



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 346 773**

(51) Int. Cl.:

C12P 7/40 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **05826569 .5**

(96) Fecha de presentación : **13.12.2005**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1828392**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **05.09.2007**

(54) Título: **Producción de ácidos dicarboxílicos mediante cepas mutantes mejoradas de *Yarrowia lipolytica*.**

(30) Prioridad: **15.12.2004 FR 04 13468**

(73) Titular/es: **INSTITUT FRANÇAIS DU PÉTROLE**
1 & 4 avenue de Bois-Préau
92852 Rueil Malmaison Cédex, FR
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE y
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE (INRA)

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
20.10.2010

(72) Inventor/es: **Nicaud, Jean-Marc;**
Thevenieau, France;
Le Dall, Marie-Therese y
Marchal, Remy

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
20.10.2010

(74) Agente: **Ungría López, Javier**

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

Producción de ácidos dicarboxílicos mediante cepas mutantes mejoradas de *Yarrowia lipolytica*.

5 Campo de la invención

La invención se refiere a un procedimiento de producción de ácidos dicarboxílicos mediante una fermentación que emplea una cepa mutante de la levadura *Yarrowia lipolytica* a partir de un sustrato de bioconversión.

10 Los ácidos dicarboxílicos (también llamados “diácidos”) se utilizan como materias primas, por ejemplo, en la síntesis de poliamidas y de poliésteres, de aceites lubricantes, de agentes plastificantes o de perfumes.

15 Los procedimientos de producción de los diácidos varían según el número de átomos de carbono del esqueleto carbonado del diácido en cuestión (Johnson RW, Pollock CM, Cantrell RR, Editors Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, 4th Edition, 1983, págs. 118-136). De este modo, el ácido azelaico (diácido de C9) se obtiene convencionalmente mediante oxidación química del ácido oleico con ozono mientras que el ácido sebálico (diácido de C10) se produce mediante oxidación alcalina del ácido ricinoleico. El ácido dodecanodioico (diácido de C12) es un producto petroquímico. La vía microbiológica se utiliza para la producción de ácido brasílico (diácido de C13) a partir de tridecano.

20 Teniendo en cuenta la diversidad de los diácidos que se utilizan en las diferentes aplicaciones, el interés de una vía de producción aplicable a la más amplia gama posible de diácidos es incontrovertible. Aunque caracterizándose por una velocidad de reacción más lenta que la de la vía química, la vía biológica presenta el interés de ser aplicable a gran variedad de sustratos (el proceso de producción de diácidos por vía biológica se representa esquemáticamente en la figura 1).

30 De hecho, numerosas especies microbianas silvestres tales como *Cryptococcus neoformans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida cloacae*, etc. son capaces de excretar pequeñas cantidades de diácidos (Chan *et al.*, Stimulation of n-alkane conversion to dicarboxylic acid by organic-solvent- and detergent-treated microbes. Appl. Microbiol. Biotechnol., 34, 1991, 772-777; Shioi *et al.*: Microbial Production of Long-chain Dicarboxylic Acids from n-Alkanes. Part I. Screening and Properties of Microorganisms Producing Dicarboxylic Acids. Agr. Biol. Chem. 35, No. 13, 1971, págs. 2033-2042).

35 Sin embargo, para obtener excreciones sustanciales de diácidos, es conveniente utilizar mutantes que hayan sido bloqueados a nivel de la β -oxidación. Para muchas especies, dichos mutantes se obtuvieron mediante una mutagénesis aleatoria, seguida de una selección apropiada (patente EP 0 229 252 B1; Shioi *et al.*; Jiao *et al.*. Isolation and Enzyme Determination of *Candida tropicalis* Mutants for DCA Production. J. Gen. Appl. Microbiol. 2000, 46: 245-249). Una vía mucho más elegante, pero más exigente, que emplea las técnicas de mutagénesis dirigida, se ha desarrollado sin embargo para *Candida tropicalis*. A partir de una cepa silvestre que pertenece a esta especie, Picataggio *et al.*, alteraron secuencialmente los cuatro genes que codifican las dos isoenzimas de acil-CoA oxidasa (Aox) que catalizan la primera etapa de la β -oxidación (Determination of *Candida tropicalis* Acylcoenzyme A Oxidase Isoenzyme Function by Sequential Gene Disruption. Mol. Cell. Biol. 11, 1991, 4333-4339, y Patente de Estados Unidos N° 5254466 A1).

45 Estos mismos autores sobreexpresaron a continuación los genes que codifican la citocromo P450 monooxigenasa y la NADPH-citocromo reductasa, que constituyen las actividades que limitan la cinética de la conversión de los n-alcanos en diácidos (Picataggio *et al.*: Metabolic Engineering of *Candida tropicalis* for the Production of Long-chain Dicarboxylic Acids. Biotechnol. 10, 1992, 894-898, y Patente de Estados Unidos N° 5 648 247 A1). Sin embargo, los mutantes de *Candida tropicalis* producidos de acuerdo con un sistema de amplificación de múltiples copias no parecen totalmente estables y se prestan a posibles reverisiones. Es por esta razón que se han debido aportar mejoras a la técnica anterior (Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 2004/0014198 A1).

50 Whang *et al.*, (J. of Bacteriology, vol. 181, nº 17, septiembre de 1999, páginas 5140-5148) describe mutantes de *Yarrowia lipolytica* cuyos genes que codifican acil-CoA oxidasa han sido alterados.

55 Wache *et al.*, (Applied and Environmental Microbiology, vol 67, nº 12, diciembre de 2001, páginas 5700-5704) describe la transformación de ricinoleato en γ -decalactona, mediante cepas mutantes de *Yarrowia lipolytica* en las que se han alterado los genes que codifican acil-CoA oxidasa.

60 Objeto de la invención

El objeto de la invención es remediar los inconvenientes de la técnica anterior. Se ha descubierto, en efecto, que era posible, de manera ventajosa, producir diácidos utilizando mutantes de *Yarrowia lipolytica* cuyos genes que codifican acil-CoA oxidasa han sido alterados.

65 Los diácidos que el procedimiento de la invención pretende preparar son compuestos orgánicos de cadena hidrocarbonada lineal de al menos 10 átomos de carbono que comprenden una función carboxílica en cada extremo de la cadena.

Se utiliza como microorganismo un mutante de *Yarrowia lipolytica* en el que al menos los genes *POX2*, *POX3*, *POX4* y *POX5* han sido alterados, para bloquearlo parcialmente a nivel de la β -oxidación.

A parte de las acil-CoA oxidases codificadas por los genes *POX2*, *POX3*, *POX4* y *POX5*, otras dos acil-CoA oxidases codificadas por los genes *POX1* y *POX6*, de función desconocida, están presentes en el genoma de *Yarrowia lipolytica*.

Estas dos acil-CoA oxidases están implicadas en el consumo de nuevo de los diácidos biosintetizados mediante eliminación secuencial de dos átomos de carbono. La alteración suplementaria de los genes *POX1* y *POX6* conlleva por lo tanto la producción de diácidos que corresponden al perfil del sustrato de bioconversión. Por ejemplo, si se utiliza el aceite de girasol oleico, compuesto en su mayoría por ácidos grasos con 18 átomos de carbono, como sustrato de bioconversión, la cepa a la que se le delecionó el conjunto de los genes *POX*, producirá en su mayoría diácidos con 18 átomos de carbono.

