones comprendidas entre 3 g/l y 40g/l, preferiblemente entre 5 g/l y 20 g/l.

25 El proceso de mutagénesis de acuerdo con dicho método puede llevarse a cabo de acuerdo con cualquiera de las técnicas conocidas para este propósito.

30 De acuerdo con una realización particular preferida de la presente invención, el proceso de mutagénesis puede llevarse a cabo de manera física mediante la exposición de dicha cepa de levadura a la radiación ultravioleta (UV) con una longitud de onda comprendida entre 230 y 260 nm.

35 La mutagénesis por exposición a la radiación UV puede llevarse a cabo como se describe en la técnica anterior [Winston F. (2008) "Current Protocols in Molecular Biology" John Wiley & Sons], y, por ejemplo, puede llevarse a cabo exponiendo las células de levadura colocadas en una placa de Petri en un medio solidificado con agar y una fuente de radiación UV (representada por al menos una lámpara con una potencia comprendida entre 8 y 15 W con una longitud de onda comprendida entre 230 y 260 nm), colocada a una distancia comprendida entre 10 y 50 cm de las placas de Petri, durante un tiempo comprendido entre 5 segundos y 5 minutos.

40 De acuerdo con una realización preferida adicional de la presente invención, el proceso de mutagénesis de acuerdo con dicho método puede llevarse a cabo por vía química, añadiendo mesilato de etilo (EMS) a una concentración comprendida entre 0.1 % y 10 % (vol/vol) al medio de cultivo en el que se inocula la cepa a tratar y se mantiene el cultivo en presencia de dicho agente mutagénico durante un tiempo comprendido entre 10 minutos y 12 horas, preferiblemente entre 1 hora y 8 horas.

45 Como sabe la persona experimentada en la técnica, es posible obtener una indicación sobre el número de células en el cultivo mediante la medición de la turbidez, o densidad óptica, del propio cultivo a 660 nm (densidad óptica, OD₆₆₀); por lo tanto, puede ser útil para fines prácticos que definen una cantidad de células determinada en el cultivo, o un volumen de dicho cultivo, en términos de OD₆₆₀.

50 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, el volumen de cultivo recolectado durante la subetapa a) de dicho método puede corresponder a una densidad óptica comprendida entre 50 OD₆₆₀ y 200 OD₆₆₀, preferiblemente entre 80 OD₆₆₀ y 150 OD₆₆₀.

55 Cabe señalar que, durante la subetapa a) de dicho método, como una alternativa a la adición directa del espesante al cultivo recolectado, es posible recuperar las células de muestra por centrifugación, resuspenderlas en un medio de cultivo fresco y se puede agregar a dicha suspensión, la cantidad deseada de espesante.

60 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, la centrifugación durante la subetapa b) de dicho método se puede llevar a cabo durante un tiempo comprendido entre 1 y 5 minutos a una aceleración comprendida entre 500 g y 1000 g.

65 Debe observarse que repitiendo las etapas de a) a d) de dicho método varias veces, se pueden obtener numerosas generaciones de la cepa mutante, en el orden de varias decenas; eso aumenta la probabilidad de que la acumulación de lípidos no esté vinculada a una remodelación de la expresión de la proteína relacionada con las condiciones de cultivo, sino que es un comportamiento realmente impreso a nivel genético. Además, de esta manera se promueve el enriquecimiento de la población de posibles mutantes con el hiperacumulador más eficaz.

La cepa variante *Rhodospiridium azoricum* DSM 29495 obtenida con el método descrito anteriormente puede usarse ventajosamente para la producción microbiana de lípidos mediante procesos de fermentación en condiciones que promueven la producción de biomasa.

5 Por lo tanto, es una realización adicional de la presente invención un método para producir lípidos a través del cultivo de la variante de levadura oleaginoso *Rhodospiridium azoricum* DSM 29495, que comprende las etapas de:

10 i. preparar un medio de cultivo que comprende:

- al menos una fuente de carbono a concentraciones entre 20 g/l y 100 g/l, preferiblemente entre 30 g/l y 50 g/l;

- al menos una fuente de nitrógeno, preferiblemente a concentraciones comprendidas entre 3 g/l y 40 g/l, más preferiblemente entre 5 g/l y 20 g/l;

15 ii. cultivar dicha variante de levadura oleaginoso en dicho medio de cultivo;

iii. separar las células de levadura del medio de cultivo;

20 iv. extraer los lípidos intracelulares acumulados dentro de las células de levadura.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, el cultivo puede llevarse a cabo a una temperatura comprendida entre 10 °C y 40 °C, preferiblemente comprendida entre 20 °C y 30 °C.

25 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, el cultivo puede llevarse a cabo durante un tiempo comprendido entre 50 horas y 200 horas, preferiblemente comprendido entre 90 horas y 150 horas.

30 En una realización preferida de la presente invención, el cultivo puede realizarse en condiciones aerobias, mediante insuflación de aire estéril y mediante agitación variable entre 600 y 900 rpm modulada con flujo de aire para mantener la concentración de oxígeno disuelto (DO₂) igual al 30 % del valor de saturación.

