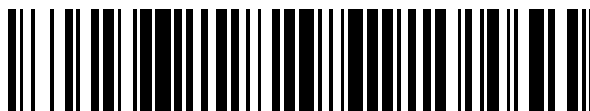


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 744 868**

51 Int. Cl.:

**C12P 7/64**

(2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.04.2013** **PCT/US2013/037261**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.10.2013** **WO13158938**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2013** **E 13778920 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2019** **EP 2839018**

54 Título: **Aceites hechos a medida**

30 Prioridad:

**18.04.2012 US 201261635285 P**  
**27.04.2012 US 201261639838 P**  
**04.06.2012 US 201261655469 P**  
**16.07.2012 US 201261672196 P**  
**02.08.2012 US 201261679026 P**  
**19.10.2012 US 201261715998 P**  
**26.02.2013 US 201361769678 P**  
**13.03.2013 US 201361778963 P**  
**05.04.2013 US 201361809213 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**26.02.2020**

73 Titular/es:

**CORBION BIOTECH, INC. (100.0%)**  
**One Tower Place, 600**  
**South San Francisco, CA 94080, US**

72 Inventor/es:

**FRANKLIN, SCOTT;**  
**SOMANCHI, ARAVIND;**  
**RUDENKO, GEORGE;**  
**BHAT, RIYAZ;**  
**ZHAO, XINHUA;**  
**BOND, RISHA;**  
**RAKITSKY, WALTER;**  
**MARANGONI, ALEJANDRO y**  
**BRAKSMAYER, DIZA**

74 Agente/Representante:

**IZQUIERDO BLANCO, María Alicia**

ES 2 744 868 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Aceites hechos a medida

**5 REFERENCIA A UNA LISTA DE SECUENCIAS**

**[0001]** Esta aplicación incluye una lista de secuencias como se muestra al final de la descripción detallada.

**CAMPO DE LA INVENCION**

**[0002]** Los ejemplos de la presente descripción se refieren a aceites/grasas, combustibles, alimentos y oleoquímicos y su producción a partir de cultivos de células genéticamente modificadas. Los ejemplos específicos se refieren a aceites con un alto contenido de triglicéridos que llevan grupos acilo grasos sobre el esqueleto de glicerol en patrones particularmente específicos, aceites altamente estables, aceites con altos niveles de ácidos grasos oleicos o de cadena media y productos producidos a partir de dichos aceites.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION.**

**[0003]** Las publicaciones PCT WO2008/151149, WO2010/06032, WO2011/150410, WO2011/150411, WO2012/061647 y WO2012/106560 describen aceites y métodos para producir esos aceites en microbios, incluidas las microalgas. Estas publicaciones también describen el uso de tales aceites para fabricar oleoquímicos y combustibles. El documento US 2006/094090 describe la expresión exógena de la aciltransferasa de ácido lisofosfatídico (LPAAT) en microorganismos oleaginosos, incluidas las algas. El LPAAT exógeno da como resultado triglicéridos enriquecidos en FA poliinsaturada, es decir, enriquece los triglicéridos de tipo saturado-insaturado-saturado.

**[0004]** El revenido es un proceso de convertir una grasa en una forma polimórfica deseada mediante la manipulación de la temperatura de la grasa o sustancia que contiene grasa, comúnmente utilizada en la fabricación de chocolate.

**[0005]** Ciertas enzimas de la ruta de elongación de acil-CoA graso funcionan para extender la longitud de las moléculas de acil-CoA graso. Las enzimas del complejo de elongasa extienden moléculas de acil-CoA graso en 2 adiciones de carbono, por ejemplo, miristoil-CoA a palmitoil-CoA, estearoil-CoA a araquidil-CoA u oleil-CoA a eicosanoil-CoA, eicosanoil-CoA a erucil-CoA. Además, las enzimas elongasa también extienden la longitud de la cadena de acilo en incrementos de 2 carbonos. Las enzimas KCS condensan las moléculas de acil-CoA con dos carbonos de malonil-CoA para formar beta-cetoacil-CoA. KCS y elongasas pueden mostrar especificidad para condensar sustratos de acilo de longitud de carbono particular, modificación (tal como hidroxilación) o grado de saturación. Por ejemplo, se ha demostrado que la beta-cetoacil-CoA sintasa de jojoba (*Simmondsia chinensis*) prefiere sustratos monoinsaturados y saturados de C18 y C20-CoA para elevar la producción de ácido erúico en plantas transgénicas (Lassner et al., Plant Cell, 1996, Vol 8 (2), pp 281-292), mientras que las enzimas elongasa específicas de *Trypanosoma brucei* muestran preferencia por el alargamiento de sustratos CoA saturados de cadena corta y media (Lee et al., Cell, 2006, Vol 126 (4), pp 691-9).

**[0006]** La ruta biosintética de ácidos grasos tipo II emplea una serie de reacciones catalizadas por proteínas solubles con intermediarios transportados entre enzimas como tioésteres de la proteína portadora de acilo (ACP). Por el contrario, la vía biosintética de ácidos grasos tipo I utiliza un único polipéptido multifuncional grande.

**[0007]** La alga oleaginosa, no fotosintética, *Proteotheca moriformis*, almacena cantidades copiosas de aceite de triacilglicérido en condiciones en que el suministro de carbono nutricional es excesivo, pero la división celular se inhibe debido a la limitación de otros nutrientes esenciales. La biosíntesis a granel de ácidos grasos con longitudes de cadena de carbono hasta C18 ocurre en los plástidos; los ácidos grasos se exportan al retículo endoplásmico donde (si ocurre) se alarga el C18 y se incorpora a los triacilglicéridos (TAG). Los lípidos se almacenan en grandes orgánulos citoplasmáticos llamados cuerpos lipídicos hasta que las condiciones ambientales cambian para favorecer el crecimiento, con lo cual se movilizan para proporcionar energía y moléculas de carbono para el metabolismo anabólico.

**55 RESUMEN DE LA INVENCION**

**[0008]** En un aspecto, la presente invención proporciona una célula microalgal oleaginosa del género *Prototheca*, que comprende opcionalmente 23S ARNr que tiene al menos un 65% de identidad de secuencia de nucleótidos con la SEQ ID NO: 76, opcionalmente heterótrofo obligatoriamente, y opcionalmente comprende un gen exógeno de la sacarosa invertasa para que la célula pueda crecer en sacarosa como única fuente de carbono, en donde la célula comprende un gen exógeno que codifica una enzima LPAAT activa, y la célula produce un aceite que comprende triglicéridos, en donde el aceite es, en virtud de la actividad de LPAAT: (a) enriquecida en triglicéridos con ácidos grasos de cadena media; o (b) enriquecida en triglicéridos del tipo saturado-insaturado-saturado. En algunos casos, los triglicéridos del aceite comprenden 40, 50, 60, 70 u 80% o más de ácidos grasos C8: 0, C10: 0, C12: 0, C14: 0 o C16: 0. En algunos casos, la célula comprende además un gen exógeno que codifica una tioesterasa acil-ACP FATB activa.

**[0009]** En algunos casos, los triglicéridos del aceite se enriquecen en ácidos grasos de cadena media en más del 70% como resultado de la expresión de la LPAAT exógena y la tioesterasa acil-ACP. En algunos casos, la célula comprende además ácidos nucleicos recombinantes operables para codificar una enzima KAS I o KAS IV exógena para reducir la actividad de una enzima KAS I endógena. En algunos casos, la célula comprende además ácidos nucleicos operables para reducir la expresión de una desaturasa de ácido graso delta 12, opcionalmente a través de un promotor regulable, para producir un aceite con ácidos linoleico y linolénico con un total de 5 por ciento de área o menos por FAME GC/FID. En algunos casos, el aceite está enriquecido en triglicéridos del tipo saturado-insaturado-saturado. En algunos casos, el aceite está enriquecido en SOS, POS y/o POP. En algunos casos, el aceite comprende triglicéridos que comprenden al menos un 50% de SOS y, opcionalmente, menos del 10% de SSS.

**[0010]** En algunos casos, la célula comprende además una desactivación o desactivación de un gen desaturasa de estearoil-ACP, gen FatA, o ambos. En algunos casos, la célula comprende además ácidos nucleicos recombinantes operables para aumentar la actividad beta-cetoacil CoA sintasa. En algunos casos, los ácidos nucleicos operables para aumentar la actividad beta-cetocil sintasa comprenden un gen exógeno que codifica una beta-cetoacil CoA sintasa.

**[0011]** En algunos casos, la relación de estearato a oleato en aceite es  $3: 1 \pm 20\%$ . En algunos casos, POP, SOS y POS en el aceite comprenden al menos 30% en suma. En algunos casos, el aceite comprende al menos 30% POS. En algunos casos, el aceite comprende POP al  $16\% \pm 20\%$ , POS al  $38\% \pm 20\%$  y SOS al  $23\% \pm 20\%$ . En algunos casos, el perfil de ácido graso del aceite comprende 1 a 4% de ácido araquídico.

**[0012]** En algunos casos, la célula comprende además ácidos nucleicos operables para reducir la expresión de una desaturasa de ácido graso delta 12, opcionalmente a través de un promotor regulable, para producir un aceite con ácidos linoleico y linolénico totalizando un 5 por ciento de área o menos. En algunos casos, el aceite tiene más del 65% de SOS, menos del 45% de ácido graso insaturado, menos del 5% de ácidos grasos poliinsaturados, menos del 1% de ácido láurico y menos del 2% de ácidos grasos trans. En algunos casos, el LPAAT tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78 o SEQ ID NO: 79 o una secuencia que tiene al menos un 95% de identidad con SEQ ID NO: 78 o SEQ ID NO: 79.

**[0014]** En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para producir un aceite que comprende proporcionar o cultivar una célula como se discutió anteriormente, y extraer el aceite, en el que la célula se cultiva opcionalmente heterotróficamente.

**[0015]** En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un aceite que comprende triglicéridos producidos por el método discutido anteriormente. En algunos casos, el aceite comprende uno o más de: al menos 10% de ergosterol; ergosterol y b-sitosterol, en donde la proporción de ergosterol a b-sitosterol es mayor que 25: 1; ergosterol y brassicasterol; ergosterol, brassicasterol y poriferasterol, y el aceite está opcionalmente libre de uno o más de  $\beta$ -sitosterol, campesterol, y estigmasterol.

**[0016]** En algunos casos, el aceite forma cristales de  $\beta$ -polimorfo. En algunos casos, los cristales tienen una estructura de láminas de 2L. En algunos casos, los cristales tienen una estructura laminar de 3L.

**[0017]** En algunos casos, las formas de petróleo cristales  $\beta$ -polimorfo. En algunos casos, los cristales tienen una estructura de laminillas 2L. En algunos casos, los cristales tienen una estructura de laminillas 3L.

**[0018]** En algunos casos, en los que los triglicéridos del aceite tienen un perfil de ácidos grasos caracterizado porque la suma del porcentaje de estearato y palmitato es igual al porcentaje de oleato multiplicado por  $2,0 \pm 40\%$ . En algunos casos, el aceite tiene mayor que 65% de triglicéridos SOS, ácido graso insaturado de menos de 45%, ácidos grasos insaturados menos de 5%, ácido láurico menos de 1%, y de ácidos grasos trans de menos de 2%. En algunos casos, la suma del estearato y palmitato ciento en el perfil de ácidos grasos del aceite es dos veces el porcentaje de oleato,  $\pm 20\%$ . En algunos casos, el perfil de sn-2 del aceite tiene por lo menos 40% de oleato. En algunos casos, el aceite es al menos 40, 50, 60, 70, 80, o 90% de SOS.

**[0019]** En algunos casos, el aceite es un plato de acortamiento que tiene una temperatura de fusión de entre  $30^{\circ}\text{C}$  y  $40^{\circ}\text{C}$ . En algunos casos, el aceite comprende cristales  $\beta'$  polimórficos. En algunos casos, el aceite tiene un contenido de grasa sólida de menos de  $15^{\circ}\text{C}$  a  $35^{\circ}\text{C}$ . En algunos casos, el aceite comprende 15 a 20% de C8 a C14 de ácidos grasos, ácidos grasos de 45-50% de C16 y superior, y/o ácidos grasos insaturados de 30-25%.

**[0020]** En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un producto alimenticio, de combustible o químico producido utilizando el aceite que se mencionó anteriormente.

**[0021]** En otro ejemplo, la presente divulgación proporciona un aceite natural o aceite RBD producido a partir de un aceite natural, en la que el aceite comprende ácidos grasos 3,5% o menos saturados y, opcionalmente, comprende más de 50% de ácido oleico y/o mayor que 1% palmitoleico ácido. En algunos casos, el aceite tiene entre 0,1 y 3,5 ácidos grasos saturados%. En algunos casos, el aceite comprende ácido oleico de al menos 90%. En algunos casos,

el aceite comprende ácidos grasos poliinsaturados de al menos 3%.

**[0022]** En otro ejemplo, la presente descripción proporciona una célula oleaginosa, que comprende opcionalmente 23S ARNr que tienen al menos 65% de identidad de secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 76 y opcionalmente heterótrofa, en el que la célula produce un aceite que comprende 3,5% o menos ácidos grasos saturados.

**[0023]** En algunos casos, la célula es una célula de microalgas, opcionalmente del género *Prototheca*. En algunos casos, la célula comprende además un knockout o knockdown FATA. En algunos casos, la célula comprende un gen exógeno que codifica una enzima activa para desaturar palmitoil-CoA a plamitoil-CoA. En algunos casos, el gen exógeno es un gen PAD. En algunos casos, el gen exógeno es un gen SAD que tiene actividad de desaturasa hacia palmitoil-ACP. En algunos casos, la célula comprende además una enzima KAS II sobreexpresado.

**[0024]** En algunos casos, la célula comprende además ácidos nucleicos que pueden funcionar para reducir la expresión de una desaturasa de ácido graso delta 12, opcionalmente a través de un promotor regulable, a fin de producir un aceite con ácidos linoleico y linolénico por un total de 5 por ciento de área o menos.

**[0025]** En otro ejemplo, la presente divulgación proporciona un aceite producido por las células discutidos anteriormente, opcionalmente refinado, blanqueado y desodorizado, en el que el aceite de distribución comprende uno o más de: al menos 10% ergosterol; ergosterol y bsitosterol, donde la relación de ergosterol a bsitosterol es mayor que 25: 1; ergosterol y brasicasterol; y ergosterol, brasicasterol, y poriferasterol, y en el que el aceite es opcionalmente libre de uno o más de  $\beta$ -sitosterol, campesterol y estigmasterol.

**[0026]** En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un método para producir un aceite que tiene 3,5% o menos ácidos grasos saturados, en el que el método comprende proporcionar o cultivo de una célula como se discutió anteriormente o en el presente documento, y extraer el aceite de la célula.

**[0027]** En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un método para producir un alimento, en el que el método comprende la incorporación de un aceite producido por los métodos discutidos anteriormente en el presente documento o en la comida, en el que el producto alimenticio acabado tiene 3,5% o menos de grasa saturada.

**[0028]** En otro aspecto, la presente descripción proporciona una célula oleaginosa recombinante, que comprende opcionalmente 23S ARNr que tienen al menos 65% de identidad de secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 76 y opcionalmente obligatoriamente heterótrofa, en el que la célula comprende un gen exógeno que codifica una enzima de sintasa cetooxil-CoA activa.

**[0029]** En algunos casos, la célula produce un aceite que comprende ácido erúico mayor que 20%. En algunos casos, la célula produce un aceite que comprende ácido erúico mayor que 60%. En algunos casos, la célula comprende aceite de al menos 40%. En algunos casos, la célula es del género *Prototheca*, y, opcionalmente, de las especies *Prototheca moriformis*. En algunos casos, el aceite producido por la célula comprende uno o más de: al menos 10% ergosterol; ergosterol y b-sitosterol, en donde la relación de ergosterol a b-sitosterol es mayor que 25: 1; ergosterol y brasicasterol; y ergosterol, brasicasterol, y poriferasterol, en el que el aceite es opcionalmente libre de uno o más de  $\beta$ -sitosterol, campesterol, estigmasterol y.

**[0030]** En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un producto químico producido a partir del aceite que se discutió anteriormente.

**[0031]** En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un método para producir un aceite, en el que el método comprende proporcionar o cultivo de una célula como se discutió anteriormente, y la extracción de un aceite a partir de la célula.

**[0032]** En otro ejemplo, la presente descripción proporciona una célula oleaginosa recombinante que comprende ácidos nucleicos recombinantes que pueden funcionar para suprimir la actividad de un ácido graso delta 12 producto del gen desaturasa de ácido de modo que la célula produce un aceite con un perfil de triacilglicerol que tiene ácido linoleico menos del 5%. En algunos casos, la célula produce un aceite con un perfil de triacilglicerol que tiene ácido linoleico menos del 3%. En algunos casos, la célula produce un aceite con un perfil de triacilglicerol que tiene ácido linoleico menos del 2%.

**[0033]** En algunos casos, la célula es un auxótrofo de ácido linoleico o actividad de la desaturasa de ácido graso delta 12 puede ser suprimida a través de las condiciones ambientales a fin de producir el aceite. En algunos casos, la desaturasa de ácido graso delta 12 es regulable a través de las condiciones ambientales debido a un promotor regulable en unión operativa con el gen de desaturasa de ácidos grasos delta 12. En algunos casos, el promotor regulable es regulable por el cambio en los niveles de pH de medios o de nitrógeno.

**[0034]** En algunos casos, la célula comprende además ácidos nucleicos recombinantes que pueden funcionar para expresar una enzima KAS II, LPAAT, o CNDC exógeno. En algunos casos, la célula comprende además ácidos nucleicos recombinantes que pueden funcionar para knockout o knockdown de la expresión de una enzima desaturasa



ACP estearoil. En algunos casos, la célula comprende además ácidos nucleicos recombinantes operable para knockout o knockdown la expresión de una tioesterasa acil-ACP endógeno codificado-FatA.