Por otro lado, el sustrato de bioconversión puede almacenarse en forma de triglicéridos en la propia célula en forma de cuerpos lipídicos y volverse, por lo tanto, inaccesible para su bioconversión en diácidos. Se identificaron genes, mediante análisis proteómico, que estaban implicados en la acumulación del sustrato de bioconversión. Se identificaron los genes: *DGA1* (acil-CoA:diacilglicerol aciltransferasa) *TGL1* (triacilglicerol lipasa), *G3P* (glicerol-3-fosfato deshidrogenasa), *SCP2* (supuesto transportador de esterol), *LR01* (supuesta lecitina colesterol aciltransferasa) así como los *IPF 621* (función desconocida), *IPF 905* (función desconocida), e *IPF 2569* (sub-unidad NADH-ubiquinona reductasa).

La modificación de la actividad de estos genes (mediante alteración o sobreexpresión) conlleva, por lo tanto, una disminución de la acumulación del sustrato de bioconversión en forma de cuerpos lipídicos en el interior de la célula de *Yarrowia lipolytica*.

Se observará que el sistema genético de *Yarrowia lipolytica* es muy diferente del de *Candida tropicalis*. Al contrario que *Candida tropicalis* que es una levadura diploide, *Yarrowia lipolytica* es, en efecto, una especie haploide. En este último microorganismo, las operaciones de delección génica son, por lo tanto, mucho más eficaces y más seguras, debido también a la presencia de un único juego de cromosomas.

Por otro lado, un promotor del gen *POX2* que codifica acil-CoA oxidasa se utiliza para sobreexpresar genes tales como, por ejemplo, los que codifican la citocromo P450 mono-oxygenasa y la NADPH-citocromo reductasa. El promotor *pPOX2* tiene la propiedad de ser un promotor fuerte inducible por los sustratos de bioconversión. De este modo, la sobreexpresión de un gen de interés se realiza mediante la adición de una sola copia del gen bajo el control del promotor *pPOX2*, permitiendo obtener mutantes de *Yarrowia lipolytica* eficaces, estables y que no revierten, al contrario que los mutantes de *Candida tropicalis* obtenidos mediante un sistema de amplificación de múltiples copias.

Otra ventaja de *Yarrowia lipolytica* sobre *Candida tropicalis* para la producción de diácidos a partir de ésteres de ácidos grasos o de aceites naturales, por ejemplo vegetales, es la siguiente: la transformación de los aceites naturales en diácidos mediante *Candida tropicalis* requiere una hidrólisis química al menos parcial del sustrato antes de la realización de la fermentación (véase la Patente de Estados Unidos Nº 5 962 285). Esta hidrólisis se realiza mediante una saponificación realizada en presencia de hidróxido de calcio o de magnesio. Ésta produce las sales de ácidos grasos (jabones) correspondientes. Ahora bien, *Yarrowia lipolytica* presenta la capacidad de asimilar los triglicéridos como fuente de carbono. La primera etapa de este catabolismo implica la hidrólisis de los triglicéridos en ácidos grasos libres y glicerol por las enzimas lipolíticas (lipasas), identificadas por Peters y Nelson en 1951. A continuación se describirán una actividad lipasa extracelular y dos lipasas membranarias de 39 y 44 kDa (Barth *et al.*, *Yarrowia lipolytica*. en: Nonconventional Yeasts in Biotechnology A Handbook (Wolf, K., Ed.), Vol. 1, 1996, págs. 313-388. Springer-Verlag). *Yarrowia lipolytica* es capaz de producir varias lipasas (actividad extracelular, membranaria e intracelular). Recientemente, se han identificado los genes correspondientes a las lipasas descritas. El gen *LIP2* codifica una lipasa extracelular, *Lip2p* (Pignede *et al.*, 2000). Éste ha demostrado que ella hidrolizaba preferiblemente los triglicéridos de cadena larga de los restos oleicos (Barth *et al.*, 1996).

Yarrowia lipolytica hidroliza, por lo tanto, directamente los ésteres y los aceites naturales en ácidos grasos libres y glicerol en condiciones de pH compatibles con la realización de la fermentación. En estas condiciones, la hidrólisis del éster o del aceite y su conversión en diácidos tienen lugar simultáneamente, lo que presenta la ventaja de llevar a un protocolo operatorio simplificado, ya que se elimina la etapa de hidrólisis química.

Descripción detallada de la invención

De manera más detallada, la invención propone un procedimiento de producción de al menos un ácido dicarboxílico que comprende:

- (a) una fase de crecimiento, en la que se cultiva una cepa mutante de *Yarrowia lipolytica* que tiene alterados al menos los genes *POX2*, *POX3*, *POX4* y *POX5* (que codifican acil-CoA oxidasa) en un medio de cultivo constituido esencialmente por un sustrato energético que comprende al menos una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno;

- 5 (b) una fase de bioconversión, en la que se somete a dicha cepa a un sustrato de bioconversión seleccionado entre *n*-alcanos de al menos 10 átomos de carbono, ácidos grasos de al menos 10 átomos de carbono, ésteres de alquilo de 1 a 4 átomos de carbono de estos ácidos grasos, tales como las mezclas de ésteres metílicos o etílicos, o también aceites naturales (mezclas de ésteres de ácidos grasos de glicerol), en presencia de un sustrato energético; y
- (c) una fase de recuperación del ácido dicarboxílico formado.

10 Las cepas utilizadas en el procedimiento de la invención derivan de la cepa silvestre de *Yarrowia lipolytica* W29 (ATCC 20460, catalogada como CLIB89 en la *Collection de Levures d'interêt Biotechnologique-CLIB*). De este modo, pueden utilizarse nuevas cepas mutantes que derivan de la cepa de *Yarrowia lipolytica* ATCC 20460 por medio de la cepa Po1d [cepa auxótrofa para leucina (leu-) y uracilo (ura-)], descrita en la revisión de G. Barth *et al.* Ésta está catalogada como CLIB139 en la CLIB.

15 La obtención de estas nuevas cepas mutantes (MTLY37, MTLY66, MTLY74, MTLY79, MTLY80, MTLY81, FT120 y FT130) se describirá más adelante.

20 En el procedimiento de producción de diácidos de acuerdo con la invención, se cultiva la cepa mutante seleccionada en un medio constituido esencialmente por un sustrato energético que comprende al menos una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno hasta finalizar el crecimiento. Se añade entonces el sustrato de bioconversión (alcano o mezcla de alkanos, ácido graso o mezcla de ácidos grasos, éster de ácido graso o mezcla de ésteres de ácidos grasos o aceite natural o mezcla de estos diferentes sustratos) para iniciar la bioconversión en diácidos y se recuperan los diácidos formados mediante una técnica conocida por el especialista en la técnica, tal como precipitación con sales de calcio.

25 Durante la fase de bioconversión, el medio de cultivo puede comprender un aporte de sustrato energético secundario que consiste en general en al menos un compuesto polihidroxilado, tal como por ejemplo glicerol o un azúcar.