35 De acuerdo con un aspecto preferido de la presente invención, el cultivo puede llevarse a cabo a un valor de pH comprendido entre 4.5 y 7.0, preferiblemente comprendido entre 5.0 y 6.5. Para mantener el pH dentro de los intervalos deseados, una solución acuosa de al menos una base inorgánica tal como, por ejemplo, NaOH, KOH, Ca(OH)₂, Mg(OH)₂ o mezclas de los mismos, preferiblemente KOH, o una solución acuosa de al menos un ácido inorgánico tal como, por ejemplo, H₃PO₄, H₂SO₄, HCl o mezclas de los mismos, preferiblemente H₂SO₄, se puede agregar al medio de cultivo utilizado para la fermentación, en una cantidad tal que se obtenga el pH deseado.

40 En una realización preferida de la presente invención, el cultivo puede realizarse a partir de un inóculo en una cantidad comprendida entre 1 % y 5 % (vol/vol) del volumen total del medio, obtenido de un cultivo previo de dicha cepa de levadura realizado en el mismo medio durante un tiempo comprendido entre 6 y 24 horas.

45 Dicho cultivo anterior puede inocularse a su vez a partir de un cultivo anterior o puede inocularse a partir de una muestra de dicha cepa de levadura mantenida a -80 °C en una suspensión que contiene 15 % (vol/vol) de glicerol.

De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, el medio de cultivo puede comprender glucosa como fuente de carbono y (NH₄)₂SO₄ como fuente de nitrógeno.

50 De acuerdo con una realización preferida de la invención, el medio de cultivo de acuerdo con dicho método puede comprender un hidrolizado lignocelulósico como fuente de carbono.

De acuerdo con una realización preferida adicional de la invención, dicho hidrolizado lignocelulósico puede derivar del tratamiento de:

55 a. productos derivados de cultivos expresamente cultivados para uso energético, por ejemplo, especies de los géneros *Arundo*, *Miscanthus*, *Panicum*, que comprenden sobras, residuos y desechos derivados de dichos productos o del procesamiento de los mismos;

60 b. productos derivados de la agricultura, por ejemplo, especies de los géneros *Carduus*, *Parthenium*, *Zea*, *Glycine*, *Gossypium*, *Linum*, *Brassica*, *Saccharum*, *Elaeis*, *Attalea*, que comprenden sobras, residuos y desechos derivados de dichos productos o del procesamiento de los mismos;

65 c. productos derivados de la forestación o silvicultura, que comprenden sobras, residuos y desechos derivados de dichos productos o del procesamiento de los mismos;

d. sobras de alimentos y productos agrícolas para la alimentación humana o zootecnia;

e. residuos de la industria papelera, no tratados químicamente;

5 f. desechos derivados de la recolección de reciclaje de desechos sólidos urbanos (por ejemplo, de origen vegetal, papel);

g. algas, por ejemplo, microalgas o macroalgas, en particular macroalgas.

10 De acuerdo con una realización preferida de la invención, dicho hidrolizado lignocelulósico puede derivarse del tratamiento de especímenes de la especie *Arundo donax* (caña común), que comprende sobras, residuos y desechos derivados del procesamiento de los mismos.

15 De acuerdo con una realización preferida adicional de la invención, dicho hidrolizado lignocelulósico de *Arundo donax* (caña común) puede obtenerse mediante tratamiento hidrotérmico ("explosión de vapor") y posterior hidrólisis enzimática.

Durante los experimentos de producción de lípidos en un fermentador, el cultivo de acuerdo con dicho método puede llevarse a cabo en modo "alimentado por lote".

20 De acuerdo con una realización preferida de la invención, un cultivo llevado a cabo de acuerdo con dicho método, desarrollado durante un tiempo comprendido entre 12 y 24 horas después del inóculo, puede llevarse a cabo adicionalmente "alimentado por lote", preferiblemente durante un tiempo comprendido entre 90 horas y 200 horas, más preferiblemente comprendido entre 100 y 150 horas, mediante la adición de una solución acuosa de glucosa para obtener una concentración estable de glucosa en el medio comprendida entre 25 g/l y 50 g/l.

25 En una realización preferida, un cultivo llevado a cabo de acuerdo con dicho método, desarrollado durante un tiempo comprendido entre 12 y 24 horas después del inóculo, puede llevarse a cabo adicionalmente "alimentado por lote", preferiblemente durante un tiempo comprendido entre 90 horas y 200 horas, más preferiblemente comprendidas entre 100 y 150 horas, mediante la adición de un hidrolizado lignocelulósico para obtener una concentración estable de azúcares totales comprendida entre 25 g/l y 50 g/l.

30 El crecimiento celular en cultivo puede medirse mediante métodos espectrofotométricos que determinan la turbidez o la densidad óptica (OD) de una muestra de cultivo a 660 nm (OD_{660}).

35 Al final del cultivo, las células de cepa variante de levadura oleaginosa *Rhodospiridium azoricum* DSM 29495 utilizadas en la fermentación pueden separarse del medio de cultivo a través de métodos conocidos en la técnica anterior tales como, por ejemplo, filtración, prensado de filtro, microfiltración o ultrafiltración, centrifugación.