**[0035]** En algunos casos, el aceite es estable a 110°C de modo que el punto de inflexión en la conductancia aún no se alcanza por 20 horas bajo condiciones de la prueba de AOCS Cd 12b-92 Rancimat. En algunos casos, el aceite es estable a 110°C de modo que el punto de inflexión en la conductancia aún no se alcanza por 5 días en condiciones de la prueba de AOCS Cd 12b-92 Rancimat, cuando se añaden 1050ppm de tocoferol y 500 pm de palmitato de ascorbilo al aceite.

**[0036]** En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un método que comprende: (a) proporcionar una célula oleaginosa recombinante, que comprende opcionalmente 23S ARNr que tiene al menos 65% de identidad de secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 76, opcionalmente obligatoriamente heterótrofa, en el que la célula comprende nucleico recombinante ácidos operables para modificar la cantidad de un ácido graso hecho por la célula en respuesta a un cambio en una condición ambiental; (B) cultivar la célula bajo una primera condición ambiental que es permisiva para la síntesis del ácido graso con el fin de permitir la división celular y aumentar el número de células; (c) cultivar la célula bajo una segunda condición ambiental que, debido a los ácidos nucleicos recombinantes, reduce la síntesis del ácido graso y por lo tanto la cantidad de que el ácido graso en un aceite producido por la célula; y (d) extraer el aceite de la célula.

**[0037]** En algunos casos, la célula comprende ácidos nucleicos exógenos que pueden funcionar para reducir la actividad de una desaturasa de ácido graso delta 12 a fin de reducir la cantidad de ácido linoleico en el aceite. En algunos casos, el ácido linoleico se agota en el aceite por al menos de 50, 60, 70, 80, o 90%.

**[0038]** En algunos casos, la célula se cultiva de manera heterótrofa. En algunos casos, la célula es una célula de microalgas. En algunos casos, la célula produce por lo menos 40, 50, 60, 70, 80, o 90% de aceite por peso de células secas.

**[0039]** En algunos casos, la primera condición ambiental es un primer pH y la segunda condición ambiental es un segundo pH de los medios de cultivo.

**[0040]** En algunos casos, el aceite, cuando se extrae de la célula, es estable a 110°C de modo que el punto de inflexión en la conductancia aún no se alcanza por 20 horas bajo condiciones de la prueba de AOCS Cd 12b-92 Rancimat. En algunos casos, el aceite, cuando se extrae de la célula, es estable a 110°C de modo que el punto de inflexión en la conductancia aún no se alcanza por 5 días en condiciones de la prueba de AOCS Cd 12b-92 Rancimat, cuando 1050ppm de tocoferol y 500 pm de palmitato de ascorbilo se añaden al aceite.

**[0041]** En algunos casos, la célula comprende un gen exógeno que codifica una enzima KAS II y opcionalmente un knockout o knockdown de un gen FatA. En algunos casos, los ácidos nucleicos recombinantes que pueden funcionar para modificar la cantidad de un ácido graso hecho por la célula comprenden un ARN inhibidor dirigidas a un gen de la FAD, la producción del ARN inhibidor estar bajo el control de un promotor regulable.

**[0042]** En algunos casos, el aceite se caracteriza por un perfil de ácidos grasos con ácido oleico mayor que 60% y menos del 3% poliinsaturados. En algunos casos, el aceite se caracteriza por un perfil de ácidos grasos con ácido oleico mayor que 70% y menos del 2% poliinsaturados. En algunos casos, el aceite se caracteriza por un perfil de ácidos grasos con ácido oleico mayor que 80% y menos del 1% de ácidos grasos poliinsaturados.

**[0043]** En otro ejemplo, la presente divulgación proporciona un aceite producido por el método discutido anteriormente. En algunos casos, el aceite comprende ácido linoleico 0,01 a 2% y (i) 80 a 95% de ácido oleico o (ii) más del 40% de C8, C10, C12, C14 o ácidos grasos C16. En algunos casos, el aceite comprende además uno o más de: al menos 10% ergosterol; ergosterol y  $\beta$ -sitosterol, donde la relación de ergosterol a  $\beta$ -sitosterol es mayor que 25: 1; ergosterol y brasicasterol; y ergosterol, brasicasterol y poriferasterol.

**[0044]** En otro ejemplo, la presente descripción proporciona un producto producido por el aceite que se discutió anteriormente. En algunos casos, el producto es un alimento, combustible o productos químicos. En algunos casos, el producto es un aceite para freír, aceite lubricante, disolvente de limpieza, agente tensioactivo, espuma o lubricante. En algunos casos, el producto es un dímero de ácido oleico.

**[0045]** En otro aspecto, la presente invención proporciona una célula constructo, vector, cromosoma o huésped que comprende ácidos nucleicos que codifican una proteína que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 77 a 79. En algunos casos, los ácidos nucleicos codifican una proteína que tiene al menos 95% de identidad con SEQ ID NO: 77 a 79. En algunos casos, los ácidos nucleicos codifican una proteína que tiene al menos 98% de identidad con SEQ ID NO: 77 a 79. En algunos casos, los ácidos nucleicos tienen al menos 80, 90, 95, 96, 97, 98, o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 80-85 o equivalentes secuencias, en virtud de la degeneración del código genético.

**[0046]** Se describen y/o ejemplifican estos y otros aspectos y realizaciones de la invención en los dibujos adjuntos, una breve descripción de los cuales sigue inmediatamente, la descripción detallada de la invención, y en los ejemplos.

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS****[0047]**

Figuras 1-14 muestran perfiles de ácidos grasos y las curvas de fusión de aceites refinados, blanqueados y desodorizados cepas de *Prototheca moriformis* de ingeniería genética, como se describe en el Ejemplo 4; Figura 15 muestra la estabilidad de diferentes aceites como una función de la concentración de antioxidante, como se describe en el Ejemplo 5;

Figura 16 muestra diversas propiedades de los aceites naturales con niveles muy bajos de ácidos grasos poliinsaturados de acuerdo con una realización de la invención; y

Figura 17 muestra un gráfico de por ciento de contenido de grasa sólida para varios aceites como sigue: (a) aceite RBD P. moriformis sin ingeniería por vía de lípidos; (b) la manteca de cacao del Brasil + 25% de grasa de leche; (c) tres réplicas de aceite RBD P. moriformis a partir de una cepa que expresa los ácidos nucleicos de horquilla que reducen los niveles de un alelo SAD reduciendo así el ácido oleico y el incremento de ácido esteárico en el perfil de TAG; (d) aceite RBD P. moriformis a partir de una cepa que sobreexpresa una OTE endógena (oleoil tioesterasa acil-ACP, véase el Ejemplo 45); (e) manteca de cacao de Malasia + 25% de grasa de leche; y (f) manteca de cacao de Malasia. Los valores de la manteca de cacao y manteca de cacao de grasa de leche son valores de la literatura (Bailey's Industrial Oils and Fat Products, 6ª ed.).

La Figura 18 muestra los resultados de las pruebas de estabilidad térmica realizadas en aceite metilado preparado a partir de aceites de triglicéridos altos oleicos (HO) y altos oleicos de alta estabilidad (HSAo) preparados a partir de microalgas oleaginosas cultivadas heterotróficamente, en comparación con una muestra de control éster de soja metilo.

La Figura 19 muestra diversas propiedades de los aceites de algas altas oleicas y altas oleicas de alta estabilidad.

La Figura 20 muestra la composición TAG de aceites S4495, S5665 y S5675 de matraz y biomasa fermentadora. La = laurato (C12: 0), M = miristato (C14: 0), P = palmitato (C16: 0), Po = palmitoleato (C16: 1), S = estearato de (C18: 0), O = oleato (C18 : 1), L = linoleato (C18: 2), Ln = $\alpha$ -linolenato (C18: 3), A = araquidato (C20: 0), B = behenato (C22: 0), Lg = lignocerato (C24: 0), Hx = hexacosanoato (C26: 0) SSS se refiere a la suma de TAG en la que se saturan los tres ácidos grasos. En cada bloque de barras, las cepas se muestran en el orden ilustrado en la parte inferior de la figura.

La Figura 21 muestra la composición TAG de aceites S5774, S5775 y S5776 de la biomasa matraz de agitación. La = laurato (C12: 0), M = miristato (C14: 0), P = palmitato (C16: 0), Po = palmitoleato (C16: 1), S = estearato de (C18: 0), O = oleato (C18 : 1), L = linoleato (C18: 2), Ln = $\alpha$ -linolenato (C18: 3), A = araquidato (C20: 0), B = behenato (C22: 0), Lg = lignocerato (C24: 0), Hx = hexacosanoato (C26: 0). SSS se refiere a la suma de TAG en la que se saturan los tres ácidos grasos. En cada bloque de barras, las cepas se muestran en el orden ilustrado en la parte inferior de la figura.

La Figura 22 muestra el perfil de ácidos grasos y el contenido de grasa sólida de un miristato de aceite rico refinado, blanqueado y desodorizado de una cepa *Prototheca moriformis* de ingeniería genética como se describe en el Ejemplo 52.

La Figura 23 muestra el alineamiento por pares de las proteínas heterólogas expresadas FAE en CEPA Z.

**DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION****I. DEFINICIONES**

**[0048]** Un "alelo" es cualquiera de una o más formas alternativas de un gen que se refieren a un rasgo o característica.

**[0049]** Un "aceite natural" o "grasa natural" significa un aceite predominantemente triglicérido obtenido de un organismo, donde el aceite no ha sido objeto de la mezcla con otro aceite natural o sintético, o fraccionamiento a fin de alterar sustancialmente el perfil de ácidos grasos de los triglicéridos. En relación con un aceite que comprende triglicéridos de una regioespecificidad particular, el aceite o grasa natural no ha sido sometido a interesterificación o de otro procedimiento de síntesis para obtener ese perfil regioespecífica de triglicéridos, en lugar de la regioespecificidad se produce naturalmente, por una célula o población de células. En relación con un aceite natural o grasa natural, y tal como se utiliza en general en toda la presente descripción, los términos aceite y grasa se utilizan indistintamente, salvo que se indique lo contrario. Por lo tanto, un "aceite" o una "grasa" pueden ser líquidos, sólidos, o parcialmente sólidos a temperatura ambiente, dependiendo de la composición de la sustancia y otras condiciones. Aquí, el término "fraccionamiento" se refiere a la eliminación de material a partir del aceite de una manera que cambia su perfil de ácidos grasos en relación con el perfil producido por el organismo logrado. Los términos "aceite natural" y aceites abarcan tales "grasas naturales" obtenidas de un organismo, donde el aceite ha sido objeto de un procesamiento mínimo, incluido el refinado, blanqueo y/o de desgomado, que no cambia sustancialmente su perfil de triglicéridos. Un aceite natural también puede ser un "aceite natural no interesterificado", lo que significa que el aceite natural no ha experimentado un proceso en el que los ácidos grasos se han redistribuido en sus enlaces acilo a glicerol y permanecen esencialmente en la misma configuración que cuando se recuperan del organismo.

**[0050]** "Gen exógeno" se refiere a un ácido nucleico que codifica para la expresión de un ARN y/o proteína que ha sido introducido en una célula (*p. ej* por transformación/transfección), y también se conoce como un "transgén". Una célula que comprende un gen exógeno puede ser denominado como una célula recombinante, en el que se puede introducir gen exógeno adicional. El gen exógeno puede ser de una especie diferente (y por lo heterólogas), o de la misma especie (y así homóloga), con relación a la célula que se está transformado. Por lo tanto, un gen exógeno puede incluir un gen homólogo que ocupa una ubicación diferente en el genoma de la célula o está bajo control diferente, en relación con la copia endógena del gen. Un gen exógeno puede estar presente en más de una copia en la célula. Un gen exógeno puede mantenerse en una célula como una inserción en el genoma (nuclear o plastidio) o como una molécula episomal.

**[0051]** "Ácidos grasos" significa ácidos grasos libres, sales de ácidos grasos, o restos de acilo graso en un glicerolípido. Se entenderá que los grupos acilo grasos de glicerolípidos se pueden describir en términos de ácido carboxílico o anión de un ácido carboxílico que se produce cuando el triglicérido es hidrolizado o saponificado.

**[0052]** "Fuente de carbono fijo" es una molécula que contiene carbono, típicamente una molécula orgánica que está presente a la temperatura ambiente y la presión en forma sólida o líquida en un medio de cultivo que puede ser utilizado por un microorganismo cultivado en el mismo. De acuerdo con ello, el dióxido de carbono no es una fuente de carbono fijo.

**[0053]** "En unión operativa" es un enlace funcional entre dos secuencias de ácido nucleico, una tal secuencia de control (típicamente un promotor) y la secuencia ligada (típicamente una secuencia que codifica una proteína, también llamada una secuencia de codificación). Un promotor está en unión operativa con un gen exógeno si puede mediar la transcripción del gen.

**[0054]** "Microalgas" son organismos microbianos que contienen un cloroplasto u otro plastidio, y, opcionalmente, que es capaz de realizar la fotosíntesis, o un organismo microbiano procariota capaz de realizar la fotosíntesis. Las microalgas incluyen fotoautótrofos obligatorios, que no pueden metabolizar una fuente de carbono fijado en forma de energía, así como los heterótrofos, que pueden vivir exclusivamente fuera de una fuente de carbono fijo. Las microalgas incluyen organismos unicelulares que se separan de las células hermanas poco después de la división celular, tales como *Chlamydomonas*, así como microbios tales como, por ejemplo, *Volvox*, que es un simple microbio fotosintético multicelular de dos tipos de células distintas. Las microalgas incluyen células, tales como *Chlorella*, *Dunaliella*, y *Prototheca*. Las microalgas también incluye otros organismos fotosintéticos microbianas que exhiben adhesión célula-célula, tales como *Agmenellum*, *Anabaena*, y *Pyrobotrys*. Las microalgas incluyen también microorganismos heterótrofos obligatorios que han perdido la capacidad de realizar la fotosíntesis, tales como ciertas especies de algas dinoflageladas y especies del género *Prototheca*.

**[0055]** En relación con una célula recombinante, el término knockdown refiere a un gen que ha sido suprimido parcialmente (por ejemplo, en alrededor de 1-95%) en términos de la producción o actividad de una proteína codificada por el gen.

**[0056]** También, en relación con una célula recombinante, el término knockout se refiere a un gen que ha sido completamente o casi completamente (por ejemplo, > 95%) suprimido en términos de la producción o actividad de una proteína codificada por el gen. Knockouts pueden prepararse por recombinación homóloga de una secuencia no codificante en una secuencia de codificación, delección del gen, la mutación u otro método.

**[0057]** Una célula "oleaginosa" es una célula capaz de producir al menos 20% de lípidos por peso de células secas, naturalmente o por medio de mejora de la cepa recombinante o clásica. Un "microbio oleaginoso" o "microorganismo oleaginoso" es un microbio, incluyendo una microalga que es oleaginosa. Una célula oleaginosa también abarca una célula que ha tenido parte o la totalidad de su contenido de lípidos o de otra eliminado, y células tanto vivas como muertas.

**[0058]** Un "aceite ordenado" o "grasa ordenada" es uno que forma cristales que son principalmente de una estructura polimórfica dada. Por ejemplo, una grasa de aceite ordenado o ordenada puede tener cristales que son mayores que 50%, 60%, 70%, 80%, o 90% de la forma polimórfica  $\beta$  o  $\beta'$ .

**[0059]** En relación con un aceite natural, un "perfil" es la distribución de especies particulares o triglicéridos o grupos acilo grasos en el aceite. Un "perfil de ácidos grasos" es la distribución de grupos acilo grasos en los triglicéridos del aceite sin referencia a la unión a un esqueleto de glicerol. perfiles de ácidos grasos se determinan típicamente por conversión en un éster metílico de ácido graso (FAME), seguido de cromatografía de gas de análisis (GC) con detección de ionización de llama (FID). El perfil de ácidos grasos se puede expresar como uno o más por ciento de un ácido graso en la señal total de ácidos grasos determinada a partir del área bajo la curva para aquel ácido graso. Porcentajes en peso aproximados de medición de FAME-GC-FID de los ácidos grasos. Un "perfil sn-2" es la distribución de los ácidos grasos que se encuentran en la posición sn-2 de los triacilglicéridos en el aceite. Un "perfil regioespecífico" es la distribución de triglicéridos con referencia a la posición de fijación de grupo acilo a la cadena principal de glicerol sin referencia a estereoespecificidad. En otras palabras, un perfil regioespecífico describe fijación de grupo acilo en sn-1/3 vs. sn-2. Por lo tanto, en un perfil regioespecífica, POS (palmitato-oleato-estearato) y SOP

(estearato-oleato-palmitato) se tratan de forma idéntica. Un "perfil estereoespecífico" describe la unión de grupos acilo en sn-1, sn-2 y sn-3. A menos que se indique lo contrario, triglicéridos tales como SOP y POS han de considerarse equivalentes. Un "perfil de TAG" es la distribución de los ácidos grasos que se encuentran en los triglicéridos con referencia a la conexión a la cadena principal de glicerol, pero sin referencia a la naturaleza regioespecífica de las conexiones. Por lo tanto, en un perfil de TAG, el porcentaje de SSO en el aceite es la suma de SSO y SOS, mientras que en un perfil regioespecífico, el porcentaje de SSO se calcula sin inclusión de especies SOS en el aceite. En contraste con los porcentajes en peso de los análisis FAME-GC-FID, los porcentajes de triglicéridos se dan típicamente como porcentajes en moles; que es el porcentaje de una molécula de TAG dado en una mezcla de TAG.