30 1. *Obtención de la cepa mutante MTLY37*

Para obtener esta cepa, puede procederse de la siguiente manera:

- 35 1) se secuencia el gen de interés (o bien se dispone de la secuencia de este gen en un banco de datos);
- 2) se construye una casete de alteración mediante PCR (“Polymerase Chain Reaction” [reacción en cadena de la polimerasa]) o mediante clonación, utilizando un marcador contra-seleccionable, por ejemplo el marcador URA3 (con el que se puede seleccionar el fenotipo Ura+ o el fenotipo Ura-);
- 40 3) se seleccionan las cepas con el gen de interés delecionado (transformación y selección de los transformantes (ventajosamente Ura+ si el marcador es URA3) y se verifica la alteración del gen).

45 A continuación se describe un método particular de obtención de la cepa mutante MTLY37.

En primer lugar se clonian y se secuencian genes *POX* de la cepa silvestre, cuyas secuencias son diferentes de las de *Candida tropicalis*. A continuación se construyen casetes de alteración de los genes que codifican las iso-enzimas de acil-CoA oxidasa. Se alteran los genes de acil-CoA oxidasa utilizando el marcador seleccionable URA3. Se amplifican 50 las regiones promotoras y terminadoras mediante una primera PCR, utilizando pares de oligonucleótidos específicos, lo que elimina la secuencia completa del marco abierto de lectura (ORF: “Open Reading Frame”). A continuación se realiza una segunda PCR con los cebadores externos y los productos de PCR de los promotores y terminadores, que se fusionan mediante una extensión común de 20 pb que comprende un sitio para la enzima de restricción I-SceI. El producto de PCR se clona para dar una serie de plásmidos (designados mediante pPOX-PT) que contienen el módulo 55 promotor-terminador (casete de alteración 2).

Un gen URA3 se introduce en el sitio I-SceI de la casete POX-PT. Se construye una serie de plásmidos pPOX-PUT que contienen el módulo promotor-URA3-terminador (casete de alteración 1). A estas construcciones se les llama pPOX1-PUT, pPOX2-PUT, pPOX3-PUT, pPOX4-PUT y pPOX5-PUT para los plásmidos que contienen la casete de alteración 1, por un lado, y pPOX1-PT, pPOX2-PT, pPOX3-PT, pPOX4-PT y pPOX5-PT para los plásmidos que contienen la casete de alteración 2, por el otro.

60 Las casetes de alteración se amplifican por PCR con los cebadores específicos externos utilizando, por ejemplo, la *Pfu* polimerasa (suministrada por Stratagene, La Jolla, California). El análisis final de las secuencias de proteínas revela que las acil-CoA oxidadas de *Yarrowia lipolytica* tienen un grado de identidad del 45% (50% de similitud) con el de las otras levaduras. El grado de identidad entre ellas varía entre el 55 y el 70% (65 y 76% de similitud).

ES 2 346 773 T3

Después de construir las cassetes de alteración de los genes que codifican la acil-CoA oxidasa, puede realizarse la transformación de *Yarrowia lipolytica* mediante diferentes métodos. Puede emplearse una electroporación, en la que el ADN entra gracias al choque eléctrico. Más ventajosamente, se empleará el método con acetato de litio y con polietilenglicol. Este método es descrito por Gaillardin *et al.*: LEU2 Directed Expression of Beta-galactosidase Activity and Phleomycin Resistance in *Yarrowia lipolytica*. Curr. Genet. 11, 1987, 369-375.

La presencia de alteración se verifica mediante PCR de acuerdo con la técnica de Gussow *et al.*: Direct Clone Characterization from Plaques and Colonies by the Polymerase Chain Reaction. Nucleic Acids Res. 17, 1989, 4000, y a continuación se confirma mediante hibridación por transferencia de Southern.

10

A partir de la cepa Po1d, las alteraciones se realizan en dos etapas.

En un primer momento, se transforma Po1d con la casete 1 de alteración de PCR PUT y se selecciona. En un segundo momento, los clones Ura+ se transforman con la casete de alteración 2, para eliminar el gen URA3 y se seleccionan. Este protocolo permite la obtención del cuádruplo de alteración MTLY37 - pox2ΔPT- pox3ΔPT - pox4ΔPT- pox5ΔPUT. La representación esquemática de la construcción de este mutante se resume en la Tabla 1 a continuación.

20

TABLA 1

Etapas de transformación requeridas para la producción del mutante MTLY37 que ya no crece sobre ácido oleico

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Etapa	Operaciones de transformación		
	Mutante a transformar	Casete de transformación	Mutante transformado
1	PO1d, Leu-, Ura-	POX5-PUT	MTLY15, Leu-, Ura+, Δ5-PUT
2	MTLY15, Leu-, Ura+, Δ5-PUT	LEU2	MTLY19, Leu+, Ura+, Δ5-PUT
3	MTLY19, Leu+, Ura+, Δ5-PUT	POX5-PT	MTLY24, Leu+, Ura-, Δ5-PT
4	MTLY24, Leu+, Ura-, Δ5-PT	POX2-PUT	MTLY29, Leu+, Ura+, Δ5-PT, Δ2-PUT
5	MTLY29, Leu+, Ura+, Δ5-PT, Δ2-PUT	POX2-PT	MTLY32, Leu+, Ura-, Δ5-PT, Δ2-PT
6	MTLY32, Leu+, Ura-, Δ5-PT, Δ2-PT	POX3-PUT	MTLY35, Leu+, Ura+, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PUT
7	MTLY35, Leu+, Ura+, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PUT	POX3-PT	MTLY36, Leu+, Ura-, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT
8	MTLY36, Leu+, Ura-, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT	MTLY18 con POX4 delecionado (Δ4-PUT)	MTLY37, Leu+, Ura+, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-PUT

ES 2 346 773 T3

La alteración de un gen y la escisión del marcador también pueden realizarse mediante un método que emplea una recombinación o una recombinasa. Pueden utilizarse por ejemplo marcadores con, a uno y otro lado, una secuencia repetida (que permite la recombinación que se ha seleccionado) o una secuencia lox que es reconocida por la recombinasa Cre. La escisión tiene lugar cuando se expresa la Recombinasa Cre, Fickers *et al.*, 2003 New Disruption

- 5 Casetes for Rapid Gene Disruption and Marker Rescue in the Yeast *Yarrowia lipolytica*. J. Microbiol. Methods 55/3: 727-737.