40 Para concentrar más la suspensión acuosa de biomasa celular oleaginosa obtenida después de la separación, dicha suspensión acuosa de biomasa puede someterse adicionalmente a centrifugación. Dicha centrifugación puede llevarse a cabo durante un tiempo comprendido entre 5 minutos y 30 minutos, preferiblemente comprendido entre 15 minutos y 25 minutos, a una velocidad de rotación comprendida entre 3000 rpm y 9000 rpm, preferiblemente comprendida entre 4000 rpm y 8000 rpm.

45 La biomasa producida puede medirse en gramos por litro de cultivo, determinando el peso seco de las células de levadura de una muestra de cultivo de volumen conocido recolectado a intervalos predeterminados y al final de la fermentación.

50 Para recuperar los lípidos, la biomasa que comprende las células de levadura oleaginosa obtenidas puede someterse a lisis celular de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica anterior y descritos, por ejemplo, en la solicitud internacional de patente WO2014/102254 entre los cuales se encuentran, por ejemplo, el tratamiento con calor en un reactor presurizado, el tratamiento mecánico con un homogeneizador o el tratamiento con microondas.

55 Al final de dicha lisis celular, los lípidos pueden recuperarse de la suspensión obtenida, mediante extracción con disolventes orgánicos polares o apolares, de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica anterior y descritos, por ejemplo, en la solicitud internacional de patente WO2014/102254.

60 La producción de lípidos a partir de células en cultivo puede medirse mediante métodos colorimétricos conocidos en la técnica anterior, directamente en una muestra de suspensión de células de levadura, por ejemplo, con sulfo-fosfo-vanilina usando, por ejemplo, el kit "Lípidos totales: sulfo-fosfo-vainilina" comercializado por Spinreact S.A.U., Ctra. Santa Coloma, 7 E-17176 St. Esteve d'en Bas (GI), España.

65 Además, la cantidad de lípidos producida puede determinarse con métodos gravimétricos en la fracción extraída con mezclas de disolventes orgánicos, por ejemplo con cloroformo:metanol 2:1, vol/vol [Folch J., Lees M., Sloan-Stanley G.H. (1957), "A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues", J. Biol. Chem., vol.

226, p. 497-509] o con n-hexano:isopropanol 3:2 vol/vol [Hara A., Radin N.S. (1978), "Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent", Anal. Biochem., vol. 90, p. 420-426], de muestras de biomasa liofilizada.

5 Para evaluar los rendimientos relacionados con la acumulación de lípidos en la fermentación de la variante *Rhodospiridium azoricum* DSM 29495, con respecto a la cepa de tipo salvaje, el peso seco de la biomasa (expresado en g/l) y la cantidad de lípidos (expresada en g/l) a través de los métodos enumerados anteriormente, al final del cultivo se puede determinar y medir la proporción porcentual entre estos dos parámetros.

10 Debe observarse que, en las condiciones de fermentación de acuerdo con el método reivindicado en la presente invención, la variante de la especie *Rhodospiridium azoricum* DSM 29495, con respecto a la cepa de tipo salvaje de la misma especie, produce rendimientos más altos tanto en términos de biomasa (aumento comprendido entre 13 % y 58 %) y lípidos acumulados (aumento comprendido entre 37 % y 65 %).

15 La fracción lipídica puede analizarse mediante técnicas cromatográficas, por ejemplo, mediante cromatografía de gases o mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de acuerdo con los procedimientos de la técnica anterior.

20 Mediante dichos métodos analíticos se detectó que los lípidos acumulados en las células de levadura oleaginosas están representados en un 90 % por triglicéridos, preferiblemente ésteres de glicerol con ácidos grasos que tienen de 8 a 24 átomos de carbono, tales como, por ejemplo, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico y ácido α -linoleico.

Otros lípidos que pueden estar presentes son: fosfolípidos, monoglicéridos, diglicéridos, ácidos grasos libres o mezclas de los mismos.

25 Los lípidos obtenidos de acuerdo con el proceso objeto de la presente invención pueden usarse ventajosamente como intermedios de síntesis, particularmente en el campo de la denominada "química verde". Además, pueden someterse a transesterificación en presencia de al menos un alcohol que tiene de 1 a 4 átomos de carbono, preferiblemente metanol o etanol, y de al menos un catalizador ácido o básico, para producir glicerol y ésteres de alquilo, particularmente ésteres metílicos o ésteres etílicos ("biodiésel").

30 Alternativamente, dichos lípidos pueden someterse a hidrogenación/desoxigenación en presencia de hidrógeno y de al menos un catalizador para producir "diésel verde". Los procesos de hidrogenación/desoxigenación se conocen en la técnica anterior y se divulgan, por ejemplo, en la solicitud Europea de patente EP 1,728,844.

35 Para realizar la presente invención e ilustrarla mejor, a continuación, se presentan algunos ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1 (obtención de la variante *Rhodospiridium azoricum* DSM 29495)

40 A continuación, se presenta un ejemplo práctico del método para obtener cepas variantes de la cepa de tipo salvaje de la especie *Rhodospiridium azoricum*, a través de las cuales se obtuvo la variante depositada en Leibniz-Institut DSMZ, con el número de depósito DSM 29495.