**[0060]** "Recombinante" es una célula, ácido nucleico, proteína o vector que se ha modificado debido a la introducción de un ácido nucleico exógeno o la alteración de un ácido nucleico nativo. Así, por ejemplo, las células recombinantes pueden expresar genes que no se encuentran dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula o expresan genes nativos de manera diferente que los genes son expresados por una célula no recombinante. Las células recombinantes pueden, sin limitación, incluir ácidos nucleicos recombinantes que codifican para un producto génico o para elementos de supresión tales como mutaciones, knockouts, antisentido, ARN de interferencia (iARN) o dsARN que reducen los niveles de producto génico activo en una célula. Un "ácido nucleico recombinante" es un ácido nucleico formado originalmente in vitro, en general, mediante la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo, usando polimerasas, ligasas, exonucleasas y endonucleasas, mediante síntesis química, o de otra manera está en una forma que normalmente no se encuentra en naturaleza. Los ácidos nucleicos recombinantes pueden ser producidos, por ejemplo, para colocar dos o más ácidos nucleicos en unión operativa. Por lo tanto, un ácido nucleico aislado o un vector de expresión formado in vitro mediante la unión de moléculas de ADN que normalmente no se unió en la naturaleza, son ambos recombinante considerado para los fines de esta invención. Una vez que un ácido nucleico recombinante que se hace y se introduce en una célula u organismo huésped, puede replicarse usando la maquinaria celular in vivo de la célula huésped; sin embargo, tales ácidos nucleicos, una vez producidos recombinantemente, aunque posteriormente replicados intracelularmente, todavía se consideran recombinantes para los propósitos de esta invención. Del mismo modo, una "proteína recombinante" es una proteína producida usando técnicas recombinantes, es decir, a través de la expresión de un ácido nucleico recombinante.

**[0061]** Los términos "triglicéridos", "triacylglicérido" y "TAG" se utilizan indistintamente como se conoce en la técnica.

## II. GENERAL

**[0062]** Formas de realización ilustrativas de la presente descripción incluyen células oleaginosas características que producen perfiles alterados de ácidos grasos y/o distribución regioespecífica alterada de ácidos grasos en glicerolípidos, y los productos producidos a partir de las células. Los ejemplos de células oleaginosas incluyen células microbianas que tienen una ruta biosintética del ácido graso tipo II, incluyendo las células oleaginosas plásticas tales como las de algas oleaginosas. Los ejemplos específicos de células incluyen microalgas heterótrofas o heterotróficas obligatorias del phylum Chlorophyta, la clase Trebouxiophytae, el orden Chlorellales, o la familia Chlorellaceae. Ejemplos de microalgas oleaginosas también se proporcionan en las solicitudes de patente PCT publicada WO2008/151149, WO2010/06032, WO2011/150410, y WO2011/150411, incluyendo especies de Chlorella y Prototheca, un género que comprende heterótrofos obligados. Las células oleaginosas pueden ser, por ejemplo, capaz de producir 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, o aceite de aproximadamente 90% en peso de células,  $\pm 5\%$ . Opcionalmente, los aceites producidos pueden ser bajos en ácidos grasos altamente insaturados tales como los ácidos grasos DHA o EPA. Por ejemplo, los aceites pueden comprender menos de 5%, 2%, o 1% de DHA y/o EPA. Las publicaciones antes mencionadas también describen métodos para el cultivo de tales células y la extracción de petróleo, en especial a partir de células de microalgas; tales métodos son aplicables a las células descritas en la presente. Cuando se usan células de microalgas que se pueden cultivar autotrófico (a menos que un heterótrofo obligado) o en la oscuridad utilizando un azúcar (por ejemplo, glucosa, fructosa y/o sacarosa). En cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, las células pueden ser células heterótrofas que comprenden un gen de la invertasa exógeno a fin de permitir que las células producen aceite de un material de alimentación de sacarosa. Alternativamente, o además, las células pueden metabolizar xilosa a partir de materias primas celulósicas. Por ejemplo, las células pueden ser modificadas genéticamente para expresar uno o más genes del metabolismo de la xilosa tales como las que codifican un transportador activo xilosa, un transportador de xilulosa-5-fosfato, una xilosa isomerasa, una xiluloquinasa, una xilitol deshidrogenasa y una xilosa reductasa. Ver WO2012/154626, " GENETICALLY ENGINEERED MICROORGANISMS THAT METABOLIZE XYLOSE", publicado el 15 de Nov del 2012.

**[0063]** Las células oleaginosas expresan uno o más genes exógenos que codifican enzimas de la biosíntesis de ácidos grasos. Como resultado, algunas realizaciones incluyen aceites naturales que no eran obtenibles a partir de un no vegetal o aceite no de semillas, o no pueden obtenerse en absoluto.

**[0064]** Las células oleaginosas producen un aceite de almacenamiento, que es principalmente triacylglicérido y se pueden almacenar en los órganos de almacenamiento de la célula. Un aceite crudo se puede obtener de las células mediante la interrupción de las células y aislar el aceite. WO2008/151149, WO2010/06032, WO2011/150410, y WO2011/150411 dan a conocer las técnicas de cultivo y de aislamiento de aceite de heterotróficas. Por ejemplo, el aceite se puede obtener proporcionando o cultivar, el secado y pulsando las células. Los aceites producidos pueden ser refinado, blanqueado y desodorizado (RBD) tal como se conoce en la técnica o como se describe en WO2010/120939.

Los aceites crudos o RBD se pueden usar en una variedad de alimentos, productos químicos, y productos o procesos industriales. Después de la recuperación del aceite, una valiosa biomasa residual permanece. Usos de la biomasa residual incluyen la producción de papel, plásticos, absorbentes, adsorbentes, fluidos de perforación, como alimento para animales, para la nutrición humana, o para fertilizante.

**[0065]** Cuando un perfil de ácidos grasos de un triglicérido (también denominado un "triacylglicérido" o "TAG") se da aceite celular aquí, se entenderá que esto se refiere a una muestra no fraccionada del aceite de almacenamiento extraído de la célula analizada bajo condiciones en donde los fosfolípidos se han eliminado o con un método de análisis que es sustancialmente insensible a los ácidos grasos de los fosfolípidos (por ejemplo, usando la cromatografía y espectrometría de masas). El aceite puede ser sometido a un proceso de RBD para eliminar fosfolípidos, ácidos grasos libres y los olores tienen todavía sólo cambios menores o insignificantes para el perfil de ácidos grasos de los triglicéridos en el aceite. Debido a que las células son oleaginosas, en algunos casos el aceite de almacenamiento constituirá el grueso de todas las TAG en la célula. Ejemplos 1, 2 y 8 a continuación dan métodos analíticos para determinar la composición de ácidos grasos de TAG y la estructura regioespecífica.

**[0066]** Clasificados en términos generales, ciertos ejemplos de la descripción incluyen (i) auxótrofos de ácidos grasos particulares; (ii) células que producen aceites que tienen bajas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados, incluyendo las células que son auxotróficas para los ácidos grasos insaturados; (iii) células que producen aceites que tienen altas concentraciones de ácidos grasos particulares debido a la expresión de uno o más genes exógenos que codifican enzimas que transfieren los ácidos grasos para glicerol o un éster de glicerol; (iv) las células productoras de aceites regioespecíficos, y (v) construcciones genéticas o células que codifican un gen recién descubierto que codifica una enzima LPAAT de *Cuphea* PSR23 (véase el Ejemplo 43). Los ejemplos también engloban los aceites hechos por tales células, la biomasa residual de dichas células después de la extracción de aceite, oleoquímicos, combustibles y productos alimenticios elaborados a partir de los aceites y los métodos de cultivo de las células.

**[0067]** En cualquiera de los ejemplos siguientes, las células usadas son células que tienen opcionalmente una ruta biosintética del ácido graso tipo II, tales como células de microalgas incluyendo células de microalgas heterótrofas heterotróficas u obligados, incluyendo las células clasificadas como Chlorophyta, Trebouxiophyceae, Chlorellales, Chlorellaceae, o Chlorophyceae, o células por ingeniería genética para tener una vía de biosíntesis de ácidos grasos de tipo II mediante las herramientas de la biología sintética (es decir, el trasplante de la maquinaria genética de una biosíntesis de ácidos grasos tipo II en un organismo que carece de tal vía). En realizaciones específicas, la célula es de la especie *Prototheca moriformis*, *Prototheca krugani*, *Prototheca stagnora* o *Prototheca zopfii* o tiene una secuencia de 23S ARNr con al menos 65, 70, 75, 80, 85, 90 o 95% de identidad de nucleótidos SEQ ID NO: 76. Mediante el cultivo en la oscuridad o el uso de un heterótrofo obligado, el aceite natural producido puede ser bajo en clorofila u otros colorantes. Por ejemplo, el aceite natural puede tener menos de 100, 50, 10, 5, 1, 0.0.5 ppm de clorofila sin purificación sustancial.

**[0068]** El valor de isótopo de carbono estable  $\delta^{13}\text{C}$  es una expresión de la relación de  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  con relación a un estándar (por ejemplo PDB, carbonita de esqueleto fósil de *Belemnite americana* de la formación Peedee de Carolina del Sur). El valor de isótopo de carbono estable  $\delta^{13}\text{C}$  (‰) de los aceites puede estar relacionado con el valor  $\delta^{13}\text{C}$  de la materia prima utilizada. En algunas realizaciones, los aceites se derivan de organismos oleaginosos heterotróficamente cultivados en azúcar derivado de una planta C4 tales como maíz o caña de azúcar. En algunas realizaciones el  $\delta^{13}\text{C}$  (‰) del aceite es -10 a -17 ‰ o -13 a -16 ‰.

**[0069]** En formas de realización y ejemplos específicos analizados a continuación, uno o más genes de síntesis de ácido graso (por ejemplo, que codifica una tioesterasa acil-ACP, una sintasa ceto-acil ACP, un LPAAT, una desaturasa estearoil ACP, u otros descritos en este documento) se incorpora en una microalga. Se ha encontrado que para cierta microalga, un producto del gen de síntesis de ácido graso de planta es funcional en ausencia de la correspondiente proteína portadora de acilo de planta (ACP), incluso cuando el producto génico es una enzima, tal como una tioesterasa acil-ACP, que requiere la unión de ACP para funcionar. Por lo tanto, opcionalmente, las células de microalgas pueden utilizar tales genes para hacer un aceite deseado sin co-expresión del gen de ACP de planta.

### III. AUXÓTROFOS DE ÁCIDOS GRASOS/REDUCCIÓN DE NIVELES DE ÁCIDOS GRASOS PARA CONDICIONES INHIBIDORAS DEL CRECIMIENTO DURANTE UNA FASE DE PRODUCCIÓN PETROLERA

**[0070]** En una realización, la célula se manipula genéticamente para que todos los alelos de un gen de la ruta de los lípidos son eliminados. Alternativamente, la cantidad o actividad de los productos génicos de los alelos es derribada como para requerir la suplementación con ácidos grasos. Una primera construcción de transformación se puede generar con secuencias donantes homólogas a uno o más de los alelos del gen. Esta primera construcción de transformación puede ser introducida y métodos de selección seguido para obtener una cepa aislada se caracterizan por una o más interrupciones alélicas. Alternativamente, una primera cepa puede ser creada que está diseñada para expresar un marcador seleccionable a partir de una inserción en un primer alelo, inactivando de este modo el primer alelo. Esta cepa se puede usar como el anfitrión para aún más ingeniería genética para knockout o knockdown de los alelo(s) restante(s) del gen de la ruta de los lípidos. La complementación del gen endógeno se puede lograr a través de la expresión por ingeniería de una construcción de transformación adicional que lleva el gen endógeno cuya actividad fue sometida a ablación originalmente, o mediante la expresión de un gen heterólogo adecuado. La expresión

del gen de complementación o bien se puede regular de forma constitutiva o regulable a través del control, permitiendo de este modo la sintonización de expresión al nivel deseado de manera que permita el crecimiento o crear una condición auxotrófica a voluntad. En una realización, una población de las células auxotróficas de ácido graso se utiliza para el cribado para complementar genes; por ejemplo, por transformación con determinados genes candidatos para las enzimas de síntesis de ácidos grasos exógenos, o una biblioteca de ácidos nucleicos que se cree que contiene dichos candidatos.

**[0071]** Knockout de todos los alelos del gen y la complementación del gen knockout deseado no tiene por qué llevarse a cabo de forma secuencial. La interrupción de un gen endógeno de interés y su complementación ya sea por expresión constitutiva o inducible de un gen de complementación adecuado puede llevarse a cabo de varias maneras. En un método, esto se puede conseguir por co-transformación de construcciones adecuadas, uno interrumpiendo el gen de interés y el segundo proporcionando complementación en un locus adecuado, alternativo. En otro método, la ablación del gen diana puede efectuarse a través de la sustitución directa del gen diana por un gen adecuado bajo control de un promotor inducible. De esta manera, la expresión del gen diana ahora está bajo el control de un promotor regulable. Un enfoque adicional consiste en sustituir los elementos reguladores endógenos de un gen con un sistema de expresión de genes exógenos, inducible. Bajo este régimen, el gen de interés ahora se puede activar o desactivar en función de las necesidades particulares. Un método adicional más es crear una primera cepa para expresar un gen exógeno capaz de complementar el gen de interés, a continuación, un knockout o knockdown de todos los alelos del gen de interés en esta primera cepa. El enfoque de knockdown o knockout alélico múltiple y complementación con genes exógenos se puede utilizar para alterar el perfil de ácidos grasos, perfil regioespecífico, perfil sn-2, o el perfil de TAG de la célula de ingeniería.

**[0072]** En una realización específica, la célula recombinante comprende ácidos nucleicos que pueden funcionar para reducir la actividad de una tioesterasa de acil-ACP endógena; por ejemplo, una tioesterasa FatA o FatB acil-ACP que tiene una preferencia para hidrolizar cadenas grasas acil-ACP de longitud C18 (por ejemplo, estearato de (C18: 0) u oleato de (C18: 1), o ácidos grasos C8: 0-C16: 0. La actividad de una tioesterasa acil-ACP endógena se puede reducir por enfoques knockout o knockdown. Knockdown puede conseguirse mediante el uso de una o más construcciones de horquilla de ARN, por el promotor de secuestro (sustitución de una actividad inferior o promotor inducible para el promotor nativo de un gen endógeno), o por un knockout de genes en combinación con la introducción de un gen similar o idéntico bajo el control de un promotor inducible. Ejemplo 34 describe la ingeniería de una cepa *Prototheca* en la que dos alelos de tioesterasa de acil-ACP graso endógeno (FatA1) se han eliminado. La actividad de FATA1 de *Prototheca moriformis* fue complementada por la expresión de una tioesterasa exógena. Ejemplo 36 detalla el uso de constructos de horquilla de ARN para reducir la expresión de FATA1 en *Prototheca*.

**[0073]** En consecuencia, las células oleaginosas, incluidas las de los organismos con una ruta biosintética de ácido graso de tipo II pueden tener knockouts o knockdown de alelos que codifican la acil-ACP-tioesterasa en un grado tal como para eliminar o limitar severamente la viabilidad de las células en ausencia de suplementación de ácido graso o complementaciones genéticas. Estas cepas se pueden utilizar para seleccionar los transformantes que expresan transgenes acil-ACP-tioesterasa. Alternativamente, o además, las cepas se pueden utilizar para trasplantar completamente tioesterasas acil-ACP exógenas para dar dramáticamente diferentes perfiles de ácidos grasos de aceites naturales producidos por tales células. Por ejemplo, la expresión FATA puede ser completamente o casi completamente eliminada y reemplazada con genes FatB que producen ácidos grasos de cadena media. En realizaciones específicas, estos transformantes producen aceites naturales con más de 50, 60, 70, 80, o 90% de ácido caprílico, cáprico, láurico, mirístico, o palmítico, o los ácidos grasos totales de longitud de cadena inferior a 18 átomos de carbono. Tales células pueden requerir la suplementación con ácidos grasos de cadena más larga tales como ácido estearático o oleico o conmutación de las condiciones ambientales entre el crecimiento de estados permisivos y restrictivos en el caso de un promotor inducible que regula un gen FatA.

**[0074]** En una realización, se cultivan las células oleaginosas. Las células son totalmente auxotróficas o parcialmente auxotróficas (es decir, la letalidad o enfermedad sintética) con respecto a uno o más tipos de ácidos grasos. Las células se cultivan con la suplementación de ácido(s) graso(s) a fin de aumentar el número de células, a continuación, permitiendo que las células acumulen aceite (por ejemplo al menos 40% en peso celular seco). Alternativamente, las células comprenden un gen de síntesis de ácidos grasos regulable que se puede cambiar en la actividad sobre la base de las condiciones ambientales y las condiciones ambientales durante una primera división celular, producción de favor de fase del ácido graso y de las condiciones ambientales durante una segunda acumulación de aceite, producción de desfavor de fase del ácido graso. En el caso de un gen inducible, la regulación del gen inducible puede estar mediada, sin limitación, a través de pH del medio ambiente (por ejemplo, utilizando el promotor AMT3 como se describe en los Ejemplos).

**[0075]** Como resultado de la aplicación de cualquiera de estos métodos de administración de suplementos o de regulación, un aceite de célula puede ser obtenido de la célula que tiene bajas cantidades de uno o más ácidos grasos esenciales para la propagación celular óptima. Los ejemplos específicos de aceites que pueden obtenerse incluyen aquellos bajo en ácidos linolénico esteárico, y/o linoleico.

**[0076]** Estas células y métodos se ilustran en relación con los aceites poliinsaturados bajos en la sección inmediatamente a continuación y en el Ejemplo 6 (auxótrofo de desaturasa de ácido graso) en relación con los aceites

bajos en ácidos grasos poliinsaturados y en el Ejemplo 34 (auxótrofo de tioesterasa de acil-ACP).

**[0077]** Del mismo modo, los auxótrofos de ácidos grasos se pueden hacer en otros genes de síntesis de ácidos grasos que incluyen los que codifican una SAD, FAD, KASIII, KASI, KASII, KCS, elongasa, GPAT, LPAAT, DGAT o AGPAT o PAP. Estos auxótrofos también se pueden utilizar para seleccionar los genes del complemento o eliminar la expresión natural de estos genes a favor de los genes exógenos deseados con el fin de alterar el perfil de ácidos grasos, perfil regioespecífico, o perfil de TAG de aceites naturales producidos por las células oleaginosas.