2. Obtención de la cepa de *Yarrowia lipolytica* mutante MTLY74

10 A partir del mutante MTLY37, se construyó la cepa MTLY74 Leu+Ura-.

- 15 2a. A partir del mutante MTLY37 protótrofo (Leu+, Ura+), se construyó una cepa de *Yarrowia lipolytica* mutante MTLY66 auxótrofa para leucina y uracilo (Leu-, Ura-). La primera etapa es la construcción de la cepa MTLY40 auxótrofa para uracilo (Leu+, Ura-) mediante conversión del marcador URA3 con el marcador ura3-41 transformando el fragmento de PCR que contiene este marcador y seleccionando los Ura- en presencia de 5FOA. A partir del mutante MTLY40, se construyó una cepa de *Yarrowia lipolytica* mutante MTLY64 auxótrofa para leucina (Leu-, Ura-, Hyg+) mediante alteración del marcador LEU2 transformando la casete de alteración PHTleu2 y seleccionando los transformantes resistentes a higromicina (leu2::Hyg). A partir del mutante MTLY64, se construyó una cepa de *Yarrowia lipolytica* mutante MTLY66 auxótrofa para leucina (Leu-, Ura-) mediante escisión del marcador HYG transformando el vector de replicación pRRQ2 que contiene la recombinasa Cre y el marcador LEU2 (Cre-LEU2) y seleccionando los transformantes sensibles a higromicina, Leu+. La pérdida del plásmido pRRQ2 se realiza mediante un cultivo en medio rico YPD y mediante el aislamiento de un clon (Leu-, Ura-, Hyg-).
- 20 2b. A partir del mutante MTLY66, se construyó una cepa de *Yarrowia lipolytica* mutante MTLY74 Leu+Ura- que sobreexpresa la NADPH-citocromo reductasa, expresándola bajo el control del promotor fuerte pPOX2, inducido por los sustratos de bioconversión, de tipo ácido graso, éster de ácido graso o aceite natural.

30 Se introdujo el gen que codifica la NADPH-citocromo reductasa (CPR) en un vector que comprende el gen de selección LEU2, por ejemplo JMP21, bajo el control del promotor pPOX2 inducible por ácidos grasos, ésteres de ácido graso o aceites naturales. La casete marcador-promotor-gen (LEU2- pPOX2-CPR) se introduce mediante transformación.

35 La representación esquemática de la construcción de este mutante se resume en la Tabla 2 a continuación.

40 (Tabla pasa a página siguiente)

45

50

55

60

65

ES 2 346 773 T3

TABLA 2

Etapas de transformación requeridas para la producción del mutante MTLY74 a partir de MTLY37

Etapa	Operaciones de transformación		
	Mutante a transformar	Transformación con	Mutante transformado
1	MTLY37, Leu+, Ura+, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-PUT	Fragmento de PCR ura3-41, selección de 5FOA	MTLY40, Leu+, Ura-, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T
2	MTLY40, Leu+, Ura-, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T	Casete PHTleu2, selección de higromicina	MTLY64, Leu-, Ura-, Hyg+, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T, Leu2::Hyg
3	MTLY64, Leu-, Ura-, Hyg+, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T, Leu2::Hyg	Vector pRRQ2, selección de Leu+, verificación de Hyg-, pérdida del plásmido pRRQ2 en YPD, aislamiento de Leu-	MTLY66, Leu-, Ura-, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T, ΔLeu2
4	MTLY66, Leu-, Ura-, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T, ΔLeu2	Casete de expresión pPOX2-CPR de JM21-CPR	MTLY74, Leu+, Ura-, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T, CPR

3. Obtención de las cepas MTLY79, MTLY80 y MTLY81 a partir del mutante común MTLY74

3a. MTLY79 que expresa la NADPH-citocromo reductasa y la citocromo P450 monooxigenasa ALK1 bajo el control del promotor pPOX2 inducible mediante ácidos grasos, ésteres de ácido graso o aceites naturales

A partir del mutante MTLY74, se construyó una cepa de *Yarrowia lipolytica* mutante MTLY79 que sobreexpresa la NADPH-citocromo reductasa y la citocromo P450 monooxigenasa ALK1 en condiciones de bioconversión, bajo el control del promotor fuerte pPOX2 inducido por los sustratos de bioconversión de tipo ácido graso, éster de ácido graso o aceite natural.

Se introdujo el gen *ALK1* que codifica la citocromo P450 monooxigenasa en un vector que contiene el gen de selección URA3, por ejemplo JMP61, bajo el control del promotor pPOX2 inducible mediante ácidos grasos, ésteres de ácido graso o aceites naturales. La casete marcador-promotor-gen (URA3- pPOX2-ALK1) se introduce mediante transformación.

La representación esquemática de la construcción de este mutante se resume en la Tabla 3 a continuación.

ES 2 346 773 T3

TABLA 3

Etapa de transformación requerida para la producción del mutante MTLY79 que sobreexpresa ALK1 y CPR a partir de MTLY74

Etapa	Operación de transformación		
	Mutante a transformar	Transformación con	Mutante transformado
1	MTLY74, Leu+, Ura-, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T, CPR	JMP61-ALK1	MTLY79, Leu+, Ura+, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T, CPR, ALK1

3b. *MTLY80 que expresa la NADPH-citocromo reductasa y la citocromo P450 monooxigenasa ALK2 bajo el control del promotor pPOX2 inducible mediante ácidos grasos, ésteres de ácido graso o aceites naturales*

A partir del mutante MTLY74, se construyó una cepa de *Yarrowia lipolytica* mutante MTLY80 que sobreexpresa los genes que codifican la NADPH-citocromo reductasa (CPR) y la citocromo P450 monooxigenasa (ALK2) en las condiciones de bioconversión, bajo el control del promotor fuerte pPOX2 inducido mediante sustratos de bioconversión de tipo ácido graso, éster de ácido graso o aceite natural.

Se introdujo el gen ALK2 que codifica la citocromo P450 monooxigenasa en un vector que contiene el gen de selección URA3, por ejemplo JMP61, bajo el control del promotor pPOX2 inducible mediante ácidos grasos, ésteres de ácido graso o aceites naturales. La casete marcador-promotor-gen (URA3-pPOX2-ALK2) se introduce mediante transformación.

La representación esquemática de la construcción de este mutante se resume en la Tabla 4 a continuación.

TABLA 4

Etapa de transformación requerida para la producción del mutante MTLY80 que sobreexpresa ALK2 y CPR a partir de MTLY74

Etapa	Operación de transformación		
	Mutante a transformar	Transformación con	Mutante transformado
1	MTLY74, Leu+, Ura-, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T, CPR	JMP61-ALK2	MTLY80, Leu+, Ura+, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T, CPR, ALK2

3c. *MTLY81 que expresa la NADPH-citocromo reductasa sin los genes de la citocromo P450 monooxigenasa (ALK1 o ALK2) bajo el control del promotor pPOX2 inducible mediante ácidos grasos, ésteres de ácido graso o aceites naturales*

A partir del mutante MTLY74, se construyó una cepa de *Yarrowia lipolytica* mutante MTLY81 que sobreexpresa el gen que codifica la NADPH-citocromo reductasa (CPR) bajo el control del promotor fuerte pPOX2 inducido mediante sustratos de bioconversión de tipo ácido graso, éster de ácido graso o aceite natural.

Se hizo al mutante MTLY74 protótrofo mediante transformación con el plásmido JMP61 que lleva el marcador URA3.

ES 2 346 773 T3

La representación esquemática de la construcción de este mutante se resume en la Tabla 5 a continuación.