En tal ejemplo, la mutagénesis aleatoria se obtuvo por irradiación UV.

45 Se inoculó una muestra celular de una cepa de tipo salvaje de la especie *Rhodospiridium azoricum* en el medio "YEPE" (10 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de peptona, 20 g/l de glucosa) hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento (10 OD₆₆₀). Después, las células se recolectaron por centrifugación a 1500 g durante 5 minutos, se lavaron en agua estéril, luego se resuspendieron en 1 ml de agua estéril y se colocaron en el fondo de una placa de Petri vacía.

50 Las células colocadas en la placa se expusieron a una fuente de radiación ultravioleta, representada por una lámpara UV de 15 vatios (longitud de onda de 254 nm), colocada a una distancia de 30 cm, durante un tiempo igual a 20 segundos, para obtener una tasa de vitalidad de residuo del 10 %. Después de eso, las células se recolectaron de la placa y se usaron para inocular un cultivo líquido de células de levadura en medio "B" (1 g/l de extracto de levadura, KH₂PO₄ 1 g/l, MgSO₄ · 7H₂O 0.05 g/l, NaCl 0.01 g/l, CaCl₂ · 2H₂O 0.01 g/l) que contiene (NH₄)₂SO₄ 5 g/l y dicho cultivo se incubó a 30 °C durante 24 horas.

55 Después, se recolectó un volumen de cultivo equivalente a 100 OD₆₆₀ y las células, recuperadas por centrifugación, se resuspendieron en 5 ml de medio "YEPE". A este volumen, se añadieron 5 ml de una solución estéril de sorbitol 2M y la suspensión celular así obtenida se centrifugó durante 1 minuto a 500 g. Después de la centrifugación, se recolectó de forma estéril 1 ml de suspensión de la fracción más alta de sobrenadante, aislando así las células con el mayor contenido de lípidos, menos densas, que las células sin lípidos más densas (o con lípidos acumulados en menor cantidad), que están ubicadas en la porción inferior del sobrenadante y en el sedimento de centrifugación. La muestra recolectada se usó para inocular un nuevo cultivo líquido. Esta serie de cultivo y el aislamiento de la fracción menos densa mediante centrifugación en un gradiente de densidad se repitió durante 8 ciclos, por lo tanto, el cultivo se extendió en medio "YEPE" que contenía agar, para aislar colonias de levadura individuales.

Ejemplo 2 (caracterización genotípica de la variante *Rhodosporidium azoricum* DSM 29495)

5 En el presente ejemplo, se describe el proceso de caracterización de la variante *Rhodosporidium azoricum* DSM 29495, mediante secuenciación del ADN genómico y análisis bioinformático de mutaciones presentes en comparación con la secuencia del ADN genómico de la cepa de tipo salvaje de la misma especie de levadura.

10 El ADN genómico se extrajo de cultivos de ambas cepas (variante DSM 29495 y la cepa de tipo salvaje) llevado a cabo en el medio "YEPD" (10 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de peptona, 20 g/l de glucosa) por una noche, y purificado con el kit comercial DNeasy Blood & Tissue kit de Quiagen (núm. cat. 69504) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el productor.

15 Después de verificar el grado de pureza e integridad por electroforesis, el ADN genómico de cada cepa se trató por separado con el kit "TrueSeq DNA Library Preparation Kit" de Illumina, siguiendo el protocolo combinado con el kit. Brevemente, el ADN se procesó para obtener fragmentos de dimensiones comprendidas entre 200 y 400 pb, luego se enlazó a los terminales 3' y 5' con los adaptadores de oligonucleótidos provistos con el kit y luego se amplificaron mediante "Reacción en Cadena de la Polimerasa" (PCR) usando como cebador los mismos oligonucleótidos. Los productos de amplificación génica se cuantificaron y verificaron con el dispositivo Bioanalyzer 2100 de Agilent Technology. De cada fragmento obtenido, la secuencia de ADN se determinó utilizando el secuenciador HiSeq2500 de Illumina y las secuencias obtenidas se optimizaron con base en el valor "phred" [Ewing B., Hillier L., Wendl M.C., Green P. (1998), "Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment". *Genome Res.* 8 (3): 175-185]. El análisis de secuencia permitió la identificación de 893 regiones contiguas ("contigs") de dimensiones que van desde 120 hasta 440,000 bp, para un total de 22,722,315 bp. Este valor está en línea con la dimensión del ADN genómico de levaduras filogenéticamente similares al género *Rhodosporidium*, por lo tanto, se cree que las bibliotecas obtenidas representan el genoma completo de *Rhodosporidium azoricum* DSM 29495 y de la cepa de tipo salvaje correspondiente. Las secuencias de los dos ADN genómicos se compararon entre sí utilizando el software "Map Reads to Reference" y "Quality-based Variant Detection" de CLCbio.

30 Las mutaciones identificadas se confirmaron verificando su presencia en ambas direcciones de secuenciación y determinando la precisión a través del valor "phred".

En general, en el ADN genómico de la variante de *Rhodosporidium azoricum* DSM 29495, se señalaron 124 mutaciones (que comprenden sustituciones, eliminaciones e inserciones de nucleótidos) presentadas en la Tabla I.