**[0078]** En consecuencia, en un ejemplo de la divulgación, hay un método para producir un aceite/grasa. El método comprende cultivar una célula oleaginosa recombinante en una fase de crecimiento bajo un primer conjunto de condiciones que es permisivo para la división celular a fin de aumentar el número de células debido a la presencia de un ácido graso, cultivando la célula en una fase de producción de aceite bajo un segundo conjunto de condiciones que es restrictivo para la división celular pero permisivo para la producción de un aceite que se agota en el ácido graso, y extraer el aceite de la célula, donde la célula tiene una mutación o ácidos nucleicos exógenos que puede funcionar para suprimir la actividad de una enzima de síntesis de ácidos grasos, siendo la enzima opcionalmente una desaturasa de estearoil-ACP, desaturasa de ácido graso delta 12, o una sintasa cetoacil-ACP. El aceite producido por la célula se puede agotar en el ácido graso en por lo menos de 50, 60, 70, 80, o 90%. La célula puede ser cultivada heterótrofa. La célula puede ser una célula de microalgas cultivadas heterotróficamente o autotróficas y puede producir al menos 40, 50, 60, 70, 80, o 90% de aceite por peso de células secas.

#### IV. Los aceites naturales bajos poliinsaturados

**[0079]** En un ejemplo de la presente descripción, el aceite natural producido por la célula tiene niveles muy bajos de ácidos grasos poliinsaturados. Como resultado, el aceite natural puede tener una estabilidad mejorada, que incluye la estabilidad oxidativa. El aceite natural puede ser un líquido o sólido a temperatura ambiente, o una mezcla de aceites líquidos y sólidos, incluyendo los aceites regioespecíficos o estereoespecíficos, aceites de alto estearato, o aceites de alta mitad de la cadena descrita *infra*. La estabilidad oxidativa se puede medir por el método Rancimat usando la prueba estándar AOCS Cd 12b-92 a una temperatura definida. Por ejemplo, la prueba de OSI (índice de estabilidad oxidativa) puede realizarse a temperaturas entre 110°C y 140°C. El aceite es producido por la cultivación de células (por ejemplo, cualquiera de las células microbianas plásticas mencionadas anteriormente o en otra parte en el presente documento) que se han diseñado genéticamente para reducir la actividad de uno o más desaturasas de ácido graso. Por ejemplo, las células pueden modificarse por ingeniería genética para reducir la actividad de uno o más de desaturasa(s)  $\Delta 12$  de acilo graso responsables de convertir ácido oleico (18: 1) en ácido linoleico (18: 2) y/o una o más desaturasa(s)  $\Delta 15$  de acilo graso responsables de la conversión de ácido linoleico (18: 2) en ácido linolénico (18: 3). Varios métodos pueden ser usados para inhibir la desaturasa incluyendo knockout o mutación de uno o más alelos del gen que codifica la desaturasa en la codificación o regiones reguladoras, la inhibición de la transcripción del ARN, o la traducción de la enzima, incluyendo ARNi, ARNip, miARN, dsARN, las técnicas antisentido, y ARN de horquilla. Otras técnicas conocidas en la técnica también pueden ser usadas incluyendo la introducción de un gen exógeno que produce una proteína inhibidora u otra sustancia que es específica para la desaturasa.

**[0080]** En una realización específica, actividad de desaturasa de ácido graso (por ejemplo, desaturasa de ácidos grasos  $\Delta 12$ ) en la célula se reduce a un grado tal que la célula es incapaz de ser cultivada o es difícil de cultivar (por ejemplo, la tasa de división celular disminuye más de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95, 97 o 99%). El logro de tales condiciones puede implicar knockout, o la supresión efectiva de la actividad de múltiples copias de genes (por ejemplo, 2, 3, 4 o más) de la desaturasa o sus productos génicos. Una realización específica incluye el cultivo en un cultivo celular de un auxótrofo de ácido graso total o parcial con la suplementación del ácido graso o una mezcla de ácidos grasos a fin de aumentar el número de células, a continuación, permitiendo que las células acumulen aceite (por ejemplo a al menos 40 % en peso de la célula). Alternativamente, las células comprenden un gen de síntesis de ácidos grasos regulable que se puede cambiar en la actividad. Por ejemplo, la regulación se puede basar en las condiciones ambientales y las condiciones ambientales durante una primera división celular, la producción de favor de fase del ácido graso y de las condiciones ambientales durante una segunda acumulación de aceite, fase de producción de desfavor del aceite. Por ejemplo, el cultivo de medios de pH puede ser utilizado como un control ambiental para cambiar la expresión de un gen de la ruta de lípidos para producir un estado de actividad de la enzima sintética de alta o baja. Ejemplos de tales células se describen en el Ejemplo 7.

**[0081]** En una realización específica, una célula se cultiva utilizando una modulación de los niveles de ácido linoleico dentro de la célula. En particular, el aceite natural es producido por el cultivo de las células bajo una primera condición que es permisiva a un aumento en el número de células debido a la presencia de ácido linoleico y a continuación, el cultivo de las células bajo una segunda condición que se caracteriza por inanición de ácido linoleico y, por tanto es inhibidora de la división celular, pero permisiva de acumulación de aceite. Por ejemplo, un cultivo de siembra de las células puede ser producido en presencia de ácido linoleico añadido al medio de cultivo. Por ejemplo, la adición de ácido linoleico a 0,25 g/L en el cultivo de siembra de una cepa *Prototheca* deficiente en la producción de ácido linoleico debido a la ablación de dos alelos de una desaturasa  $\Delta 12$  de acilo graso (es decir, un auxótrofo linoleico) fue suficiente para apoyar la división celular a un nivel comparable al de las células de tipo salvaje. Opcionalmente, el ácido linoleico a continuación, puede ser consumido por las células, o se retira de otra manera o se diluye. Después las células se cambiaron en una fase de producción de aceite (por ejemplo, suministrando azúcar bajo condiciones que limitan el

azúcar como se describe en WO2010/063032). Sorprendentemente, se ha encontrado que la producción de petróleo ocurra incluso en ausencia de la producción de ácido linoleico o de suplementos, como se demuestra en microalgas oleaginosas heterótrofas obligadas *Prototheca* pero generalmente aplicables a otras microalgas oleaginosas, microorganismos, o incluso organismos multicelulares (por ejemplo, células de plantas cultivadas). En estas condiciones, el contenido de aceite de la célula puede aumentar hasta aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90%, o más en peso de células secas, mientras que el aceite producido puede tener perfil de ácido graso poliinsaturado (por ejemplo; linoleico + linolénico) con 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,3%, 0,2%, 0,1%, 0,05% o menos, como un porcentaje de los ácidos grasos de triglicéridos totales en el petróleo. Por ejemplo, el contenido de aceite de la célula puede ser 50% o más por peso de células secas y el triglicérido del petróleo produjo menos de 3% de ácidos grasos poliinsaturados.

**[0082]** Estos aceites también se pueden producir sin la necesidad (o reducción de la necesidad) para suplementar el cultivo con ácido linoleico mediante el uso de maquinaria de la célula para producir el ácido linoleico, pero predominantemente o sólo durante la fase de división celular. La maquinaria de las células productoras de linoleico puede ser regulable con el fin de producir ácido linoleico sustancialmente menos durante la fase de producción de aceite. La regulación puede ser a través de la modulación de la transcripción de los gen(es) de desaturasa. Por ejemplo, la mayoría, y preferiblemente la totalidad de la actividad de desaturasa de ácido graso  $\Delta 12$  puede colocarse debajo de un promotor regulable regulado para expresar la desaturasa en la fase de la división celular, pero que se reduce o se apaga durante la fase de acumulación de aceite. La regulación puede estar vinculada a una condición de cultivo celular, tales como el nivel de pH, y/o nitrógeno, como se describe en los ejemplos en el presente documento, u otra condición ambiental. En la práctica, la condición puede ser manipulada mediante la adición o la eliminación de una sustancia (por ejemplo, los protones a través de la adición de ácido o base) o permitiendo que las células consuman una sustancia (por ejemplo, el nitrógeno de suministro de nutrientes) para efectuar el interruptor deseado en la regulación de la actividad de desaturasa.

**[0083]** Otros métodos genéticos o no genéticos para la regulación de la actividad de desaturasa también pueden ser utilizados. Por ejemplo, un inhibidor de la desaturasa puede ser añadido al medio de cultivo de una manera que es eficaz para inhibir que los ácidos grasos poliinsaturados se produzcan durante la fase de producción de petróleo.

**[0084]** En consecuencia, en un ejemplo específico de la divulgación, hay un método que comprende proporcionar una célula recombinante que tiene un gen de la desaturasa de ácidos grasos delta 12 regulable, bajo el control de un elemento regulador recombinante a través de una condición ambiental. La célula se cultiva en condiciones que favorecen la multiplicación celular. Al alcanzar una densidad celular dada, el medio celular se altera para cambiar las células a modo de producción de lípidos por la limitación de nutrientes (por ejemplo, reducción de nitrógeno disponible). Durante la fase de producción de lípidos, la condición ambiental es tal que la actividad de la desaturasa de ácido graso delta 12 se regula al baja. Las células se recogieron a continuación y, opcionalmente, se extrajo el aceite. Debido al bajo nivel de desaturasa de ácido graso delta 12 durante la fase de producción de lípidos, el aceite tiene menos ácidos grasos poliinsaturados y ha mejorado la estabilidad oxidativa. Opcionalmente, las células se cultivan heterotróficamente y, opcionalmente, células de microalgas.

**[0085]** Utilizando uno o más de estos métodos de regulación de desaturasa, es posible obtener un aceite natural que se cree que ha sido previamente imposible de obtener, especialmente en el cultivo a gran escala en un biorreactor (por ejemplo, más de 1000L). El aceite puede tener niveles de ácido graso poliinsaturado que son 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,3%, 0,2%, o menos, como un porcentaje de área de los ácidos grasos de triglicéridos totales en el aceite.

**[0086]** Una consecuencia de tener tales bajos niveles de ácidos grasos poliinsaturados es que los aceites son excepcionalmente estables a la oxidación. De hecho, en algunos casos, los aceites pueden ser más estables que cualquier aceite natural de las células previamente conocidas. En realizaciones específicas, el aceite es estable, sin antioxidantes añadidos, a 110°C de modo que el punto de inflexión en la conductancia aún no se alcanza por 10 horas, 15 horas, 20 horas, 30 horas, 40, horas, 50 horas, 60 horas, o 70 horas bajo condiciones de AOCS Cd 12b-92. Prueba Rancimat, señalando que para los aceites muy estables, la reposición de agua puede ser necesaria en tal prueba debido a la evaporación que se produce con períodos tan largos de ensayo (véase el Ejemplo 5). Por ejemplo, el aceite puede tener un valor OSI de 40-50 horas o 41-46 horas a 110°C sin antioxidantes añadidos. Cuando se añaden antioxidantes (aptos para alimentos o de otro tipo), el valor OSI medido puede aumentarse adicionalmente. Por ejemplo, con tocoferol añadido (100 ppm) y palmitato de ascorbilo (500 ppm) o PANA y palmitato de ascorbilo, un aceite tal puede tener un índice de estabilidad oxidativa (valor OSI) a 110°C en exceso de 100 o 200 horas, medido por la prueba de Rancimat. En otro ejemplo, 1050 ppm de tocoferoles mezclados y 500 pm de palmitato de ascorbilo se añaden a un aceite que comprende ácido linoleico menos del 1% o menos del 1% linoleico + linolénico; como resultado, el aceite es estable a 110°C durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 16, 20, 30, 40 o 50 días, 5 a 15 días, 6 a 14 días, 7 a 13 días, 8 a 12 días, de 9 a 11 días, aproximadamente 10 días o aproximadamente 20 días. El aceite también puede ser estable a 130°C durante de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 16, 20, 30, 40 o 50 días, 5 a 15 días, 6 a 14 días, 7 a 13 días, 8 a 12 días, de 9 a 11 días, aproximadamente 10 días o aproximadamente 20 días. En un ejemplo específico, se encontró que tal aceite era estable durante más de 100 horas (alrededor de 128 horas como se observa). En una realización adicional, el valor OSI del aceite natural sin antioxidantes añadidos a 120°C es mayor de 15 horas o 20 horas o está en el intervalo de 10-15, 15-20, 20-25, o 25-50 horas, o 50-100 horas.



**[0087]** En un ejemplo, utilizando estos métodos, el contenido de aceite de una célula de microalgas es de entre 40 y aproximadamente 85% en peso celular seco y los ácidos grasos poliinsaturados en el perfil de ácidos grasos del aceite es de entre 0,001% y 3% en el ácido graso el perfil del aceite y, opcionalmente, se obtiene un aceite natural que tiene un tiempo de inducción OSI de al menos 20 horas a 110°C sin la adición de antioxidantes. En otro ejemplo, no es un aceite natural producido por RBD para tratamiento de un aceite natural de una célula oleaginosa, el aceite comprende entre 0,001% y 2% ácidos grasos poliinsaturados y tiene un tiempo de inducción OSI superior a 30 horas a 110°C sin la adición de antioxidantes. En otro ejemplo, no es un aceite natural producido por RBD para tratamiento de un aceite natural de una célula oleaginosa, el aceite comprende entre 0,001% y 1% de ácidos grasos poliinsaturados y tiene un tiempo de inducción OSI superior a 30 horas a 110°C sin la adición de antioxidantes.

**[0088]** En otra realización específica no es un aceite con niveles de polisaturado reducidos producidos por los métodos anteriormente descritos. El aceite se combina con antioxidantes tales como PANA y palmitato de ascorbilo. Por ejemplo, se encontró que cuando un aceite tal se combinó con 0,5% PANA y 500 ppm de palmitato de ascorbilo el aceite tenía un valor OSI de aproximadamente 5 días a 130°C o 21 días a 110°C. Estos resultados notables sugieren que no sólo es el aceite excepcionalmente estable, pero estos dos antioxidantes son excepcionalmente potentes estabilizantes de aceites de triglicéridos y la combinación de estos antioxidantes pueden tener aplicabilidad general, incluyendo la producción de lubricantes biodegradables estables (por ejemplo, lubricantes de motores a reacción). En realizaciones específicas, la manipulación genética de desaturasa de acilo graso  $\Delta 12$  resulta en un aumento 2 a 30, o 5 a 25, o de 10 a 20 veces en OSI (por ejemplo, a 110°C) con relación a una cepa sin la manipulación. El aceite puede ser producido por la supresión de la actividad de desaturasa en una célula, incluyendo como se describe anteriormente.

**[0089]** Los antioxidantes adecuados para uso con los aceites de la presente invención incluyen alfa, delta, gamma y tocoferol (vitamina E), tocotrienol, ácido ascórbico (vitamina C), glutatión, ácido lipoico, ácido úrico,  $\beta$ -caroteno, el licopeno, la luteína, el retinol (vitamina A), el ubiquinol (coenzima Q), la melatonina, resveratrol, flavonoides, extracto de romero, galato de propilo (PG), butilhidroquinona terciaria (TBHQ), hidroxianisol butilado (BHA), e hidroxitolueno butilado (BHT), N,N'-di-2-butil-1,4-fenilendiamina, 2,6-di-terc-butil-4-metilfenol, 2,4-dimetil-6-terc-butilfenol, 2,4-dimetil-6-terc-butilfenol, 2,4-dimetil-6-terc-butilfenol, 2,6-di-terc-butil-4-metilfenol, 2,6-di-terc-butilfenol, y fenilo-alfa-naftilamina (PANA).

**[0090]** Además de las modificaciones desaturasa, en una realización relacionada otras modificaciones genéticas pueden realizarse para adaptar adicionalmente las propiedades del aceite, tal como se describe en todas partes, incluyendo la introducción o sustitución de tioesterasas acil-ACP teniendo especificidad de longitud de cadena alterada y/o sobreexpresión de un gen endógeno o exógeno que codifica un KAS, gen SAD, LPAAT, o DGAT. Por ejemplo, una cepa que produce niveles elevados de ácido oleico también puede producir bajos niveles de ácidos grasos poliinsaturados. Tales modificaciones genéticas pueden incluir el aumento de la actividad de la desaturasa de estearoil-ACP (SAD) mediante la introducción de un gen exógeno SAD, el aumento de la actividad de elongasa mediante la introducción de un gen exógeno KASII, y/o el derribo o la anulación de un gen FATA.