TABLA 5

Etapa de transformación requerida para la producción del mutante MTLY81 que sobreexpresa CPR a partir de MTLY74

Etapa	Operaciones de transformación		
	Mutante a transformar	Transformación con	Mutante transformado
1	MTLY74, Leu+, Ura-, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T, CPR	JMP61	MTLY81, Leu+, Ura+, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T, CPR

4. Obtención de la cepa mutante FT120

Para obtener esta cepa, puede procederse como para la construcción de la cepa MTLY37 o de la cepa MTLY66:

- 1) se construye una casete de alteración mediante PCR (“Polymerase Chain Reaction”) o mediante clonación, utilizando un marcador contra-seleccionable, por ejemplo el marcador URA3 (con el que se puede seleccionar el fenotipo Ura+ o el fenotipo Ura-), o utilizando un marcador con, a uno y otro lado, una secuencia repetida (que permite la recombinación que se selecciona) o una secuencia lox que es reconocida por la recombinasa Cre;
- 2) se seleccionan las cepas con el gen de interés delecionado (transformación y selección de los transformantes; ventajosamente Ura+ si el marcador es URA3) y se verifica la alteración del gen;
- 3) se seleccionan las cepas con el marcador delecionado (transformación y selección de los transformantes); ventajosamente 5FOA^R si el marcador es URA3 o ventajosamente un plásmido que expresa la recombinasa si el marcador presenta la secuencia lox y se verifica la alteración del gen.

A continuación, se describe un método particular de obtención de la cepa mutante FT120.

A partir del mutante MTLY66, se construyó la cepa FT120 Leu- Ura-, Apox1-6.

- 4a. A partir del mutante MTLY66 Apox2-5, se construyó una cepa de *Yarrowia lipolytica* mutante MTLY95 Apox1-6 mediante inserción de delección de los genes POX1 y POX6 y delección del marcador de acuerdo con el método descrito anteriormente.
- 4b. A partir del mutante MTLY95, se construyó una cepa de *Yarrowia lipolytica* mutante FT101 Leu+ Ura- que sobreexpresa el gen que codifica la NADPH-citocromo reductasa (CPR) en las condiciones de bioconversión, expresándola bajo el control del promotor fuerte pPOX2, inducido mediante los sustratos de bioconversión, de tipo ácido graso, éster de ácido graso o aceite natural.

Se introdujo el gen que codifica la NADPH-citocromo reductasa en un vector que contiene el gen de selección LEU2 escindible, por ejemplo JMP21-LEU2ex, bajo el control del promotor pPOX2 inducible mediante ácidos grasos, ésteres de ácido graso o aceites naturales. La casete marcador-promotor-gen (LEU2ex-pPOX2-CPR) se introduce mediante transformación. La cepa FT120 se obtiene después de la escisión del marcador LEU2ex mediante transformación con el plásmido pUB4-CRE, selección Hyg+, pérdida del plásmido en YPD y finalmente aislamiento de un clón Leu-.

La representación esquemática de la construcción de este mutante se resume en la Tabla 6 a continuación.

ES 2 346 773 T3

TABLA 6

Etapas de transformación requeridas para la producción del mutante T120 a partir de MTLY66

Etapa	Operaciones de transformación		
	Mutante a transformar	Casete de transformación	Mutante transformado
1	MTLY66, Leu-, Ura-, Hyg-, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T	POX1-PHT	MTLY82, Leu-, Ura-, Hyg+, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T, Δ1-PHT
2	MTLY82, Leu-, Ura-, Hyg+, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T, Δ1-PHT	Vector pRRQ2, selección de Leu+, verificación de Hyg-, pérdida del plásmido pRRQ2 en YPD, aislamiento de Leu-	MTLY85, Leu-, Ura-, Hyg-, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T, Δ1-PT
3	MTLY85, Leu-, Ura-, Hyg-, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T, Δ1-PT	POX6-PHT	MTLY92, Leu-, Ura-, Hyg+, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T, Δ1-PT, Δ6-PHT
4	MTLY92, Leu-, Ura-, Hyg+, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T, Δ1-PT, Δ6-PHT	Vector pRRQ2, selección de Leu+, verificación de Hyg-, pérdida del plásmido pRRQ2 en YPD, aislamiento de Leu-	MTLY95, Leu-, Ura-, Hyg-, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T, Δ1-PT, Δ6-PT
5	MTLY95, Leu-, Ura-, Hyg-, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T, Δ1-PT, Δ6-PT	Casete de expresión pPOX2-CPR de JM21-LEU2ex-CPR	FT101, Leu+, Ura-, Hyg-, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T, Δ1-PT, Δ6-PT, CPR-LEU2ex

60

65

ES 2 346 773 T3

5 10	<p>6 FT101, Leu+, Ura-, Hyg-, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T, Δ1-PT, Δ6-PT, CPR-LEU2ex</p>	<p>Vector pUB4-CRE, selección de Hyg+, verificación de Leu-, pérdida del plásmido pUB4-CRE en YPD, aislamiento de Hyg-</p>	<p>FT120, Leu-, Ura-, Hyg-, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T, Δ1-PT, Δ6-PT, CPR</p>
---------	---	--	--

15 5. Obtención de la cepa mutante FT130

Para obtener esta cepa, puede procederse como para la construcción de la cepa FT120:

- 20 1) se construye una casete de alteración mediante PCR (“Polymerase Chain Reaction”) o mediante clonación, utilizando un marcador contra-seleccionable, por ejemplo el marcador URA3 (con el que se puede seleccionar el fenotipo Ura+ o el fenotipo Ura-), o utilizando un marcador con, a uno y otro lado, una secuencia repetida (que permite la recombinación que se selecciona) o una secuencia lox que es reconocida por la recombinasa Cre;
- 25 2) se seleccionan las cepas con el gen de interés delecionado (transformación y selección de los transformantes; ventajosamente Ura+ si el marcador es URA3) y se verifica la alteración del gen;
- 30 3) se seleccionan las cepas con el marcador delecionado (transformación y selección de los transformantes); ventajosamente 5FOA^R si el marcador es URA3 o ventajosamente un plásmido que expresa la recombinasa Cre si el marcador presenta la secuencia lox y se verifica la alteración del gen.

A continuación se describe un método particular de obtención de la cepa mutante FT130.

35 A partir del mutante FT120, se construyó la cepa FT130 Leu- Ura-, Δpox1-6, Δga1.

40 6. A partir del mutante FT120 Leu- Ura-, Δpox1-6, pPOX2-CPR se construyó una cepa de *Yarrowia lipolytica* mutante FT130 Leu- Ura+, Δpox1-6, pPOX2- CPR, Δdga1 mediante inserción de delección del gen DGA1 que codifica acil-CoA diacilglicerol aciltransferasa.

TABLA 7

45 Etapa de transformación requerida para la producción del mutante FT130 a partir de FT120

Etapa	Operaciones de transformación		
	Mutante a transformar	Casette de transformación	Mutante transformado
50 55 60	1 FT120, Leu-, Ura-, Hyg-, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T, Δ1-PT, Δ6-PT, CPR	DGA1-PUT	FT130, Leu-, Ura+, Hyg-, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T, Δ1-PT, Δ6-PT, CPR, Δdga1-PUT

65 Las cepas MTLY66, MTLY81, FT120 y FT 130 se depositaron en la *Collection Nationale de Cultures de Microorganismes* con los respectivos números de registro CNCM I-3319, CNCM I-3320, CNCM I-3527 y CNCM I-3528.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención sin limitar su alcance.