35 Ejemplo 3 (cultivo en matraz)

40 En este ejemplo, se evaluaron los rendimientos en términos de crecimiento y acumulación de lípidos de la cepa variante de levadura *Rhodosporidium azoricum* DSM 29495 en un medio enriquecido en fuentes de nitrógeno, en comparación con una cepa de tipo salvaje de la misma especie. En dos matraces estériles de 500 ml, se pusieron 100 ml de medio de cultivo "B" (1 g/l de extracto de levadura, 1 g/l de KH_2PO_4 , 0.05 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01 g/l de NaCl, 0.01 g/l de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) que contiene 5 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y su pH se ajustó a pH 6.0 mediante la adición del regulador MES 0.1 M.

45 En ambos matraces, el medio de cultivo se inoculó con un cultivo de la cepa variante de levadura *Rhodosporidium azoricum* DSM 29495 o de la cepa de tipo salvaje de la misma especie, ambas realizadas de forma preventiva en el medio "B" durante aproximadamente 24 horas, y se inoculó a su vez con muestras de las dos cepas de levadura mantenidas a -80 °C en una suspensión que contenga glicerol al 15 % (vol/vol). El volumen de cultivo inoculado se establece para obtener inicialmente 0.1 OD_{660} .

50 Después de aproximadamente 70 horas, después de 90 horas y luego de 114 horas de crecimiento, se recolectó una muestra de cultivo de ambos matraces y en dicha muestra se determinó la biomasa (expresada como peso seco de las células en g por litro de cultivo) y la cantidad de los lípidos acumulados (expresados como concentración lipídica en g/l del cultivo y como proporción porcentual entre el peso de los lípidos y el peso seco total de las células).

55 Los resultados del análisis se presentan en la Tabla II.

TABLA II

Cepa	Tiempo de cultivo en el momento del muestreo.	Peso seco (g/l de cultivo)	Lípidos (g/l de cultivo)	% de lípidos
<i>Rhodosporidium azoricum</i> tipo salvaje	66 horas	11.17	2.58	23
	90 horas	14.80	3.75	25
	114 horas	15.15	3.97	26

ES 2 759 017 T3

(continuación)

Cepa	Tiempo de cultivo en el momento del muestreo.	Peso seco (g/l de cultivo)	Lípidos (g/l de cultivo)	% de lípidos
<i>Rhodospiridium azoricum</i> DSM 29495	71 horas	12.40	3.62	29
	90 horas	15.08	4.88	32
	114 horas	17.18	7.33	43

Ejemplo 4 (cultivo "alimentado por lotes")

- 5 En este ejemplo, se evaluó el crecimiento y la acumulación de lípidos de la cepa variante de levadura *Rhodospiridium azoricum* DSM 29495, en comparación con la cepa de tipo salvaje de la misma especie, en una fermentación "alimentada por lotes".

10 Para preparar el inóculo de fermentación, se colocaron 100 ml de medio "YEPD" (1 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de peptona y 20 g/l de glucosa) en dos matraces de 500 ml.

15 Luego, el medio de cultivo se inoculó con cultivos de la cepa variante de levadura *Rhodospiridium azoricum* DSM 29495 o de la cepa de tipo salvaje de la misma especie, se llevó a cabo preventivamente en el medio "YEPD" durante aproximadamente 12 horas, y se inoculó a su vez con muestras de las dos cepas de levadura mantenidas a -80 °C en una suspensión que contiene glicerol al 15 % (vol/vol). El volumen de cultivo inoculado se establece para obtener inicialmente 0.1 OD₆₆₀.

Los cultivos se incubaron a 30 °C bajo agitación durante 24 horas.

20 Las suspensiones celulares obtenidas se usaron para inocular por separado fermentadores de 20 l, en los que se colocaron 6 l de medio que contenía 50 g/l de glucosa, 5 g/l de sólido de macerado de maíz, 2 g/l de extracto de levadura, 6 g/L de KH₂PO₄, 0.3 g/l de MgSO₄·7H₂O, 0.06 g/l de NaCl, 0.06 g/l de CaCl₂·2H₂O y 5 g/l de (NH₄)₂SO₄.

25 El volumen de inóculo para cada cepa es el necesario para obtener aproximadamente 6 l de suspensión celular que tiene 0.4 OD₆₆₀. Para la siguiente fase de crecimiento en el modo "alimentado por lote", cada fermentador se alimenta con una solución acuosa de 600 g/l de glucosa de acuerdo con la cinética de consumo de la fuente de carbono de las dos cepas de levadura, para mantener una concentración estable de glucosa en los cultivos, igual a 30 g/l.

30 El crecimiento se produjo en condiciones aerobias por flujo de aire y agitación variable entre 600 y 900 rpm moduladas con el flujo de aire para mantener la concentración de oxígeno disuelto (DO₂) igual al 30 % del valor de saturación, y a un pH de aproximadamente 5.0, mantenido mediante la adición, cuando sea necesario, de algunas gotas de una solución de KOH 5 M o H₂SO₄ al 10 % (vol/vol).