**[0091]** En una realización específica, un aceite natural de alto contenido oleico con ácidos grasos poliinsaturados bajos puede ser producido. Por ejemplo, el aceite puede tener un perfil de ácidos grasos con más de 60, 70, 80, 90, o 95% de ácido oleico y menos de 5, 4, 3, 2, o 1% de poliinsaturados. En realizaciones relacionadas, un aceite natural es producido por una célula que tiene ácidos grasos nucleicos recombinantes que pueden funcionar para disminuir la actividad de desaturasa de ácidos grasos  $\Delta 12$  y opcionalmente desaturasa de ácido graso  $\Delta 15$  con el fin de producir un aceite que tiene menos de o igual a 3% de ácidos grasos poliinsaturados con ácido oleico mayor que 60%, ácidos grasos poliinsaturados menor que 2% y ácido oleico mayor que 70%, menos de 1% de ácidos grasos poliinsaturados y mayor que 80% de ácido oleico, o ácidos grasos poliinsaturados de menos de 0,5% y ácido oleico mayor que 90%. Se ha encontrado que una manera de aumentar el ácido oleico es el uso de ácidos nucleicos recombinantes operables para disminuir la expresión de una tioesterasa FATA acil-ACP y opcionalmente sobreexpresar un gen KAS II; una célula de este tipo puede producir un aceite con ácido oleico mayor que o igual a 75%. Alternativamente, la sobreexpresión de KASII puede ser utilizada sin el knockout o knockdown FATA. Los niveles de ácido oleico pueden incrementarse aún más mediante la reducción de la actividad de desaturasa de ácido graso  $\Delta 12$  usando los métodos anteriormente, disminuyendo de ese modo la cantidad de ácido oleico se convierte en los ácidos insaturados linoleico y linoléico. Por lo tanto, el aceite producido puede tener un perfil de ácidos grasos con al menos 75% ácido oleico y como máximo 3%, 2%, 1%, o 0,5% ácido linoleico. En un ejemplo relacionado, el aceite tiene ácido entre 80 a 95% oleico y ácido linoleico aproximadamente 0,001 a 2%, ácido linoleico 0,01 a 2%, o ácido linoleico 0,1 a 2%. Tales aceites tienen un punto de congelación bajo, con una excelente estabilidad y son útiles en los alimentos, para freír, combustibles, o en aplicaciones químicas. Además, estos aceites pueden exhibir una propensión reducida a cambiar de color con el tiempo. En una aplicación química ilustrativa, el alto aceite oleico se utiliza para producir un producto químico. Los dobles enlaces de ácido oleico de los grupos de ácido oleico de los triglicéridos en el aceite pueden ser epoxidados o hidroxilados para hacer un poliol. El aceite epoxidado o hidroxilado se puede utilizar en una variedad de aplicaciones. Una de tales aplicaciones es la producción de poliuretano (incluyendo espuma de poliuretano) a través de la condensación del triglicérido hidroxilado con un isocianato, como se ha practicado con aceite de soja hidroxilado o aceite de ricino. Véase, por ejemplo US2005/0239915, US2009/0176904, US2005/0176839, US2009/0270520, y la patente de Estados Unidos N° 4.264.743 y Zlatanovic, et al, Biomacromolecules 2002, 3, 1048-1056 (2002) para ejemplos

de hidroxilación y químicas de condensación de poliuretano. Reacciones de formación de hidroxilo adecuadas incluyen la epoxidación de uno o más dobles enlaces de un ácido graso seguido de apertura del anillo epóxido de ácido catalizado con agua (para formar un diol), alcohol (para formar un éter hidroxilo), o un ácido (para formar un éster hidroxilo). Hay múltiples ventajas de usar el aceite poliinsaturado bajo/alto oleico en la producción de un poliuretano de base biológica: (1) el tiempo de conservación, color u olor, de espumas de poliuretano se pueden mejorar; (2) la reproducibilidad del producto puede ser mejorada debido a la falta de reacciones secundarias no deseadas que resultan de polinsaturados; (3) se puede producir un mayor grado de reacción de hidroxilación debido a la falta de ácidos grasos poliinsaturados y las características estructurales del producto de poliuretano se puede mejorar en consecuencia.

**[0092]** Los aceites poliinsaturados o aceites poliinsaturados de alto/bajo oleico descritos aquí pueden ser utilizados ventajosamente en aplicaciones químicas donde amarilleo no es deseable. Por ejemplo, color amarillento puede ser indeseable en pinturas o recubrimientos hechos de los ácidos triglicéridos grasos derivados de los triglicéridos. Color amarillo puede ser causado por reacciones que implican ácidos grasos poliinsaturados y tocotrienoles y/o tocoferoles. Por lo tanto, la producción del aceite de alta estabilidad en un microbio oleaginoso con bajos niveles de tocotrienoles puede ser ventajoso en la elevación de la estabilidad de color alto una composición química hecha usando el aceite. En contraste a los aceites vegetales usados comúnmente, a través de la elección apropiada de microbio oleaginoso, los aceites naturales de estas realizaciones pueden tener niveles de tocoferoles y tocotrienoles de 1 g/L o menos. En una realización específica, un aceite natural tiene un perfil de ácidos grasos con menos de 2% con ácidos grasos poliinsaturados y menos de 1 g/L de tocoferoles, tocotrienoles o la suma de los tocoferoles y tocotrienoles. En otra realización específica, el aceite natural tiene un perfil de ácidos grasos con menos de 1% con ácidos grasos poliinsaturados y menos de 0,5 g/L de tocoferoles, tocotrienoles o la suma de los tocoferoles y tocotrienoles.

**[0093]** Cualquiera de los aceites naturales de alta estabilidad (bajo poliinsaturado) o derivados de los mismos se pueden usar para formular alimentos, medicamentos, vitaminas, nutracéuticos, cuidado personal u otros productos, y son especialmente útiles para productos oxidativamente sensibles. Por ejemplo, el aceite natural de alta estabilidad (por ejemplo, menos de o igual a 3%, 2% o 1% poliinsaturados) se puede utilizar para formular un filtro solar (por ejemplo, una composición que tiene uno o más de avobenzona, homosalato, octisalato, octocrileno o oxibenzona) o crema para la cara retinoide con un aumento en la vida útil debido a la ausencia de reacciones de radicales libres asociados con los ácidos grasos poliinsaturados. Por ejemplo, la vida útil se puede aumentar en términos de color, olor, propiedades organolépticas o % de compuesto activo restante después de la degradación acelerada durante 4 semanas a 54°C. El aceite de alta estabilidad también puede ser utilizado como un lubricante con una excelente estabilidad a alta temperatura. Además de la estabilidad, los aceites pueden ser biodegradables, que es una rara combinación de propiedades.

**[0094]** En otra realización relacionada, el perfil de ácidos grasos de un aceite natural es elevado en ácidos grasos C8 a C16 a través de la modificación genética adicional, por ejemplo a través de la sobreexpresión de una cadena corta a mitad de la cadena prefiriendo tioesterasa de acil-ACP u otras modificaciones descritas aquí. Un aceite poliinsaturado bajo de acuerdo con estas formas de realización se puede utilizar para diversos alimentos o productos de consumo industriales, incluyendo los que requieren una estabilidad oxidativa mejorada. En aplicaciones de alimentos, los aceites se pueden utilizar para freír con la vida extendida a alta temperatura, o la vida de almacenamiento prolongada.

**[0095]** Cuando se usa el aceite para freír, la alta estabilidad del aceite puede permitir freír sin la adición de antioxidante y/o antiespumantes (por ejemplo, silicona). Como resultado de la omisión de los antiespumantes, los alimentos fritos pueden absorber menos aceite. Cuando se usa en aplicaciones de combustible, ya sea como un triglicérido o transformados en biodiesel o diesel renovable (véase, por ejemplo, WO2008/151149 WO2010/063032 y WO2011/150410), la alta estabilidad puede promover el almacenamiento durante largos periodos, o permitir el uso a elevadas temperaturas. Por ejemplo, el combustible hecho del aceite de alta estabilidad se puede almacenar para su uso en un generador de respaldo durante más de un año o más de 5 años. El aceite de freír puede tener un punto de humo de más de 200°C, y ácidos grasos libres de menos del 0,1%.

**[0096]** Los aceites poliinsaturados bajos se pueden mezclar con aceites de alimentos, incluidos las grasas estructurantes tales como los que forman cristales beta o beta prima, incluyendo los producidos como se describe a continuación. Estos aceites también se pueden mezclar con aceites líquidos. Si se mezcla con un aceite que tiene ácido linoleico, tal como aceite de maíz, el nivel de ácido linoleico de la mezcla puede aproximar el de altos aceites vegetales oleicos tales como aceites de alto oleico de girasol (por ejemplo, aproximadamente 80% oleico y 8% linoleico).

**[0097]** Las mezclas de aceite natural poliinsaturado bajo pueden ser interesterificadas con otros aceites. Por ejemplo, el aceite puede ser químicamente o enzimáticamente interesterificado. En una realización específica, un aceite poliinsaturado bajo de acuerdo con un ejemplo de la divulgación tiene ácido oleico de al menos 10% en su perfil de ácidos grasos y menos de un 5% en ácidos grasos poliinsaturados y es enzimáticamente interesterificado con un aceite de alta saturado (por ejemplo, aceite de soja hidrogenado u otro aceite con altos niveles de estearato) utilizando una enzima que es específica para posiciones de triacilglicerol sn-2 y sn-1. El resultado es un aceite que incluye un estearato-oleatestearato (SOS). Los métodos para la interesterificación son conocidos en la técnica; véase por ejemplo, "Enzymes in Lipid Modification," Uwe T. Bornschuer, ed., Wiley\_VCH, 2000, ISBN 3-527-30176-3.

[0098] Aceites de alta estabilidad se pueden utilizar como aceites de pulverización. Por ejemplo, frutos secos como pasas se pueden rociar con un aceite de alta estabilidad que tiene menos de 5, 4, 3, 2, o 1% poliinsaturados. Como resultado, la boquilla de pulverización utilizada se obstruirá con menos frecuencia debido a la acumulación de producto de polimerización u oxidación en la boquilla que de otro modo podrían resultar de la presencia de ácidos grasos poliinsaturados.

[0099] En una realización adicional, un aceite que es alto es SOS, tal como los descritos a continuación puede ser mejorado en la estabilidad por knockdown o regulación de desaturasa de ácidos grasos delta 12.

## V. CÉLULAS CON ACILTRANSFERASAS EXÓGENAS

[0100] En diversos ejemplos de la descripción y realizaciones de la presente invención como se indica en las reivindicaciones, uno o más genes que codifican una aciltransferasa (una enzima responsable de la condensación de un ácido graso con glicerol o un derivado del glicerol para formar un acilglicérido) pueden introducirse en una célula oleaginosa (por ejemplo, una célula de microalgas plásticas) con el fin de alterar la composición de ácidos grasos de un aceite natural producido por la célula. Los genes pueden codificar una o más de una aciltransferasa de glicerol-3-fosfato (GPAT), aciltransferasa de ácido lisofosfatídico (LPAAT), también conocida como 1- acilglicerol aciltransferasa-3-fosfato (AGPAT), fosfatasa de ácido fosfatídico (PAP), o aciltransferasa de diacilglicerol (DGAT) que transfiere un grupo acilo en la posición sn-3 de DAG, produciendo de este modo un TAG.

[0101] Los ácidos nucleicos recombinantes pueden estar integrados en un plásmido o cromosoma de la célula. Alternativamente, el gen codifica una enzima de una vía de lípidos que genera moléculas precursoras TAG a través de rutas independientes de acil-CoA graso separadas de las anteriores. Acil-ACP puede ser sustratos para GPAT plastidial y las enzimas LPAAT y/o GPAT mitocondriales y enzimas LPAAT. Entre otras enzimas capaces de incorporar grupos acilo (por ejemplo, a partir de los fosfolípidos de membrana) para producir TAG es aciltransferasa de diacilglicerol de fosfolípido (PDAT). Aún otras aciltransferasas, incluyendo aciltransferasa de lisofosfosfatidilcolina (LPCAT), aciltransferasa de lisofosfosfatidilserina (LPSAT), aciltransferasa de lisofosfosfatidiletanolamina (LPEAT), y aciltransferasa de lisofosfosfatidilinositol (LPIAT), están involucrados en la síntesis de fosfolípidos y remodelación que pueda afectar composición de triglicéridos.

[0102] El gen exógeno puede codificar una enzima de aciltransferasa que tiene especificidad preferencial para transferir un sustrato de acilo que comprende un número específico de átomos de carbono y/o un grado específico de saturación, se introduce en una célula oleaginosa a fin de producir un aceite enriquecido en un triglicérido regioespecífico dado. Por ejemplo, la aciltransferasa de ácido lisofosfatídico de coco (*Cocos nucifera*) se ha demostrado que prefiere C12: 0-sustratos de CoA reductasa sobre otros sustratos CoA de acilo (Knutzon et al, Plant Physiology, Vol 120, 1999, pp 739-746), mientras que la aciltransferasa 1-acil-sn-3-glicerol-3-fosfato de semillas de cártamo muestra preferencia por linoleoil-CoA y sustratos oleil-CoA reductasa sobre otros sustratos acil-CoA, incluyendo estearoil-CoA (Ichihara et al., European Journal of Biochemistry, Vol. 167, 1989, pp 339-347). Además, las proteínas aciltransferasa pueden demostrar la especificidad preferencial para uno o más sustratos de acil-CoA o acil-ACP de cadena corta, de cadena media, o de cadena larga, pero la preferencia sólo pueden ser encontrados donde, por ejemplo, un particular grupo de acilo de cadena media, está presente en la posición sn-1 o sn-3 del sustrato donante de ácido lisofosfatídico. Como resultado del gen exógeno, un aceite TAG puede ser producido por la célula en la que un ácido graso particular, se encuentra en la posición sn-2 en mayor que 20, 30, 40, 50, 60, 70, 90, o 90 % de las moléculas de TAG.

[0103] En algunas realizaciones de la invención, la célula hace que un aceite rico en TAG saturados-insaturados-saturados (sat-unsat-sat). TAG Sat-Unsat-Sat incluyen 1,3-dihexadecanoil-2-(9Z-octadecenoil)-glicerol (referido como 1-palmitoil-2-oleil-glicero-3-palmitoil), 1,3-dioctadecanoil-2-(9Z-octadecenoil)-glicerol (referido como 1-estearoil-2-oleil-glicero-3-estearoil), y 1-hexadecanoil-2-(9Z-octadecenoil)-3-octadecanoil-glicerol (referido como 1-palmitoil-2-oleil-glicero-3-estearoil). Estas moléculas se denominan más comúnmente como POP, SOS, y POS, respectivamente, donde 'P' representa ácido palmítico, 'S' representa ácido esteárico, y 'O' representa ácido oleico. Otros ejemplos de TAG saturados-no saturados-saturados incluyen MOM, LOL, MOL, COC y COL, donde 'M' representa ácido mirístico, 'L' representa ácido láurico, y 'C' representa ácido cáprico (C8: 0). Trisaturados, triglicéridos con tres grupos de acilo graso saturado, se buscan comúnmente para su uso en aplicaciones de alimentos para su mayor velocidad de cristalización que otros tipos de triglicéridos. Ejemplos de trisaturados incluyen PPM, PPP, LLL, SSS, CCC, PPS, PPL, PPM, LLP, y LLS. Además, la distribución regioespecífica de ácidos grasos en un TAG es un determinante importante del destino metabólico de grasa de la dieta durante la digestión y absorción.

[0104] De acuerdo con ciertas realizaciones de la presente invención, las células oleaginosas según se transforman con ácidos nucleicos recombinantes tal como se describe en las reivindicaciones a fin de producir aceites naturales que comprenden una cantidad elevada de un triglicérido regioespecífico especificado, por ejemplo 1-acil-2-oleil glicero-3-acilo, o 1-acil-2-láurico-glicero-3-acilo donde el ácido oleico o láurico respectivamente está en la posición sn-2, como resultado de ácidos nucleicos recombinantes introducidos. Alternativamente, ácidos caprílico, cáprico, mirístico, o palmítico pueden estar en la posición sn-2. La cantidad del triglicérido regioespecífica especificada presente en el aceite natural se puede incrementar en más de un 5%, mayor que 10%, mayor que 15%, mayor que 20%, mayor que

25%, mayor que 30%, mayor que 35%, mayor que 40%, mayor que 50%, mayor que 60%, mayor que 70%, mayor que 80%, mayor que 90%, mayor que 100-500%, o mayor que 500% en el aceite natural producido por el microorganismo sin los ácidos nucleicos recombinantes. Como resultado, el perfil de sn-2 del triglicérido celular puede tener mayor que 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, o 90% del ácido graso particular.

**[0105]** La identidad de las cadenas de acilo situadas en las posiciones estereoespecíficas o regioespecíficas distintas en un glicerolípido puede ser evaluada a través de uno o más métodos analíticos conocidos en la técnica (véase Luddy et al., J. Am. Oil Chem. Soc., 41, 693-696 (1964), Brockerhoff, J. Lipid Res, 6, 10-15 (1965), Angers y arilo, J. Am Oil Chem Soc, Vol. 76:4, (1999), Buchgraber et al., Eur. J. Lipid Sci. Technol., 106, 621-648 (2004)), o de acuerdo con los Ejemplos 1, 2 y 8 indicados a continuación.

**[0106]** La distribución de la posición de los ácidos grasos en una molécula de triglicérido puede ser influenciada por la especificidad de sustrato de aciltransferasas y por la concentración y el tipo de restos de acilo disponibles. Los ejemplos no limitantes de enzimas adecuadas para alterar la regioespecificidad de un triglicérido producida en un microorganismo recombinante se enumeran en las Tablas 1-4. Un experto en la técnica puede identificar proteínas adecuadas adicionales.

Tabla 1. Aciltransferasas de glicerol-3-fosfato y números de acceso de GenBank.

glicerol-3-fosfato aciltransferasa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	BAA00575
glicerol-3-fosfato aciltransferasa	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	EDP02129
glicerol-3-fosfato aciltransferasa	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Q886Q7
acil-(acil-portador-proteína): glicero 1-3-fosfato aciltransferasa	<i>Cucurbita moschata</i>	BAB39688
glicerol-3-fosfato aciltransferasa	<i>Elaeis guineensis</i>	AAF64066
glicerol-3-fosfato aciltransferasa	<i>Garcinia mangostana</i>	ABS86942
glicerol-3-fosfato aciltransferasa	<i>Gossypium hirsutum</i>	ADK23938
glicerol-3-fosfato aciltransferasa	<i>Jatrofa curcas</i>	ADV77219
plastidial glicerol-3-fosfato aciltransferasa	<i>Jatrofa curcas</i>	ACR61638
plastidial glicerol-fosfato aciltransferasa	<i>Ricinus communis</i>	EEF43526
glicerol-3-fosfato aciltransferasa	<i>Vicia faba</i>	AAD05164
glicerol-3-fosfato aciltransferasa	<i>Zea mays</i>	ACG45812

**[0107]** Aciltransferasas de ácido lisofosfatídico adecuadas para su uso con los microbios y métodos de la invención incluyen, sin limitación, los enumerados en la Tabla 2.

Tabla 2. Aciltransferasas de ácido lisofosfatídico y números de acceso GenBank

1-acil-sn-glicerol-3-fosfato aciltransferasa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AEE85783
1-acil-sn-glicerol-3-fosfato aciltransferasa	<i>Brassica juncea</i>	ABQ42862
1-acil-sn-glicerol-3-fosfato aciltransferasa	<i>Brassica juncea</i>	ABM92334
1-acil-sn-glicerol-3-fosfato aciltransferasa	<i>Brassica napus</i>	CAB09138
ácido lisofosfatídico aciltransferasa	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	EDP02300
ácido lisofosfatídico aciltransferasa	<i>Limnanthes alba</i>	AAC49185
1-acil-sn-glicerol-3-fosfato aciltransferasa (putativo)	<i>Limnanthes douglasii</i>	CAA88620
acil-CoA:sn-1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferasa	<i>Limnanthes douglasii</i>	ABD62751
1-acilglicerol-3-fosfato O-aciltransferasa	<i>Limnanthes douglasii</i>	CAA58239
1-acil-sn-glicerol-3-fosfato aciltransferasa	<i>Ricinus communis</i>	EEF39377

**[0108]** Aciltransferasas de diacilglicerol adecuadas para su uso con los microbios y los métodos de la invención incluyen, sin limitación, los enumerados en la Tabla 3.