Ejemplos

En estos ejemplos, se ensayó la influencia de las condiciones de cultivo y de la composición del medio sobre la producción de diácidos. De este modo, se constató con el mutante MTLY37 que la utilización de peptona favorecía en gran medida la producción de diácidos, particularmente con respecto a la bacto-triptona (Ejemplos 1 y 2).

También se ensayaron en las mismas condiciones los mutantes MTLY79, MTLY80 y MTLY81. De este modo se constató que la NADPH-citocromo reductasa catalizaba una etapa limitante en la producción de diácidos. En efecto, la sobreexpresión de esta enzima en solitario permite aumentar significativamente la producción y la productividad de los diácidos (Ejemplos 4 a 6).

Se ensayaron en idénticas condiciones las cepas mutantes FT120 y FT130 (ejemplos 7 y 8). La delección de los genes POX1 y POX6 permite disminuir la degradación de los diácidos para FT120. La delección de un gen suplementario DGA1 que codifica acil-CoA diacilglicerol aciltransferasa conlleva una disminución de la acumulación del sustrato de bioconversión en forma de cuerpos lipídicos en el interior de la célula de *Yarrowia lipolytica*. De este modo, la mayoría de los diácidos obtenidos en estos ejemplos está compuesta por diácidos con 18 átomos de carbono a imagen del sustrato de bioconversión utilizado, compuesto es su mayoría por ácidos grasos con 18 átomos de carbonos.

20 Ejemplo 1

Procedimiento de producción de ácidos dicarboxílicos a partir de aceite de girasol oleico con el mutante MTLY37

Un precultivo del mutante MTLY37, conservado en medio de agar de composición: extracto de levadura 10 g.l⁻¹; peptona 10 g.l⁻¹; glucosa 10 g.l⁻¹; Agar 20 g.l⁻¹, se realiza gracias a una siembra que proporciona una absorbancia inicial del medio de precultivo próxima a 0,30. El precultivo se realiza en agitación orbital (200 rpm) durante 24 h a 30°C en un matraz con pestañas de 500 ml que contiene 25 ml de medio (10 g.l⁻¹ de extracto de levadura; 10 g.l⁻¹ de peptona; 20 g.l⁻¹ de glucosa).

El medio utilizado para el cultivo está compuesto por agua desionizada, extracto de levadura a 10 g.l⁻¹; triptona a 20 g.l⁻¹; glucosa a 40 g.l⁻¹; y aceite de girasol oleico a 30 g.l⁻¹.

La siembra del fermentador se realiza con la totalidad del matraz de precultivo.

El cultivo se realiza a 30°C en un fermentador de 4 l con 2 l de medio con un caudal de aireación de 0,5 vvm y una velocidad de agitación de 800 rpm asegurada por una turbina centrífuga con efecto doble.

Después de 17 horas de cultivo, desde que la glucosa del medio se ha agotado, se añaden 60 ml de aceite de girasol oleico, compuesto en su mayoría por ácidos grasos con 18 átomos de carbono, en el reactor que se somete a una alimentación continua de glicerol a razón de 1 ml.h⁻¹. El pH del cultivo se mantiene entonces en el valor constante de 8 mediante adición regulada de sosa 4 M. La fermentación dura 130 h.

Al finalizar el cultivo, se elimina la biomasa celular mediante centrifugado. El sobrenadante se acidifica a continuación hasta pH 2,5 mediante adición de HCl 6 M y los ácidos dicarboxílicos insolubles se recuperan mediante centrifugado del mosto acidificado y después se secan.

La composición de ácidos dicarboxílicos de la mezcla se determina mediante cromatografía en fase gaseosa en una columna DB1 después de la conversión de los ácidos dicarboxílicos en diésteres de acuerdo con el método descrito por Uchio *et al*: Microbial Production of Long-chain Dicarboxylic Acids from n-Alkanes. Part II. Production by *Candida cloacae* Mutant Unable to Assimilate Dicarboxylic Acid. Agr Biol. Chem. 36, No. 3, 1972, 426-433. La temperatura del horno del cromatógrafo se programa de 150°C a 28°C a razón de 8°C por minuto.

Los resultados muestran una producción máxima de diácidos en los sobrenadantes de 5,9 g.l⁻¹ después de 130 h.

55 Ejemplo 2

Se repite el Ejemplo 1 sustituyendo en el medio de cultivo triptona por peptona a la misma concentración. Al cabo de 130 h de cultivo, se obtienen 9,9 g.l⁻¹ de ácidos dicarboxílicos, es decir un aumento de la producción de aproximadamente el 68% con respecto al Ejemplo 1.

ES 2 346 773 T3

Ejemplo 3

Producción de ácidos dicarboxílicos mediante el mutante MTLY37 con alimentación continua de aceite de girasol oleico

5

Se repite el Ejemplo 2 eliminando el aceite de girasol oleico del medio de cultivo y sustituyéndolo por una inyección continua de este mismo aceite a un flujo sub-limitante de 1 ml en el reactor.

10 En estas condiciones, se producen 14,7 g.l⁻¹ de ácidos dicarboxílicos en el medio de cultivo después de 130 h.

Ejemplo 4

15 *Producción de ácidos dicarboxílicos a partir de aceite de girasol oleico con el mutante MTLY79 que sobreexpresa CPR y ALK1*

Se repite el Ejemplo 3 sustituyendo el mutante MTLY37 por el mutante MTLY79 que sobreexpresa los genes *CPR* y *ALK1*. Al cabo de 130 h de cultivo, se obtienen 16 g.l⁻¹ de ácidos dicarboxílicos.

20 Ejemplo 5

25 *Producción de ácidos dicarboxílicos a partir de aceite de girasol oleico con el mutante MTLY80 que sobreexpresa CPR y ALK2*

Se repite el Ejemplo 3 sustituyendo el mutante MTLY37 por el mutante MTLY80 que sobreexpresa los genes *CPR* y *ALK2*. Al cabo de 130 h de cultivo, se obtienen 16 g.l⁻¹ de ácidos dicarboxílicos.

30 Ejemplo 6

Se repite el Ejemplo 3 sustituyendo el mutante MTLY37 por el mutante MTLY81 que sobreexpresa únicamente el gen *CPR*. Al cabo de 130 h de cultivo, se obtienen 16 g.l⁻¹ de ácidos dicarboxílicos.

35 Ejemplo 7

40 *Producción de ácidos dicarboxílicos a partir de aceite de girasol oleico con el mutante FT120 con los seis genes POX (Δ pox1-6) delecionados y que sobreexpresa el gen CPR*

Se repite el Ejemplo 3 sustituyendo el mutante MTLY37 por el mutante FT120 con los seis genes *POX* delecionados y que sobreexpresa el gen *CPR*. Al cabo de 130 h de cultivo, se obtienen 18 g.l⁻¹ de ácidos dicarboxílicos.