35 Después de 77 horas y después de 140 horas de crecimiento, de ambos fermentadores se recolectó una muestra de cultivo y en tales muestras se llevaron a cabo los análisis descritos en el ejemplo 3.

Los resultados del análisis se informan en la Tabla III.

TABLA III

Cepa	Tiempo de cultivo en el momento del muestreo.	Peso seco (g/l de cultivo)	Lípidos (g/l de cultivo)	% de lípidos	Productividad (g/l*h)
<i>Rhodospiridium azoricum</i> tipo salvaje	77 horas	70.80	22.80	32.20	0.29
	140 horas	76.10	34.80	45.70	0.24
<i>Rhodospiridium azoricum</i> DSM 29495	77 horas	64.90	33.10	51.00	0.43
	140 horas	95.30	61.80	64.90	0.44

40 Los datos presentados en esta tabla demuestran claramente que la variante de *Rhodospiridium azoricum* DSM 29495, en las condiciones de fermentación descritas, produce y acumula lípidos en cantidades significativamente más altas que la cepa de tipo salvaje.

45 Ejemplo 5 (cultivo "alimentado por lotes" usando un hidrolizado lignocelulósico de Arundo donax como nutriente)

ES 2 759 017 T3

En este ejemplo, se evaluó la producción de biomasa y acumulación de lípidos de la cepa variante de la levadura *Rhodospordium azoricum* DSM 29495 en una fermentación "alimentada por lotes", en la cual, se utilizó como sustrato de crecimiento, el hidrolizado lignocelulósico derivado del tratamiento hidrotérmico y enzimático de Arundo donax, en comparación con la cepa de tipo salvaje de la misma especie.

La composición del hidrolizado de Arundo donax utilizada comprende 224.75 g/l de glucosa, 107.19 g/l de xilosa, 3.94 g/l de arabinosa, 16.65 g/l de celobiosa, 4.24 g/l de glicerol, 9.80 g/l de ácido acético, 0.74 g/l de 5-hidroximetil-furfural y una concentración de nitrógeno total igual a 3.69 g/l. Los procedimientos analíticos son análogos a los descritos en la solicitud internacional de patente WO2014/102254.

El nitrógeno total se determinó mediante un analizador TOC/TN equipado con un detector infrarrojo de gas (NDIR, infrarrojo no dispersivo) y utilizando el método de oxidación catalítica desarrollado por Shimadzu.

Para preparar el inóculo de fermentación, se predispusieron en dos matraces de 2 l, 600 ml de medio que consiste en una mezcla de 560 ml de medio "YEPD" (extracto de levadura 1 g/l, peptona 10 g/l y glucosa 20 g/l) y 40 ml de hidrolizado lignocelulósico de Arundo donax.

El medio de cultivo se inoculó con 10 ml de cultivos de la cepa variante de levadura *Rhodospordium azoricum* DSM 29495 o de la cepa de tipo salvaje de la misma especie, se llevó a cabo preventivamente en el medio "YEPD" durante aproximadamente 12 horas, y se inoculó a su vez con muestras de las dos cepas de levadura mantenidas a -80 °C en suspensión que contiene glicerol al 15 % (vol/vol).

Los cultivos se incubaron a 30 °C bajo agitación durante 24 horas.

Se inoculó por separado un volumen igual a 550 ml de cada suspensión celular en dos fermentadores en los que estaba predispuesto un medio de fermentación con la siguiente composición: hidrolizado lignocelulósico de Arundo donax 127 ml/l, extracto de levadura 2 g/l, licor de macerado de maíz 3 g/l, KH₂PO₄ 6 g/l, MgSO₄·7H₂O 0.3 g/l, NaCl 0.06 g/l CaCl₂·2H₂O 0.06 g/l y (NH₄)₂SO₄ 4 g/L.

Para la siguiente etapa de crecimiento, en cada fermentador se alimentó el hidrolizado lignocelulósico de Arundo donax de acuerdo con la cinética de consumo de la fuente de carbono de las dos cepas de levadura, para mantener una concentración constante de glucosa en los cultivos igual a 30 g/l. Como el hidrolizado de Arundo donax tenía un contenido de nitrógeno total igual a 3.69 g/l, la alimentación también aportó dicha fuente nutricional al cultivo en el fermentador.

El crecimiento se llevó a cabo en condiciones aeróbicas, por insuflación de aire y agitación que oscila entre 600 y 900 rpm, modulada con un flujo de aire para mantener la concentración de oxígeno disuelto (DO₂) igual al 30 % del valor de saturación, y a pH igual a 6.0, mantenido mediante la adición, cuando sea necesario, de algunas gotas de una solución de KOH 5 M o H₂SO₄ al 10 % (vol/vol).

Después de 74 horas y después de 144 horas de crecimiento, se recolectó una muestra de cultivo de ambos fermentadores y en dichas muestras se llevaron a cabo los análisis descritos en el ejemplo 3.

Los resultados de los análisis se presentaron en la Tabla IV.