Tabla 3. Aciltransferasas de diacilglicerol y números de acceso GenBank

diacilglicerol aciltransferasa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	CAB45373
diacilglicerol aciltransferasa	<i>Brassica juncea</i>	AAY40784
diacilglicerol aciltransferasa putativo	<i>Elaeis guineensis</i>	AEQ94187
diacilglicerol aciltransferasa putativo	<i>Elaeis guineensis</i>	AEQ94186
acil CoA:diacilglicerol aciltransferasa	<i>Glycine max</i>	AAT73629
diacilglicerol aciltransferasa	<i>Helianthus annuus</i>	ABX61081
acil-CoA:diacilglicerol aciltransferasa 1	<i>Olea europaea</i>	AAS01606
diacilglicerol aciltransferasa	<i>Ricinus communis</i>	AAR11479

**[0109]** Aciltransferasas de diacilglicerol fosfolípido adecuadas para su uso con los microbios y métodos de la invención incluyen, sin limitación, los enumerados en la Tabla 4.

Tabla 4. Aciltransferasas de diacilglicerol fosfolípido y números de acceso GenBank

fosfolípido:diacilglicerol aciltransferasa	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AED91921
putativofosfolípido:diacilglicerol aciltransferasa	<i>Elaeis guineensis</i>	AEQ94116
fosfolípido:diacilglicerol aciltransferasa 1	<i>Glycine max</i>	XP_003541296
fosfolípido:diacilglicerol aciltransferasa	<i>Jatrofa curcas</i>	AEZ56255
fosfolípido:diacilglicerol aciltransferasa	<i>Ricinus communis</i>	ADK92410
fosfolípido:diacilglicerol aciltransferasa	<i>Ricinus communis</i>	AEW99982

**[0110]** En realizaciones de la invención según se reivindica, genes conocidos o nuevos LPAAT se transforman en las células oleaginosas con el fin de alterar el perfil de ácidos grasos de los triglicéridos producidos por esas células, lo más notablemente mediante la alteración del perfil sn-2 de los triglicéridos. Por ejemplo, en virtud de expresar una LPAAT activa exógena en una célula oleaginosa, el porcentaje de ácidos grasos insaturados en la posición sn-2 se incrementa en 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% o más. Por ejemplo, una célula puede producir triglicéridos con 30% insaturados (que puede ser principalmente 18: 1 y 18: 2 y 18: 3 ácidos grasos) en la posición sn-2. En este ejemplo, la introducción de la actividad LPAAT aumenta los compuestos insaturados en la posición sn-2 en un 20% por lo que el 36% de los triglicéridos comprenden compuestos insaturados en la posición sn-2. Alternativamente, un LPAAT exógeno se puede utilizar para aumentar ácidos grasos de cadena media incluyendo cadenas mediadas saturadas tales como C8: 0, C10: 0, C12: 0, C14: 0 o C16: 0 restos en la posición sn-2. Como resultado, los niveles de cadena media en el perfil de ácidos grasos en general se pueden aumentar. Ejemplos 43 y 44 describen la alteración de los perfiles de sn-2 y de ácido graso en un microbio oleaginoso. Como puede verse a partir de estos ejemplos, la elección del gen LPAAT es importante en que los diferentes LPAAT pueden causar un cambio en la posición sn-2 y perfiles de ácidos grasos hacia diferentes longitudes de cadena de grupos acilo o niveles de saturación. Por ejemplo, el LPAAT del Ejemplo 43 aumenta ácidos grasos C10-C14 y el LPAAT del Ejemplo 44 provoca un aumento en los ácidos grasos C16 y C18. Como en estos ejemplos, la introducción de un LPAAT exógeno se puede combinar con introducción de tioesterasa acil-ACP exógena. La combinación de un LPAAT que prefiere la cadena media y un FatB que prefiere la cadena media se encontró para dar un efecto aditivo; el perfil de ácidos grasos se desplazó más hacia los ácidos grasos de cadena media más cuando estuvo presente que cuando sólo un gen exógeno FatB estaba presente tanto un LPAAT exógeno como un gen FatB. En una realización específica, el aceite producido por una célula que comprende un LPAAT específico exógeno de cadena media y (opcionalmente) un gen de tioesterasa de FatB acil-ACP puede tener un perfil de ácidos grasos exógenos con 40, 50, 60, 70, 80% o más de C8: 0, C10: 0, C12: 0, C14: 0, o C16: 0 ácidos grasos (por separado o en suma).

**[0111]** Las realizaciones específicas de la invención son una construcción de ácido nucleico, una célula que comprende la construcción de ácido nucleico, un método de cultivar la célula para producir un triglicérido, como el expuesto en las reivindicaciones, donde la construcción de ácido nucleico tiene un promotor unido operativamente a una secuencia de codificación novela LPAAT. La secuencia de codificación puede tener un codón de iniciación aguas arriba y un codón de terminación aguas abajo seguido por una secuencia 3 UTR. En una realización particular específica, el gen LPAAT tiene una secuencia de codificación con al menos 80, 85, 90, 95, o 98% de identidad de secuencia con cualquiera de los ADNc de SEQ ID NO: 80 a 85 o un fragmento funcional de la misma que incluye secuencias equivalentes en virtud de la degeneración del código genético. Los intrones pueden ser insertados en la secuencia también. Alternativamente, el gen codifica LPAAT para la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO 77-79 o fragmentos funcionales de los mismos. Las plantas que expresan la LPAAT novela se incluyen expresamente en las realizaciones y se pueden producir usando técnicas de ingeniería genética conocidas.

## VI. CÉLULAS CON ELONGASAS EXÓGENAS O ENZIMAS COMPLEJAS DE ELONGASA

**[0112]** En diversas realizaciones de la presente invención como se expone en las reivindicaciones, uno o más genes que codifican elongasas o componentes del complejo de elongación de acil-CoA graso se pueden introducir en una célula oleaginosa (por ejemplo, una célula de microalgas plastídicas) con el fin de alterar la composición de ácido

graso de la célula o de un aceite natural producido por la célula. Los genes pueden codificar una sintasa beta-cetoacil-CoA (también referida como 3-cetoacil sintasa, beta-cetoacil sintasa o KCS), una reductasa cetoacil-CoA, una deshidratasa de hidroxiaxil-CoA, reductasa de enoil-CoA, o elongasa. Las enzimas codificadas por estos genes son activos en el alargamiento de moléculas de acil-CoA liberados por tioesterasas acilo-ACP. Los ácidos nucleicos recombinantes pueden estar integrados en un plásmido o cromosoma de la célula. La célula es del género *Prototheca*.

**[0113]** Enzimas de sintasa y elongasa de beta-cetoacil-CoA adecuadas para su uso con los microbios y los métodos de la invención incluyen, sin limitación, los enumerados en la Tabla 5.

Tabla 5. Sintetas y elongasas de beta-cetoacil-CoA listadas con números de acceso de GenBank.

<p><i>Trypanosoma brucei</i> elongasa 3 (GenBank N° de acceso AAX70673), <i>Marchantia polymorpha</i> (GenBank N° de acceso AAP74370), <i>Trypanosoma cruzi</i> elongasa de ácido graso, putativo (N° de acceso de GenBank EFZ33366), <i>Nannochloropsis oculata</i> elongasa de ácido graso (GenBank N° de acceso ACV21066.1), <i>Leishmania donovani</i> elongasa de ácido graso, putativo (N° de acceso de GenBank CBZ32733.1), Glicina max 3-cetoacil-CoA sintasa 11- como (N° de acceso de GenBank XP_003524525.1), <i>Medicago truncatula</i> sintasa de beta-cetoacil-CoA (N° de acceso de GenBank XP_003609222), <i>Zea mays</i> elongasa de ácidos grasos (N° de acceso de GenBank ACG36525), <i>Gossypium hirsutum</i> sintasa de beta-cetoacil-CoA (N° de acceso de GenBank ABV60087), <i>Helianthus annuus</i> sintasa de beta-cetoacil-CoA (N° de acceso de GenBank ACC60973.1), <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ELO1 (N° de acceso de GenBank P39540), <i>Simmondsia chinensis</i> sintasa de beta-cetoacil-CoA (N° de acceso de GenBank AAC49186), <i>Tropaeolum majus</i> de elongasa de ácidos grasos putativo (N° de acceso de GenBank AAL99199, <i>Brassica napus</i> elongasa de ácido graso (N° de acceso de GenBank AAA96054)</p>
---

**[0114]** En una realización de la invención, un gen exógeno que codifica una sintasa de beta-cetoacil-CoA o enzima de elongasa que tiene especificidad preferencial para alargar un sustrato de acilo que comprende un número específico de átomos de carbono y/o un grado específico de saturación de la cadena de acilo se introduce en una célula oleaginosa a fin de producir una célula o un aceite enriquecido en ácidos grasos de longitud de cadena especificada y/o la saturación. Ejemplo 40 describe la ingeniería de cepa *Protothecas* en las que elongasas exógenas con preferencias para extender acil-CoA graso de cadena media se han sobreexpresado para aumentar la concentración de estearato. Ejemplos 42 y 54 describen la ingeniería de *Prototheca* en donde elongasas exógenas o sintetas de beta-cetoacil-CoA reductasa con preferencias para extender sustratos C18 y C20-CoA monoinsaturados y saturados se sobreexpresan para aumentar la concentración de ácido erúico.

**[0115]** En realizaciones específicas, la célula oleaginosa produce un aceite que comprende más de 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60 70, o 80% de ácido erúico y/o eicosenoico. Alternativamente, la célula produce un aceite que comprende 0,5-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80- 90, o 90-99% de ácido erúico o eicosenoico. La célula puede comprender ácidos recombinantes descritos anteriormente en relación con los aceites de alto oleico con una introducción adicional de una sintasa betacetoacil-CoA exógena que es activa en el alargamiento de oleoil-CoA. Como resultado de la expresión de la sintasa de betacetoacil-CoA exógena, la producción natural de ácido erúico o eicosenoico por la célula se puede aumentar en más de 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 70, 100, 130, 170 o 200 veces. El alto aceite erúico y/o eicosenoico también puede ser un aceite de alta estabilidad; por ejemplo, uno que comprende menos de 5, 4, 3, 2, o 1% de ácidos grasos poliinsaturados. En una realización específica, la célula es una célula de microalgas, opcionalmente cultivada heterótrofa. Como en las otras realizaciones, la grasa puede ser producida por ingeniería genética de una célula plastídica, incluyendo microalgas heterótrofas de phylum Chlorophyta, la clase Trebouxiophytae, el orden Chlorellales, o la familia Chlorellaceae. Preferiblemente, la célula es oleaginosa y capaz de acumular el aceite de al menos 40% en peso de células secas. La célula puede ser un heterótrofo obligado, tal como una especie de *Prototheca*, incluyendo *Prototheca moriformis* o *Prototheca zopfii*.

## VII. ACEITES/GRASAS REGIOESPECÍFICAS Y ESTEREOESPECÍFICAS

**[0116]** En una realización, una célula recombinante produce una grasa natural o aceite que tiene una formulación regioespecífica dada. Como resultado, la célula puede producir grasas de triglicéridos que tienen una tendencia a formar cristales de una forma polimórfica dada; por ejemplo, cuando se calienta a la temperatura de fusión por encima y luego se enfrió hasta por debajo de la temperatura de fusión de la grasa. Por ejemplo, la grasa puede tender a formar polimorfos cristalinos de la forma  $\beta$  o  $\beta'$  (por ejemplo, tal como se determina por análisis de difracción de rayos X), ya sea con o sin templar. Las grasas se pueden ordenar las grasas. En realizaciones específicas, la grasa puede formar directamente ya sea cristales  $\beta$  o  $\beta'$  al enfriarse; alternativamente, la grasa puede proceder a través de una forma  $\beta$  a una forma  $\beta'$ . Tales grasas pueden usarse como grasas de laminación, estructuración o recubrimiento para aplicaciones alimentarias. Las grasas naturales se pueden incorporar en el caramelo, chocolate negro o blanco, chocolate con sabor a confituras, helados, margarinas u otros productos para untar, rellenos de crema, pasteles, o de otros productos alimenticios. Opcionalmente, las grasas pueden ser semisólidas todavía libres de ácidos grasos trans producidos artificialmente. Tales grasas también pueden ser útiles en el cuidado de la piel y otros productos de consumo o industriales.

**[0117]** Como en los otros ejemplos de la divulgación, la grasa puede ser producida por ingeniería genética de una

célula plastídica, incluyendo microalgas heterótrofas de la phylum Chlorophyta, la clase Trebouxiophytae, el orden Chlorellales, o la familia Chlorellaceae. Preferiblemente, la célula es oleaginosa y capaz de acumular el aceite de al menos 40% en peso de células secas. La célula puede ser un heterótrofo obligado, tal como una especie de *Prototheca*, incluso *Prototheca moriformis* o *Prototheca zopfii*, de acuerdo con la invención. Las grasas también pueden producirse en las algas o plantas autotróficas. Opcionalmente, la célula es capaz de utilizar sacarosa para producir aceite y un gen de la invertasa recombinante puede ser introducido para permitir el metabolismo de la sacarosa, como se describe en las publicaciones PCT WO2008/151149, WO2010/06032, WO2011/150410, WO2011/150411, y la solicitud de patente internacional PCT/US12/23696. La invertasa puede optimizarse por codón e integrarse en un cromosoma de la célula, al igual que todos los genes mencionados aquí.

**[0118]** En una realización, la grasa natural tiene al menos 30, 40, 50, 60, 70, 80, o 90% de grasa de la estructura general [ácido graso saturado (sn-1)-ácido graso no saturado (sn-2)-ácido graso saturado (sn-3)]. Esto se indica a continuación en forma de grasa Sat-Insat-Sat. En una realización específica, el ácido graso saturado en esta estructura es preferiblemente estearato o palmitato y el ácido graso insaturado es preferiblemente oleato. Como resultado, la grasa puede formar principalmente cristales polimórficos  $\beta$  o  $\beta'$ , o una mezcla de estos, y tienen propiedades físicas correspondientes, incluidos los deseables para su uso en alimentos o productos de cuidado personal. Por ejemplo, la grasa puede fundirse a temperatura de la boca para un producto alimenticio o temperatura de la piel para una crema, loción o de otro producto de cuidado personal (por ejemplo, una temperatura de fusión de 30 a 40, o 32 a 35°C). Opcionalmente, las grasas pueden tener una estructura lamelar 2L o 3L (por ejemplo, tal como se determina por análisis de difracción de rayos X). Opcionalmente, la grasa puede formar esta forma polimórfica sin templar.

**[0119]** En una realización relacionada específica, un triglicérido de la grasa natural tiene una alta concentración de SOS (es decir, triglicéridos con estearato en el terminal de posiciones sn-1 y sn-3, con oleato en la posición sn-2 del esqueleto de glicerol). Por ejemplo, la grasa puede tener triglicéridos que comprenden al menos 50, 60, 70, 80 o 90% de SOS. En una realización, la grasa tiene triglicéridos de al menos 80% de SOS. Opcionalmente, al menos 50, 60, 70, 80 o 90% de los ácidos grasos con enlaces sn-2 son ácidos grasos insaturados. En una realización específica, al menos el 95% de los ácidos grasos con enlaces sn-2 son ácidos grasos insaturados. Además, el nivel de SSS (tri-estearato) puede ser de menos de 20, 10 o 5% y/o el nivel de C20: 0 ácido graso (ácido araquídico) puede ser menor que 6%, y, opcionalmente, mayor que 1% (por ejemplo, del 1 al 5%). Por ejemplo, en una realización específica, una grasa natural producida por una célula recombinante tiene al menos 70% de triglicéridos SOS con al menos 80% de restos de acilo graso insaturado sn-2. En otra realización específica, una grasa natural producida por una célula recombinante tiene TAG con al menos 80% SOS de triglicéridos y con al menos 95% de restos de acilo graso insaturado de sn-2. En aún otra realización específica, una grasa natural producida por una célula recombinante tiene TAG con al menos 80% SOS, con al menos 95% de restos de acilo graso insaturado de Sn-2, y 18 entre 1 a 6% de ácidos grasos C20.

**[0120]** En aún otra realización específica, la suma del estearato y palmitato porcentual en el perfil de ácidos grasos de la grasa natural es dos veces el porcentaje de oleato,  $\pm 10, 20, 30$  o 40% [por ejemplo,  $(\%P + \%S)/\%O = 2,0 \pm 20\%$ ]. Opcionalmente, el perfil de sn-2 de esta grasa es al menos 40%, y preferiblemente al menos 50, 60, 70, o 80% de oleato. También opcionalmente, esta grasa puede ser al menos 40, 50, 60, 70, 80, o 90% de SOS. Opcionalmente, la grasa comprende entre 1 a 6% de ácidos grasos C20.

**[0121]** En cualquiera de estas realizaciones, el alto contenido de grasa SatInsatSat puede tender a formar cristales  $\beta'$  polimórficos. A diferencia de las grasas vegetales previamente disponibles como manteca de cacao, la grasa SatUnsatsat producida por la célula puede formar cristales  $\beta'$  polimórficos sin revenido. En una realización, las formas polimórficas por calentamiento a la temperatura de fusión por encima y enfriamiento a menos que la temperatura de fusión para 3, 2, 1, ó 0,5 horas. En una realización relacionada, las formas polimórficas por calentamiento a por encima de 60°C y enfriamiento a 10°C durante 3, 2, 1, ó 0,5 horas.