45 Ejemplo 8

Producción de ácidos dicarboxílicos a partir de aceite de girasol oleico con el mutante FT130 con los seis genes POX (Δ pox1-6) delecionados y con el gen DGA1 (Δ dga1) delecionado y que sobreexpresa el gen CPR

50 Se repite el Ejemplo 3 sustituyendo el mutante MTLY37 por el mutante FT130 con los seis genes *POX* y el gen *DGA1* delecionados y que sobreexpresa el gen *CPR*. Al cabo de 130 h de cultivo, se obtienen 23 g.l⁻¹ de ácidos dicarboxílicos.

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de producción de ácidos dicarboxílicos, **caracterizado** por que comprende:

- 5 a) una fase de crecimiento, en la que se cultiva una cepa mutante de *Yarrowia lipolytica* que tiene alterados al menos los genes que codifican las isoenzimas de acil-CoA oxidasa *POX2*, *POX3*, *POX4* y *POX5*; en un medio de cultivo constituido esencialmente por un sustrato energético que comprende al menos una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno;
- 10 b) una fase de bioconversión, en la que se somete a dicha cepa a un sustrato de bioconversión seleccionado entre n-alcanos de al menos 10 átomos de carbono, ácidos grasos de al menos 10 átomos de carbono, ésteres de alquilo de 1 a 4 átomos de carbono de estos ácidos grasos, y aceites naturales, en presencia de un sustrato energético; y
- 15 c) una fase de recuperación del ácido dicarboxílico formado.

2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** por que el mutante utilizado es MTLY37, obtenido de la cepa silvestre ATCC 20460, catalogada como CLIB89 en la *Collection de Levures d'intérêt Biotechnologique*, y obtenido mediante las siguientes operaciones de transformación a partir de la cepa Po1d catalogada como CLIB139 en la *Collection de Levures d'intérêt Biotechnologique*,

Etapa	Operaciones de transformación		
	Mutante a transformar	Casete de transformación	Mutante transformado
1	PO1d, Leu-, Ura-	POX5-PUT, correspondiendo el término PUT al módulo promotor-URA3-terminador	MTLY15, Leu-, Ura+, Δ5-PUT
2	MTLY15, Leu-, Ura+, Δ5-PUT	LEU2	MTLY19, Leu+, Ura+, Δ5-PUT
3	MTLY19, Leu+, Ura+, Δ5-PUT	POX5-PT, correspondiendo el término PT al módulo promotor-terminador	MTLY24, Leu+, Ura-, Δ5-PT
4	MTLY24, Leu+, Ura-, Δ5-PT	POX2-PUT	MTLY29, Leu+, Ura+, Δ5-PT, Δ2-PUT
5	MTLY29, Leu+, Ura+, Δ5-PT, Δ2-PUT	POX2-PT	MTLY32, Leu+, Ura-, Δ5-PT, Δ2-PT
6	MTLY32, Leu+, Ura-, Δ5-PT, Δ2-PT	POX3-PUT	MTLY35, Leu+, Ura+, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PUT
7	MTLY35, Leu+, Ura+, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PUT	POX3-PT	MTLY36, Leu+, Ura-, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT
8	MTLY36, Leu+, Ura-, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT	MTLY18 con POX4 deletionado (Δ4-PUT)	MTLY37, Leu+, Ura+, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-PUT

ES 2 346 773 T3

3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** por que el mutante utilizado es MTLY79, obtenido de la cepa silvestre ATCC 20460, catalogada como CLIB89 en la *Collection de Levures d'intérêt Biotechnologique*, que sobreexpresa los genes CPR y *ALK1* que codifican respectivamente la NADPH-citocromo reductasa y la citocromo P450 monooxigenasa, y obtenido mediante las siguientes operaciones de transformación a partir del mutante MTLY74, obtenido a su vez a partir del mutante MTLY37 tal como se describe en la reivindicación 2 de acuerdo con las siguientes operaciones de transformación:

Etapa	Operaciones de transformación		
	Mutante a transformar	Transformación con	Mutante transformado
1	MTLY37, Leu+, Ura+, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-PUR	Fragmento de PCR ura3-41, selección de 5FOA	MTLY40, Leu+, Ura-, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T
2	MTLY40, Leu+, Ura-, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T	Casete PHTleu2, selección de higromicina	MTLY64, Leu-, Ura-, Hyg+, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T, Leu2::Hyg
3	MTLY64, Leu-, Ura-, Hyg+, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T, Leu2::Hyg	Vector pRRQ2, selección de Leu+, verificación de Hyg-, pérdida del plásmido pRRQ2 en YPD, aislamiento de Leu-	MTLY66, Leu-, Ura-, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T, ΔLeu2
4	MTLY66, Leu-, Ura-, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T, ΔLeu2	Casete de expresión pPOX2-CPR de JM21-CPR	MTLY74, Leu+, Ura-, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T, CPR

Etapa	Operación de transformación		
	Mutante a transformar	Transformación con	Mutante transformado
1	MTLY74, Leu+, Ura-, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T, CPR	JMP61-ALK1	MTLY79, Leu+, Ura+, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T, CPR, ALK1

4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** por que el mutante utilizado es MTLY80, obtenido de la cepa silvestre ATCC 20460, catalogada como CLIB89 en la *Collection de Levures d'intérêt Biotechnologique*, que sobreexpresa los genes *CPR* y *ALK2* que codifican respectivamente la NADPH-citocromo reductasa y la citocromo P450 monooxigenasa, y obtenido mediante las siguientes operaciones de transformación a partir del 5 mutante MTLY74, tal como se describe en la reivindicación 3

Etapa	Operación de transformación		
	Mutante a transformar	Transformación con	Mutante transformado
1	MTLY74, Leu+, Ura-, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T, CPR	JMP61-ALK2	MTLY80, Leu+, Ura+, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T, CPR, ALK2

5. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** por que el mutante utilizado es MTLY81, obtenido de la cepa silvestre ATCC 20460, catalogada como CLIB89 en la *Collection de Levures d'intérêt Biotechnologique*, que sobreexpresa el gen *CPR* que codifica la NADPH-citocromo reductasa, y obtenido mediante las siguientes 25 operaciones de transformación a partir del mutante MTLY74, tal como se describe en la reivindicación 3

Etapa	Operaciones de transformación		
	Mutante a transformar	Transformación con	Mutante transformado
1	MTLY74, Leu+, Ura-, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T, CPR	JMP61	MTLY81, Leu+, Ura+, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T, CPR

45 6. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** por que el mutante utilizado es FT120, obtenido de la cepa silvestre ATCC 20460, catalogada como CLIB89 en la *Collection de Levures d'intérêt Biotechnologique*, que sobreexpresa el gen *CPR* que codifica la NADPH-citocromo reductasa, y obtenido mediante las siguientes operaciones de transformación a partir del mutante MTLY66, tal como se describe en la reivindicación 3

Etapa	Operaciones de transformación		
	Mutante a transformar	Casete de transformación	Mutante transformado
1	MTLY66, Leu-, Ura-, Hyg-, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T	POX1-PHT	MTLY82, Leu-, Ura-, Hyg+, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T, Δ1-PHT