TABLA IV

Cepa	Tiempo de cultivo en el momento del muestreo.	Peso seco (g/l de cultivo)	Lípidos (g/l de cultivo)	% de lípidos	Productividad (g/l*h)
<i>Rhodospordium azoricum</i> tipo salvaje	74 horas	44.90	10.90	24.30	0.15
	144 horas	46.40	15.20	32.80	0.11
<i>Rhodospordium azoricum</i> DSM 29495	74 horas	56.00	21.25	38.30	0.29
	144 horas	73.30	33.10	45.20	0.23

REIVINDICACIONES

- 5 1. Variante de levadura oleaginosa *Rhodosporidium azoricum* DSM 29495, caracterizada por una alta acumulación de lípidos intracelulares.
2. Variante de levadura oleaginosa de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada por una acumulación de lípidos intracelulares en una cantidad mayor o igual al 60 % de su peso seco celular, preferiblemente en una cantidad comprendida entre 62 % y 70 %, cuando se cultiva en medios de cultivo ricos en fuentes de nitrógeno.
- 10 3. Variante de levadura oleaginosa de acuerdo con la reivindicación 1 que acumula lípidos en una cantidad mayor o igual al 40 %, preferiblemente en una cantidad comprendida entre el 45 % y el 60 % de su peso seco celular cuando se cultiva utilizando sustratos derivados de la hidrólisis de materiales lignocelulósicos como fuente de nutrientes, preferiblemente cuando dichos sustratos son hidrolizados de *Arundo donax* (caña común).
- 15 4. Método para obtener variantes de levadura oleaginosa, preferiblemente seleccionadas de las especies *Yarrowia* spp., *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Trichosporon* spp., *Torulopsis* spp., *Lipomyces* spp., *Rhodotorula* spp. y *Rhodosporidium* spp., que comprende las etapas de:
- 20 i. exponer las células de una cepa de levadura oleaginosa a un agente mutagénico para generar mutaciones aleatorias en el ADN genómico;
- ii. inocular y cultivar en un medio de cultivo las células tratadas con el agente mutagénico, dicho medio de cultivo caracterizado por la presencia de al menos una fuente de carbono a concentraciones comprendidas entre 20 g/l y 100 g/l, preferiblemente entre 30 g/l y 50 g/l, y en donde está presente al menos una fuente de nitrógeno, preferiblemente a concentraciones comprendidas entre 3 g/l y 40 g/l, más preferiblemente entre 5 g/l y 20 g/l;
- 25 iii. separar del cultivo celular las células de levadura caracterizadas por una menor densidad,
- en donde la etapa iii. de dicho método comprende las subetapas de:
- 30 a) recolectar una muestra del cultivo y agregar al menos un agente espesante en una cantidad adecuada;
- b) centrifugar a baja velocidad la suspensión celular así obtenida;
- 35 c) recolectar la fracción más alta del sobrenadante de centrifugación para aislar las células caracterizadas por una menor densidad del resto del cultivo celular;
- d) inocular y cultivar la fracción del sobrenadante aislada en la subetapa c) de dicho método en un medio de cultivo, caracterizado por la presencia de al menos una fuente de carbono a concentraciones comprendidas entre 20 g/l y 100 g/l, preferiblemente entre 30 g/l y 50 g/l, y en donde está presente al menos una fuente de nitrógeno, preferiblemente a concentraciones comprendidas entre 3 g/l y 40 g/l, más preferiblemente entre 5 g/l y 20 g/l;
- 40 e) repetir las subetapas de a) a d), por al menos 2 veces, preferiblemente al menos 5 a 20 veces;
- 45 f) aislar colonias mutantes individuales;
- y en donde la subetapa a) se lleva a cabo agregando sorbitol a la muestra de cultivo, como agente espesante, hasta una concentración comprendida entre 1M y 3M.
- 50 5. Método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde la etapa ii. de dicho método se lleva a cabo durante un tiempo comprendido entre 16 y 48 horas, a una temperatura comprendida entre 10 °C y 40 °C, preferiblemente entre 20 °C y 30 °C.
- 55 6. Método de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, en donde la subetapa d) de dicho método se lleva a cabo durante un tiempo comprendido entre 16 y 48 horas, a una temperatura comprendida entre 10 °C y 40 °C, preferiblemente entre 20 °C y 30 °C.
- 60 7. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en donde la levadura oleaginosa utilizada es *Rhodosporidium azoricum*.
8. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en donde el proceso de mutagénesis se lleva a cabo:
- 65 i. por vía física, a través de la exposición de dicha cepa de levadura a la radiación ultravioleta (UV) con una longitud de onda comprendida entre 230 y 260 nm; o