**[0122]** En diversas realizaciones la grasa forma polimorfos de la forma  $\beta$ , forma  $\beta'$ , o ambos, cuando se calienta por encima de la temperatura de fusión y la enfría por debajo de la temperatura de fusión y, opcionalmente, de proceder a al menos 50% de equilibrio polimórfico dentro de 5, 4, 3, 2, 1, 0,5 horas o menos cuando se calienta hasta por encima de temperatura de fusión y luego se enfrió a 10°C. La grasa puede formar cristales a un ritmo más rápido que el de la manteca de cacao.

**[0123]** Opcionalmente, cualquiera de estas grasas puede tener menos de 2% en moles de diacilglicerol, o menos de 2% en moles de mono y diacilglicerol, en suma.

**[0124]** En una realización, la grasa puede tener una temperatura de fusión de entre 30-60°C, 30-40°C, 32-37°C, de 40-60°C o 45-55°C. En otra realización, la grasa puede tener un contenido de grasa sólida (SFC) de 40 a 50%, 15 a 25%, o menos de 15% a 20°C y/o tener un SFC de menos de 15% a 35°C.

**[0125]** La célula utilizada para hacer la grasa puede incluir ácidos nucleicos recombinantes que pueden funcionar para modificar la relación saturada a insaturada de los ácidos grasos en el triglicérido de células con el fin de favorecer la formación de grasa SatUnsatsat. Por ejemplo, un knockout o knock-down de desaturasa de gen de esteroil-ACP (SAD) puede utilizarse para favorecer la formación de estearato de más de oleato o expresión de una tioesterasa de

acil-ACP que prefiere la cadena media puede aumentar los niveles de saturados de cadena media exógena. Alternativamente un gen que codifica una enzima de SAD puede ser sobreexpresado para aumentar insaturados.

**[0126]** En una realización específica, la célula tiene ácidos nucleicos recombinantes que pueden funcionar para elevar el nivel de estearato en la célula. Como resultado, la concentración de SOS se puede aumentar. Ejemplo 9 demuestra que el perfil regioespecífico del microbio recombinante se enriquece para triglicéridos SatUnsatsat POP, POS y SOS como resultado de la sobreexpresión de una tioesterasa que prefiere *Brassica napus* C18:0. Una forma adicional de aumentar el estearato de una célula es para disminuir los niveles de oleato. Para las células que tienen niveles altos de oleato (por ejemplo, en exceso de un medio de los niveles de estearato) también se puede emplear ácidos nucleicos recombinantes o mutaciones genéticas clásicas operables para disminuir los niveles de oleato. Por ejemplo, la célula puede tener un knockout, knockdown, o mutación en uno o más alelos FATA, que codifican un oleato de liberar tioesterasa de acil-ACP, y/o uno o más alelos que codifica una desaturasa ACP estearoil (SAD). Ejemplo 35 describe la inhibición de la expresión del producto génico SAD2 usando ARN de horquilla para producir un perfil de ácidos grasos de 37% de estearato en *Prototheca moriformis* (UTEX 1435), mientras que la cepa de tipo salvaje produjo menos de 4% de estearato, una mejora de más de 9 veces. Por otra parte, mientras que las cepas del Ejemplo 35 se han diseñado para reducir la actividad SAD, suficiente actividad SAD permanece para producir suficiente oleato de hacer SOS, POP, y POS. Ver las profies TAG del Ejemplo 47. En ejemplos específicos, uno de los múltiples alelos que codifican SAD puede ser eliminado y/o uno o más alelos se regulan a la baja utilizando técnicas de inhibición tales como antisentido, ARNi o ARNsi, ARN de horquilla o una combinación de los mismos. En diversas realizaciones, la célula puede producir TAG que tienen 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, o 90 a aproximadamente 100% de estearato. En otras realizaciones, las células pueden producir TAG que son 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, o 90 a aproximadamente 100% de SOS. Opcionalmente, o además de la modificación genética, desaturasa estearoil ACP puede ser inhibida químicamente; por ejemplo, por adición de ácido estercúlico al cultivo celular durante la producción de aceite.

**[0127]** Sorprendentemente, knockout de un único alelo FATA se ha encontrado para aumentar la presencia de ácidos grasos C18 producidos en microalgas. Por la anulación de un alelo, o de otra manera suprimir la actividad del producto del gen FATA (por ejemplo, el uso de horquilla) de ARN, mientras que también la supresión de la actividad de la desaturasa de estearoil-ACP (usando técnicas descritas en este documento), los niveles de estearato en la célula se pueden aumentar.

**[0128]** Otra modificación genética para aumentar los niveles de estearato incluye aumentar una actividad de sintasa de cetooacil ACP (KAS) en la célula a fin de aumentar la tasa de producción de estearato. Se ha encontrado que en microalgas, aumentar la actividad KASII es eficaz en el aumento de la síntesis de C18 y particularmente eficaz en la elevación de los niveles de estearato en triglicéridos de células en combinación con el ADN recombinante eficaz en disminuir la actividad de SAD. Los ácidos nucleicos recombinantes que pueden funcionar para aumentar KASII (por ejemplo, un gen exógeno KASII) pueden también combinarse con un knockout o knockdown de un gen FatA, o con agujeros ciegos o knockdown tanto de un gen FatA y un gen SAD).

**[0129]** Opcionalmente, la célula puede incluir un estearato exógeno liberando tioesterasa acil-ACP, ya sea como una única modificación o en combinación con uno o más de otras modificaciones genéticas que aumentan estearato. Por ejemplo, la célula se puede diseñar para sobreexpresar una tioesterasa acil-ACP con preferencia para escindir C18:0-ACP. Ejemplo 9 describe la expresión de tioesterasas acil-ACP que prefiere C18:0 exógeno para aumentar estearato en el perfil de ácidos grasos de *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) de aproximadamente 3,7% a aproximadamente 30,4%. Ejemplo 41 proporciona ejemplos adicionales de tioesterasas de acil-ACP que prefiere C18:0 funcionan para elevar niveles de C18:0 en *Prototheca*. Introducción de la tioesterasa se puede combinar con un knockout o knockdown de uno o más tioesterasa de alelos de acil-ACP endógenos. Introducción de la tioesterasa también se puede combinar con la sobreexpresión de una elongasa o sintasa de beta-cetoacil-CoA. Además, uno o más genes exógenos (por ejemplo, codificación de SAD o KASII) pueden ser regulados a través de una condición ambiental (por ejemplo, mediante la colocación en unión operativa con un promotor regulable). En un ejemplo específico, el pH y/o el nivel de nitrógeno se utiliza para regular un promotor amt03. La condición ambiental puede entonces ser modulada para sintonizar la célula para producir la cantidad deseada de estearato de aparecer en los triglicéridos de células (por ejemplo, al doble de la concentración de oleato). Como resultado de estas manipulaciones, la célula puede exhibir un aumento de estearato de al menos 5, 10, 15, o 20 veces.

**[0130]** Como una modificación adicional solo o en combinación con las otras modificaciones de estearato crecientes, la célula puede comprender ácidos nucleicos recombinantes que pueden funcionar para expresar una elongasa o una sintasa de beta-cetoacil-CoA. Por ejemplo, la sobreexpresión de una tioesterasa de acil-ACP que prefiere C18:0 se pueden combinar con la sobreexpresión de una elongasa de extensión de cadena media o KCS para aumentar la producción de estearato en la célula recombinante. Uno o más de los genes exógenos (por ejemplo, codificando una tioesterasa, elongasa, o KCS) puede ser regulado a través de una condición ambiental (por ejemplo, mediante la colocación en unión operativa con un promotor regulable). En un ejemplo específico, el pH y/o el nivel de nitrógeno se utiliza para regular un promotor amt03. La condición ambiental puede entonces ser modulada para sintonizar la célula para producir la cantidad deseada de estearato de aparecer en los triglicéridos de células (por ejemplo, al doble de la concentración de oleato). Como resultado de estas manipulaciones, la célula puede exhibir un aumento de estearato de al menos 5, 10, 15, o 20 veces. Además de estearato, también se pueden producir ácidos araquídico, behénico,



lignocérico, cerótico.

**[0131]** En realizaciones específicas, debido a las manipulaciones genéticas de la célula para aumentar los niveles de estearato, la proporción de estearato de oleato en el aceite producido por la célula es de 3: 1  $\pm$  30% (es decir, en el intervalo de 2,7: 1 a 3,3: 1), 3: 1  $\pm$  20% o 3: 1  $\pm$  10%.

**[0132]** Alternativamente, la célula puede ser diseñada para favorecer la formación de SatUnsatsat donde Sat es palmitato o una mezcla de palmitato y estearato. En este caso la introducción de una tioesterasa de acil-ACP liberadora de palmitato exógeno puede promover la formación de palmitato. En esta realización, la célula puede producir triglicéridos, que son al menos 30, 40, 50, 60, 70, o 80% POP, o triglicéridos en la que la suma de POP, SOS, y POS es de al menos 30, 40, 50, 60, 70, 80, o 90% de triglicéridos de células. En otras realizaciones relacionadas, el nivel de POS es de al menos 30, 40, 50, 60, 70, 80, o 90% de los triglicéridos producidos por la célula.

**[0133]** En una realización específica, la temperatura de fusión del aceite es similar a la de la manteca de cacao (alrededor de 30-32°C). Los niveles de POP, POS y SOS pueden aproximar la manteca de cacao a aproximadamente 16, 38, y 23%, respectivamente. Por ejemplo, POP puede ser 16% $\pm$ 20%, POS puede ser 38% $\pm$ 20%, y SOS pueden ser 23% $\pm$ 20%. O, POP puede ser 16% $\pm$ 15%, POS puede ser 38% $\pm$ 15%, un SOS puede ser 23% $\pm$ 15%. O, POP puede ser 16% $\pm$ 10%, POS puede ser 38% $\pm$ 10%, un SOS puede ser 23% $\pm$ 10%.

**[0134]** Como resultado de los ácidos nucleicos recombinantes que aumentan estearato, una proporción del perfil de ácidos grasos puede ser ácido araquídico. Por ejemplo, el perfil de ácidos grasos puede ser de 0,01% a 5%, de 0,1 a 4%, o ácido araquídico 1 a 3%. Además, el perfil regioespecífico puede tener 0,01% a 4%, 0,05% a 3%, o 0,07% a 2% AOS, o puede tener 0,01% a 4%, 0,05% a 3%, o 0,07% a 2% AOA. Se cree que el AM y AOA pueden reducir la floración y la migración de grasa en confección que comprende las grasas de la presente invención, entre otros beneficios potenciales.

**[0135]** Además de las manipulaciones destinadas a aumentar estearato y/o palmitato, y para modificar los niveles SatUnsatsat, los niveles de ácidos grasos poliinsaturados pueden ser suprimidos, incluyendo como se describe anteriormente mediante la reducción de actividad delta de desaturasa de ácidos grasos 12 (por ejemplo, como la codificada por un gen Fad) y, opcionalmente, la suplementación del medio de crecimiento o regulación de la expresión FAD. Se ha descubierto que, en microalgas (como se evidencia por el trabajo en cepas *Prototheca*), ácidos grasos poliinsaturados se añaden preferentemente a la posición sn-2. Por lo tanto, para elevar el porcentaje de triglicéridos con oleato en la posición sn-2, la producción de ácido linoleico por la célula puede ser suprimida. Las técnicas descritas en el presente documento, en relación con aceites altamente estable a la oxidación, para inhibir o la ablación de genes de desaturasa de ácido graso (FAD) o productos génicos pueden ser aplicados con buen efecto hacia la producción de aceites SatUnsatsat mediante la reducción de ácidos grasos poliinsaturados en la posición sn-2. Como un beneficio adicional, estos aceites pueden mejorar la estabilidad oxidativa. Como también se describe en el presente documento, las grasas pueden producirse en dos etapas con ácidos grasos poliinsaturados suministrados o producidos por la célula en la primera etapa con un déficit de ácidos grasos poliinsaturados durante la etapa de la producción de grasa. La grasa producida puede tener un perfil de ácidos grasos que tienen menos de o igual a 15,10,7, 5, 4, 3, 2, 1, o 0,5% de ácidos grasos poliinsaturados. En una realización específica, el aceite/grasa producida por la célula tiene más que 50% SatUnsatsat, y, opcionalmente, más que 50% SOS, sin embargo, tiene menos del 3% poliinsaturados. Opcionalmente, ácidos grasos poliinsaturados pueden ser aproximados por la suma de área de ácido linoleico y ácido linolénico% en el perfil de ácidos grasos.

**[0136]** En una realización, la grasa natural es un sustituto de estearina de shea que tiene 65% a 95% de SOS y opcionalmente 0,001 a 5% SSS. En una realización relacionada, la grasa tiene 65% a 95% de SOS, 0,001 a 5% SSS, y triglicéridos opcionalmente 0,1 a 8% de ácido araquídico que contiene. En otra realización relacionada, la grasa tiene 65% a 95% SOS y la suma de SSS y SSO es menos de 10% o menos de 5%.

**[0137]** La preferencia regioespecífica de la célula puede ser aprendida usando el método de análisis descrito a continuación (Ejemplos 1-2, 8). A pesar del equilibrio de los ácidos grasos saturados e insaturados, como se describe anteriormente, es posible que las enzimas de la célula no colocan el ácido graso insaturado en la posición sn-2. En este caso, las manipulaciones genéticas pueden conferir la regioespecificidad deseada por (i) la reducción de la actividad de transferasas sn-2 endógenas específicas de acilo (por ejemplo, LPAAT) y/o (ii) introducir un LPAAT exógeno con la especificidad deseada (es decir, la introducción de oleato en sn-2). Cuando se introduce un LPAAT exógeno, preferiblemente el gen que codifica el LPAAT se integra en un cromosoma del huésped y está dirigido al retículo endoplásmico. En algunos casos, la célula huésped puede tener ambos alelos LPAAT específicos y no específicos y la supresión de la actividad de uno de estos alelos (por ejemplo, con un gen knockout) conferirán la especificidad deseada. Por ejemplo, los genes que codifican los LPAAT de SEQ ID NO: 78 y SEQ ID NO: 79 o un LPAAT que comprende al menos 90, 95, 98, o identidad de aminoácidos del 99% a cualquiera de estas secuencias se pueden utilizar para añadir oleato a la posición sn-2 con el fin de aumentar los niveles de TAG SatUnsatsat. Los genes pueden tener al menos 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, o la identidad de nucleótidos del 99% con cualquiera de las SEQ ID NO: 80 a 85 o secuencias equivalentes en virtud de la degeneración del código genético. Estos genes pueden manifestarse como constructos de ácidos nucleicos recombinantes, vectores, cromosomas o células huésped que comprenden estas secuencias o fragmentos funcionales de los mismos, que se pueden encontrar por la eliminación

sistemática de ácido nucleico a partir de las secuencias usando técnicas conocidas. Como resultado de la expresión de los genes, la cantidad de TAGs sat-insat-sat tales como SOS, POS, POP, o triglicéridos con ácidos grasos C8 a C16 en la posición sn-2 se puede aumentar en una célula huésped.

**[0138]** En un ejemplo, las grasas producidas por las células según la invención se utilizan para producir un producto de confitería, capa de caramelo u otro producto alimenticio. Como resultado, un producto alimenticio como una barra de chocolate o caramelo puede tener el "chasquido" (por ejemplo, cuando se rompe) de un producto similar producido usando manteca de cacao. La grasa utilizada puede estar en una forma polimórfica beta o tienden a una forma polimórfica beta. En una realización, un método incluye la adición de una grasa tal a un producto de confitería. Opcionalmente, la grasa puede ser una manteca de cacao equivalente por normativa CEE, teniendo SOS, ácido graso insaturado mayor que 65% menos de 45%, los ácidos de menos de 5% grasos poliinsaturados, ácido láurico menos de 1%, y menos de 2% de trans ácido graso. Las grasas también se pueden usar como extensores de la manteca de cacao, mejoradores, sustitutos, o agentes anti-florecedores, o como sustitutos de manteca de karité, incluidos en los productos alimenticios y de cuidado personal. Grasas de alta SOS producidas usando las células y métodos descritos aquí se pueden utilizar en cualquier aplicación o formulación que requiere la manteca de karité o fracción de karité. Sin embargo, a diferencia de la manteca de karité, grasas producidas por las realizaciones de la invención pueden tener bajas cantidades de insaponificables; por ejemplo, menos de 7, 5, 3, o 2% insaponificables. Además, la manteca de karité tiende a degradar rápidamente debido a la presencia de diacilglicéridos mientras que las grasas producidas por las realizaciones de la invención pueden tener bajas cantidades de diacilglicéridos; por ejemplo, a menos de 5, 4, 3, 2, 1, o 0,5% diacilglicéridos.

**[0139]** En un ejemplo de la descripción hay una grasa natural adecuada como un acortamiento, y, en particular, como un acortamiento de entrada. Por lo tanto, el acortamiento puede ser utilizado para hacer pasteles u otros alimentos de láminas múltiples. El acortamiento se puede producir usando métodos descritos en este documento para la producción de organismos manipulados y microalgas especialmente heterótrofas. En una realización, el acortamiento tiene una temperatura de fusión de entre 40 a 60°C y preferiblemente entre 45-55°C y puede tener un perfil de triglicéridos con 15 a 20% de ácidos grasos de cadena media (C8 a C14), 45-50% de ácidos saturados de cadena larga (grasos C16 y superior), y ácidos grasos insaturados de 30-35% (preferiblemente con más oleico que linoleico). El acortamiento puede formar cristales  $\beta'$  polimórficos, opcionalmente sin pasar a través de la forma  $\beta$  polimórfica. El acortamiento puede ser tixotrópico. El acortamiento puede tener un contenido de grasa sólida de menos de 15% a 35°C. En un ejemplo específico, no es un aceite natural adecuado como un acortamiento de entrada producido por una microalga recombinante, donde el aceite tiene una tensión de fluencia entre 400 y 700 o 500 y 600 Pa y un módulo de almacenamiento de más de  $1 \times 10^5$  Pa o  $1 \times 10^6$  Pa. (Véase el Ejemplo 46).