ES 2 346 773 T3

5	2	MTLY82, Leu-, Ura-, Hyg+, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T, Δ1-PHT	Vector pRRQ2, selección de Leu+, verificación de Hyg-, pérdida del plásmido pRRQ2 en YPD, aislamiento de Leu-
10	3	MTLY85, Leu-, Ura-, Hyg-, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T, Δ1-PT	POX6-PHT
15	4	MTLY92, Leu-, Ura-, Hyg+, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T, Δ1-PT, Δ6-PHT	Vector pRRQ2, selección de Leu+, verificación de Hyg-, pérdida del plásmido pRRQ2 en YPD, aislamiento de Leu-
20	5	MTLY95, Leu-, Ura-, Hyg-, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T, Δ1-PT, Δ6-PT	Casete de expresión pPOX2-CPR de JM21-LEU2ex-CPR
25	6	FT101, Leu+, Ura-, Hyg-, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T, Δ1-PT, Δ6-PT, CPR-LEU2ex	Vector pUB4-CRE, selección de Hyg+, verificación de Leu-, pérdida del plásmido pUB4-CRE en YPD, aislamiento de Hyg-
30			
35			
40			
45			
50			

55

60

65

ES 2 346 773 T3

7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado** por que el mutante utilizado es FT130, obtenido de la cepa silvestre ATCC 20460, catalogada como CLIB89 en la *Collection de Levures d'intérêt Biotechnologique*, que sobreexpresa el gen CPR que codifica la NADPH-citocromo reductasa, y obtenido mediante las siguientes operaciones de transformación a partir del mutante FT120, tal como se describe en la reivindicación 6

5

Etapa	Operaciones de transformación				
	Mutante a transformar	Casete de transformación	Mutante transformado		
10	15	20	FT120, Leu-, Ura-, Hyg-, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T, Δ1-PT, Δ6-PT, CPR	DGA1-PUT	FT130, Leu-, Ura+, Hyg-, Δ5-PT, Δ2-PT, Δ3-PT, Δ4-Pura3-41T, Δ1-PT, Δ6-PT, CPR, Δgda1-PUT

8. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** por que dicho sustrato de bioconversión está constituido por una mezcla de ésteres metílicos o una mezcla de ésteres etílicos.

25

9. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizado** por que dicho sustrato de bioconversión está constituido por un aceite de girasol oleico.

30

10. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** por que, en la fase de bioconversión, el medio de cultivo comprende peptona.

11. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado** por que, en la fase de bioconversión, el medio de cultivo comprende un aporte de sustrato energético secundario que está constituido por al menos un compuesto polihidroxilado.

35

12. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, **caracterizado** por que dicho compuesto polihidroxilado es glicerol o un azúcar.

40

13. Procedimiento de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado** por que, en la fase (c), el ácido dicarboxílico se recupera mediante precipitación en forma de sal de calcio.

14. Cepa de *Yarrowia lipolytica* mutante MTLY66 depositada en la *Collection Nationale de Cultures de Microorganismes* con el número de registro CNCM 1-3319.

45

15. Cepa de *Yarrowia lipolytica* mutante MTLY81 depositada en la *Collection Nationale de Cultures de Microorganismes* con el número de registro CNCM 1-3320.

16. Cepa de *Yarrowia lipolytica* mutante FT120 depositada en la *Collection Nationale de Cultures de Microorganismes* con el número de registro CNCM 1-3527.

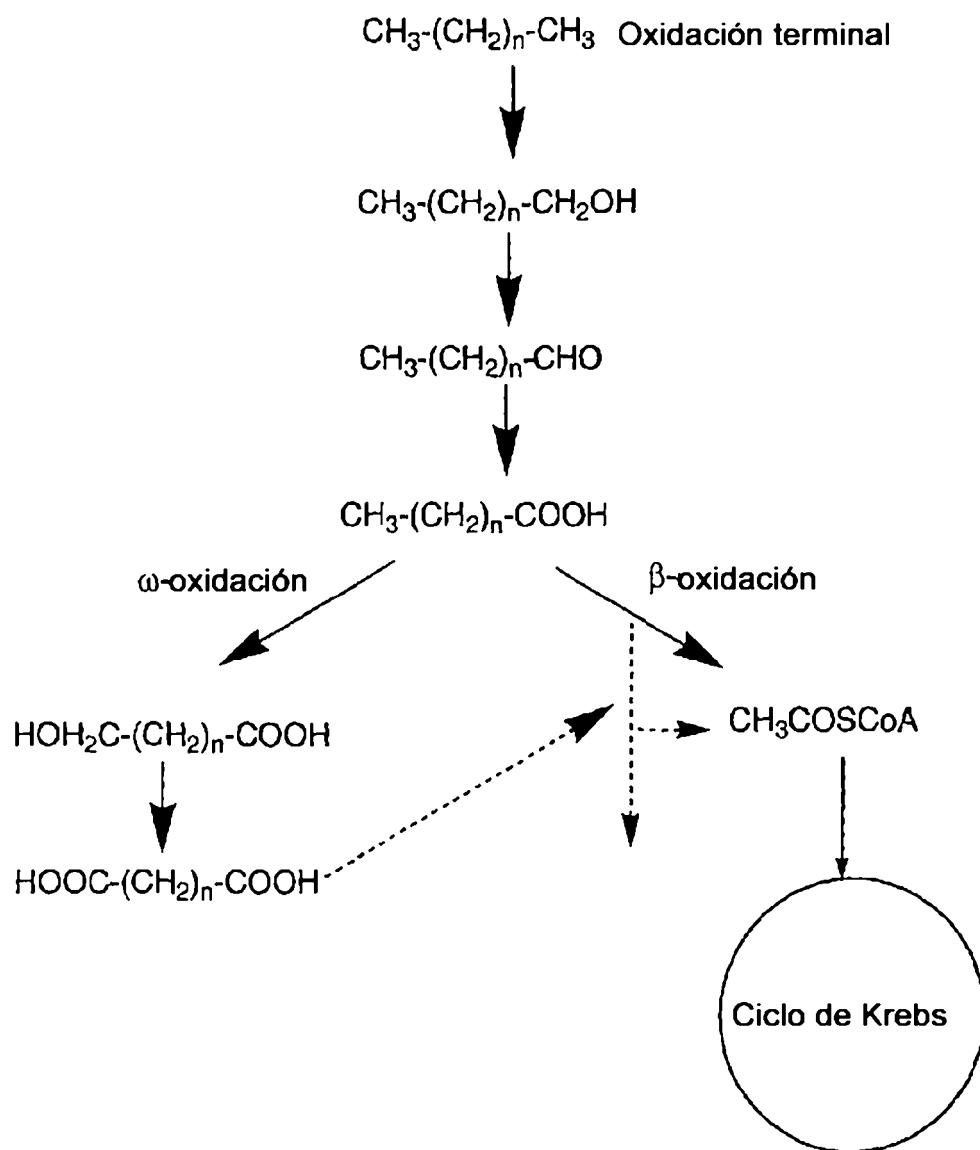
50

17. Cepa de *Yarrowia lipolytica* mutante FT130 depositada en la *Collection Nationale de Cultures de Microorganismes* con el número de registro CNCM 1-3528.

55

60

65

**FIG. 1**