- 5 ii. por vía química, utilizando mesitato de etilo (EMS) a una concentración comprendida entre 0.1 % y 10 % (vol/vol) al medio de cultivo donde se inocula la cepa a tratar y mantener el cultivo en presencia de dicho agente mutagénico durante un tiempo comprendido entre 10 minutos y 12 horas, preferiblemente entre 1 hora y 8 horas.
9. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, en donde el volumen de cultivo recolectado durante la subetapa a) de dicho método corresponde a una densidad óptica comprendida entre 50 OD₆₆₀ y 200 OD₆₆₀, preferiblemente de 80 OD₆₆₀ a 150 OD₆₆₀.
- 10 10. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 9, en donde la centrifugación durante dicha subetapa b) de dicho método se puede llevar a cabo durante un tiempo comprendido entre 1 y 5 minutos a una aceleración comprendida entre 500 g y 1000 g.
- 15 11. Método para producir lípidos mediante el cultivo de la variante de levadura oleaginosa *Rhodospiridium azoricum* DSM 29495, que comprende las etapas de:
- i. preparar un medio de cultivo que comprende:
- 20 • al menos una fuente de carbono a concentraciones entre 20 g/l y 100 g/l, preferiblemente entre 30 g/l y 50 g/l;
- al menos una fuente de nitrógeno, preferiblemente a concentraciones comprendidas entre 3 g/l y 40 g/l, más preferiblemente entre 5 g/l y 20 g/l;
- 25 ii. cultivar dicha variante de levadura oleaginosa en dicho medio de cultivo;
- iii. separar las células de dicha levadura del medio de cultivo;
- iv. extraer los lípidos intracelulares acumulados dentro de las células de dicha levadura.
- 30 12. Método de acuerdo con la reivindicación 11, en donde el cultivo se lleva a cabo:
- i. a una temperatura comprendida entre 10 °C y 40 °C, preferiblemente comprendida entre 20 °C y 30 °C; y/o
- 35 ii. durante un tiempo comprendido entre 50 horas y 200 horas, preferiblemente comprendido entre 90 horas y 150 horas; y/o
- iii. en condiciones aerobias, soplando aire estéril y bajo agitación que varía de 600 a 900 revoluciones por minuto, modulado con el flujo de aire para mantener la concentración de oxígeno disuelto (DO₂), igual al 30 % del valor de saturación; y/o
- 40 iv. a un pH mantenido entre 4.5 y 7.0, preferiblemente mantenido entre 5.0 y 6.5.
13. Método de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, en donde el cultivo se lleva a cabo a partir de un inóculo en una cantidad comprendida entre 1 % y 5 % (vol/vol) del volumen total del medio, obtenido de un cultivo previo de dicha cepa de levadura llevada a cabo en el mismo medio durante un tiempo comprendido entre 6 y 24 horas.
- 45 14. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en donde el medio de cultivo comprende glucosa como fuente de carbono y (NH₄)₂SO₄ como fuente de nitrógeno.
- 50 15. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en donde el medio de cultivo comprende un hidrolizado lignocelulósico como fuente de carbono.
16. Método de acuerdo con la reivindicación 15, en donde dicho hidrolizado lignocelulósico deriva del tratamiento de:
- 55 a. productos derivados de cultivos expresamente cultivados para uso energético, por ejemplo, especies de los géneros *Arundo*, *Miscanthus*, *Panicum*, que comprenden sobras, residuos y desechos derivados de dichos productos o del procesamiento de los mismos;
- 60 b. productos derivados de la agricultura, por ejemplo, especies de los géneros *Carduus*, *Parthenium*, *Zea*, *Glycine*, *Gossypium*, *Linum*, *Brassica*, *Saccharum*, *Elaeis*, *Attalea*, que comprenden sobras, residuos y desechos derivados de dichos productos o del procesamiento de los mismos;
- c. productos derivados de la forestación o silvicultura, que comprenden sobras, residuos y desechos derivados de dichos productos o del procesamiento de los mismos;
- 65

ES 2 759 017 T3

- d. sobras de alimentos y productos agrícolas para la alimentación humana o zootecnia;
- e. residuos de la industria papelera, no tratados químicamente;
- 5 f. desechos derivados de la recolección de reciclaje de residuos sólidos urbanos (por ejemplo, de origen vegetal, papel);
- g. algas, por ejemplo, microalgas o macroalgas, en particular macroalgas.
- 10 17. Método de acuerdo con la reivindicación 15 o 16, en donde dicho hidrolizado lignocelulósico deriva del tratamiento de la especie Arundo donax (caña común), que comprende sobras, residuos y desechos derivados del procesamiento de los mismos.
- 15 18. Método de acuerdo con la reivindicación 17, en donde dicho hidrolizado lignocelulósico de Arundo donax (caña común) se obtiene mediante tratamiento hidrotérmico ("explosión de vapor") y posterior hidrólisis enzimática.
- 20 19. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14, en donde un cultivo, desarrollado durante un tiempo comprendido entre 12 y 24 horas después del inóculo, se lleva a cabo adicionalmente "alimentado por lotes", preferiblemente durante un tiempo comprendido entre 90 horas y 200 horas, más preferiblemente comprendidas entre 100 y 150 horas, añadiendo una solución acuosa de glucosa para obtener una concentración estable de glucosa en el medio comprendida entre 25 g/l y 50 g/l.
- 25 20. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, en donde un cultivo, desarrollado durante un tiempo comprendido entre 12 y 24 horas después del inóculo, se lleva a cabo adicionalmente "alimentado por lotes", preferiblemente durante un tiempo comprendido entre 90 horas y 200 horas, preferiblemente comprendido entre 100 y 150 horas, añadiendo hidrolizado lignocelulósico para obtener una concentración estable de azúcares totales comprendida entre 25 g/l y 50 g/l.