**[0140]** Un sistema de grasa sólido-líquido estructurado se puede producir usando los aceites de estructuración mediante la mezcla con un aceite que es un líquido a temperatura ambiente (por ejemplo, un aceite alto en triestearina o trioleína). El sistema de mezclado puede ser adecuado para uso en un alimento para untar, mayonesa, aderezo, acortamiento; es decir, por formación de una emulsión de aceite-agua-aceite. Las grasas de estructuración de acuerdo con las realizaciones descritas aquí, y especialmente las de alta SOS, se pueden mezclar con otros aceites/grasas para hacer una manteca de cacao equivalente, sustituto o extensor. Por ejemplo, una grasa natural que tiene más del 65% de SOS se puede mezclar con fracción media de palma para hacer una manteca de cacao equivalente.

**[0141]** En general, tales grasas altas Sat-Unsat-Sat o sistemas de grasa se pueden utilizar en una variedad de otros productos, incluyendo coberturas batidas, margarinas, pastas para untar, aderezos para ensaladas, productos horneados (por ejemplo pan, galletas, galletas saladas, magdalenas y pasteles), quesos, queso crema, mayonesa, etc.

**[0142]** En una realización específica, una grasa Sat-Unsat-Sat descrito anteriormente se utiliza para producir una margarina, extensión, o similares. Por ejemplo, una margarina se puede hacer de la grasa usando cualquiera de las recetas o métodos que se encuentran en las Patentes de EE.UU. N<sup>os</sup> 7.118.773, 6.171.636, 4.447.462, 5.690.985, 5.888.575, 5.972.412, 6.171.636, o publicaciones de patente internacional WO9108677A1.

**[0143]** En un ejemplo, una grasa comprende una grasa natural (por ejemplo, a partir de células de microalgas) opcionalmente mezclada con otra grasa y es útil para producir una propagación o margarina u otro producto alimenticio se produce por la célula manipulada genéticamente y tiene glicéridos derivados de ácidos grasos que comprende:

- (a) al menos 10% en peso de C18 a los ácidos grasos saturados C24,
- (b) que comprenden ácido esteárico y/o araquídico y/o behénico y/o lignocérico y
- (c) ácido oleico y/o linoleico, mientras que
- (d) la relación de ácido saturado C18/ácidos saturados (C20+C22+C24)  $\geq 1$ , preferiblemente  $\geq 5$ , más preferiblemente  $\geq 10$ , cuyos glicéridos contienen:
- (e)  $\leq 5\%$  en peso de ácido linolénico, calculado sobre el peso total de ácidos grasos
- (f)  $\leq 5\%$  en peso de ácidos grasos trans calculados sobre el peso total de ácido graso
- (g)  $\leq 75\%$  en peso, preferiblemente  $\leq 60\%$  en peso de ácido oleico en la posición sn-2: cuyos glicéridos se calculan sobre el peso total de glicéridos,
- (h)  $\geq 8\%$  en peso de triglicéridos HOH+HHO

(i)  $\leq 5\%$  en peso de triglicéridos trisaturados, y opcionalmente una o más de las siguientes propiedades:

(j) un contenido de grasa sólida de  $>10\%$  a  $10^\circ\text{C}$

(k) un contenido de grasa sólida  $\leq 15\%$  a  $35^\circ\text{C}$ ,

(l) un contenido de grasa sólida de  $>15\%$  a  $10^\circ\text{C}$  y un contenido de grasa sólida  $\leq 25\%$  a  $35^\circ\text{C}$ ,

(m) la relación de (HOH+HHO) y (HLH+HHL) triglicéridos es  $>1$ , y preferiblemente  $>2$ , donde H significa ácido graso C18-C24 saturado, O para el ácido oleico, y L para el ácido linoleico.

**[0144]** Opcionalmente, el contenido sólido de la grasa (% SFC) es de 11 a 30 a  $10^\circ\text{C}$ , 4 a 15 a  $20^\circ\text{C}$ , 0,5 a 8 a  $30^\circ\text{C}$ , y 0 a 4 a  $35^\circ\text{C}$ . Alternativamente, el SFC% de la grasa es de 20 a 45 a  $10^\circ\text{C}$ , 14 al 25 a  $20^\circ\text{C}$ , 2 a 12 a  $30^\circ\text{C}$ , y 0 a 5 a  $35^\circ\text{C}$ . En el ejemplo relacionado, el SFC% de la grasa es de 30 a 60 a  $10^\circ\text{C}$ , 20 a 55 a  $20^\circ\text{C}$ , de 5 a 35 a  $30^\circ\text{C}$ , y 0 a 15 a  $35^\circ\text{C}$ . El contenido de ácido graso C12-C16 puede ser  $\leq 15\%$  en peso. La grasa puede tener  $\leq 5\%$  en peso de diglicéridos disaturados.

**[0145]** En los ejemplos relacionados existe un diferencial, margarina u otro producto alimenticio elaborado con el aceite natural o mezcla de aceites naturales. Por ejemplo, la grasa natural puede ser utilizada para hacer una emulsión W/O comestible que comprende 70-20% en peso de una fase acuosa dispersa en 30-80 % en peso de una fase grasa que la fase grasa es una mezcla de 50-99 % en peso de un aceite vegetal triglicérido A y 1-50 % en peso de una grasa B de estructuración de triglicéridos, cuya grasa se compone de 5-100 % en peso de una grasa C de partida dura y hasta 95 % en peso de una grasa D, donde al menos 45 % en peso de los triglicéridos C de grasa de partida dura consisten en triglicéridos SatOSat y donde Sat indica un residuo de ácido graso con una cadena de carbono C18-C24 saturado y O indica un residuo de ácido oleico y con la condición de que cualquier material duro de grasa C que ha sido obtenido por fraccionamiento, se excluyen de hidrogenación, esterificación o interesterificación de la grasa. La grasa dura puede ser una grasa natural producida por una célula de acuerdo con los métodos descritos en este documento. En consecuencia, la grasa dura puede ser una grasa que tiene un perfil regioespecífico que tiene al menos 50, 60, 70, 80, o 90% de SOS. La emulsión W/O se puede preparar con métodos conocidos en la técnica, incluyendo en la Patente de Estados Unidos N° 7.118.773.

**[0146]** En una realización relacionada, la célula también expresa una enzima hidrolasa endógena que produce ácido ricinoleico. Como resultado, el aceite (por ejemplo, un aceite líquido o grasa estructurada) producido se puede emulsionar más fácilmente en una margarina, extensión, u otro producto alimenticio o producto no alimentario. Por ejemplo, el aceite producido se puede emulsionar sin usar emulsionantes añadidos o el uso de cantidades más bajas de tales emulsionantes. La solicitud de patente de EE.UU. N° 13/365.253, publicada como US 2012/0203018, describe métodos para expresar tales hidroxilasas en microalgas y otras células. En ejemplos específicos, un aceite natural comprende al menos 1, 2, o 5% SRS, donde S es el estearato y R es ácido ricinoleico.

**[0147]** En un ejemplo alternativo, un aceite natural que es un mimético de la manteca de cacao como se describió anteriormente se puede fraccionar para eliminar trisaturados (por ejemplo, triestearina y tripalmitina, SSP, y PPS). Por ejemplo, se ha encontrado que las microalgas diseñadas para disminuir la actividad SAD para aumentar la concentración SOS crea un aceite que se puede fraccionar para eliminar trisaturado. Véase el Ejemplo 47. En ejemplos específicos, la temperatura de fusión del aceite natural fraccionado es similar a la de la manteca de cacao (alrededor de  $30-32^\circ\text{C}$ ). Los niveles de POP, POS y SOS pueden aproximar la manteca de cacao a aproximadamente 16, 38, y 23%, respectivamente. Por ejemplo, POP puede ser  $16\% \pm 20\%$ , POS puede ser  $38\% \pm 20\%$ , un SOS puede ser  $23\% \pm 20\%$ . O, POP puede ser  $16\% \pm 15\%$ , POS puede ser  $38\% \pm 15\%$ , un SOS puede ser  $23\% \pm 15\%$ . O, POP puede ser  $16\% \pm 10\%$ , POS puede ser  $38\% \pm 10\%$ , un SOS puede ser  $23\% \pm 10\%$ . Además, los niveles de triestearina pueden ser menos del 5% de los triacilglicéridos.

## VIII. ACEITES DE CADENA MEDIA ALTOS

**[0148]** En una realización de la presente invención, la célula tiene ácidos nucleicos recombinantes, como se reivindica operable para elevar el nivel de ácidos grasos de cadena media (por ejemplo, C8: 0, C10: 0, C12: 0, C14: 0, o C16: 0 ácidos grasos) en la célula o en el aceite de la célula. Una forma de aumentar los niveles de ácidos grasos de cadena media en la célula o en el aceite de la célula es diseñar una célula para expresar una tioesterasa exógena acil-ACP que tiene actividad hacia sustratos acil-ACP grasos de cadena media (por ejemplo, uno codificado por un gen FatB), ya sea como una única modificación o en combinación con una o más de otras modificaciones genéticas. De conformidad con las reivindicaciones, una modificación genética adicional para aumentar el nivel de ácidos grasos de cadena media en la célula o el aceite de la célula es la expresión de un gen de la aciltransferasa de ácido lisofosfatídico exógeno que codifica una aciltransferasa de ácido lisofosfatídico activa (LPAAT) que cataliza la transferencia de un grupo acilo graso de cadena media en la posición sn-2 de un acilgliceroéster sustituido. En una realización relacionada específica, tanto una tioesterasa acil-ACP exógeno y LPAAT se expresan de forma estable en la célula. En una realización, los ácidos nucleicos recombinantes se introducen en una célula oleaginosa (y especialmente en una célula microbiana plasmática) que causa la expresión de una tioesterasa exógena a mitad de cadena específica y un LPAAT exógeno que cataliza la transferencia de un grupo de acilo graso de cadena media a la posición sn-2 de un acilgliceroéster sustituido. Como resultado, la célula se puede hacer para aumentar el porcentaje de un ácido graso de cadena media en las TAG que produce por 10, 20 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 veces, o más. Introducción del LPAAT exógeno puede aumentar ácidos grasos de cadena media en la posición sn-2 de 1,2, 1,5, 1,7, 2, 3, 4 veces o más en comparación con la introducción de una tioesterasa de acil-ACP que prefiere cadena media exógena. En una

realización, el ácido graso de cadena media es mayor que 30, 40, 50 60, 70, 80, o 90% de los ácidos grasos TAG producidos por la célula. En diversas realizaciones, el ácido graso de cadena media es láurico, mirístico, palmítico o. Ejemplos 3, 43 y 44 describen la expresión de LPAATs de plantas en células de microalgas con alteraciones resultantes en los perfiles de ácidos grasos. Como en los ejemplos, las células también pueden expresar una

5 tioesterasa acil-ACP exógeno (que también puede ser de una planta) con una preferencia por una longitud de cadena dada acil-ACP graso. Por ejemplo, una célula de microalgas puede comprender genes exógenos que codifican un LPAAT y una tioesterasa de acil-ACP que preferentemente escinden ácidos grasos C8, C10, C12, C14, C8-C12, o C8-C10. En una realización específica, dicha célula es capaz de producir un aceite natural que comprende un perfil de ácidos grasos de 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80 -90, o 90-99%, >20%, >30%, >40%, >50%,

10 >60%, >70%, >80% o >90% ácidos grasos C8, C10, C12, C14, C8-C12 o C8-C10. Otros LPAAT pueden escindir preferentemente ácidos grasos C16 o C18 (véase el Ejemplo 44). Además la manipulación genética de la ruta de desaturasa de ácido graso (por ejemplo, como se describe *infra*) puede aumentar la estabilidad de los aceites.

**[0149]** Cualquiera de estos aceites naturales se pueden interesterificar. La interesterificación puede, por ejemplo, ser utilizada para bajar la temperatura de fusión o del punto de fluidez del aceite. En un ejemplo específico, el aceite natural comprende al menos 50% de la suma de los ácidos cáprico y caprílico y puede interesterificarse para reducir el punto de fluidez y/o la viscosidad cinemática. Un tal aceite (natural o interesterificado) puede ser, opcionalmente, un aceite de alta estabilidad que comprende, por ejemplo, menos de 2% de ácidos grasos poliinsaturados.

**[0150]** Además de la expresión de un LPAAT exógeno, la célula puede comprender ácidos nucleicos recombinantes que son operables para expresar una enzima KASI o KASIV exógena y, opcionalmente, para disminuir o eliminar la actividad de un KASII, que es particularmente ventajoso cuando se expresa una mitad de la cadena que prefiere tioesterasa acil-ACP. Ejemplo 37 describe la ingeniería de células *Prototheca* para sobreexpresar enzimas KASI o KASIV en conjunción con una mitad de la cadena prefiriendo tioesterasa de acil-ACP para generar cepas en las que la producción de ácidos grasos C10-C12 es sobre 59% de ácidos grasos totales. La producción a mitad de cadena también se puede aumentar mediante la supresión de la actividad de KASI y/o KASII (por ejemplo, usando un knockout o knockdown). Ejemplo 38 detalla el knockout cromosómico de diferentes alelos de *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) KASI en conjunción con la sobreexpresión de una mitad de la cadena prefiriendo tioesterasa de acil-ACP para lograr perfiles de ácidos grasos que son aproximadamente 76% o 84% de ácidos grasos C10-C14. Ejemplo 39 proporciona células recombinantes y aceites caracterizados por ácidos grasos de cadena media elevados como resultado de la expresión de polinucleótidos de la horquilla de ARN KASI. Además de cualquiera de estas modificaciones, la producción de ácido graso insaturado o poliinsaturado puede ser suprimida (por ejemplo, por knockout o knockdown) de una enzima SAD o FAD.

**[0151]** En una realización particular, una célula recombinante produce TAG que tiene ácido láurico 40% o más. En otra realización relacionada, una célula recombinante produce TAG que tiene un perfil de ácidos grasos de 40% o más de ácido mirístico, caprílico, cáprico, o palmítico. Por ejemplo, una célula recombinante clorófito oleaginosa puede producir 40% de ácido láurico o mirístico en un aceite que conforma 40, 50, o 60% o más del peso en seco de la célula.

**[0152]** En una realización específica, una célula recombinante comprende ácidos nucleicos que pueden funcionar para expresar un producto de un gen exógeno que codifica una aciltransferasa de ácido lisofosfatídico que cataliza la transferencia de un grupo de acilo graso a mitad de la cadena a la posición sn-2 de un acilgliceroéster sustituido y ácidos nucleicos operables para expresar un producto de un gen exógeno de tioesterasa de acil-ACP que codifica una tioesterasa acil-ACP activo que cataliza la escisión de los ácidos grasos de cadena media a partir de ACP. Como resultado, en una realización, el aceite producido se puede caracterizar por un perfil de ácidos grasos elevado en ácidos grasos C10 y C12 y la reducción en C16, C18, y C18: ácidos grasos 1 como resultado de los ácidos nucleicos recombinantes. Véase el Ejemplo 3, en donde la sobreexpresión de una tioesterasa de acil-ACP *Cuphea wrightii* y un gen de LPAAT *Cocos nucifera* aumentó el porcentaje de ácidos grasos C12 de aproximadamente 0,04% en las células no transformadas a aproximadamente 46% y aumentó el porcentaje de ácidos grasos C10 de aproximadamente 0,01% en las células no transformadas a aproximadamente 11%. En realizaciones relacionadas, el aumento de la producción de ácidos grasos de cadena media es mayor que 70%, de 75-85%, de 70-90%, de 90-200%, de 200-300%, de 300-400%, de 400- 500%, o mayor que 500%.

**[0153]** Longitud de media cadena también se puede reducir por la sobreexpresión de una tioesterasa acil-ACP específica a C18. Los ácidos nucleicos recombinantes operables para sobreexpresar un C18 u otra tioesterasa de acil-ACP se pueden usar solo o en combinación con las otras construcciones descritas aquí para reducir aún más la longitud de cadena media. Entre otros usos, los aceites producidos se pueden utilizar como sustituto de la manteca de cacao/grasa de leche. Véase el Ejemplo 45 y de la discusión de la Fig. 17. En una realización, una de las células productoras de cadena media altas descritas anteriormente se modifica posteriormente para producir un aceite poliinsaturado bajo al noquear o derribar una o más desaturasas de acilo graso, como se describe anteriormente en la sección IV. En consecuencia, el aceite producido puede tener la característica de alta estabilidad mencionada en esa sección o en los Ejemplos correspondientes. En una realización específica, la célula produce un aceite que comprende ácidos grasos de cadena media mayor que 30% y 5% o menos poliinsaturados. En una realización relacionada, la célula produce un aceite que comprende ácidos grasos de cadena media mayor que 40% y 4% o menos poliinsaturados. En una realización relacionada adicional, la célula produce un aceite que comprende ácidos grasos de cadena media mayor que 50% y el 3% o menos poliinsaturados.

**[0154]** Los aceites de alta cadena media o ácidos grasos derivados de la hidrólisis de estos aceites pueden ser particularmente útiles en los alimentos, el combustible y aplicaciones oleoquímicas incluyendo la producción de lubricantes y agentes tensioactivos. Por ejemplo, los ácidos grasos derivados de las células pueden ser esterificados, agrietados, reducidos a un aldehído o alcohol, aminados, sulfatados, sulfonados, o sometidos a otro proceso químico conocido en la técnica.

**[0155]** En algunas realizaciones, el aceite natural se interesterifica y la viscosidad cinemática del aceite natural interesterificado es menor que 30, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1 centiStokes ( $3 \times 10^{-5}$ ,  $2 \times 10^{-5}$ ,  $1,5 \times 10^{-5}$ ,  $1 \times 10^{-5}$ ,  $0,9 \times 10^{-5}$ ,  $0,8 \times 10^{-5}$ ,  $0,7 \times 10^{-5}$ ,  $0,6 \times 10^{-5}$ ,  $0,5 \times 10^{-5}$ ,  $0,4 \times 10^{-5}$ ,  $0,3 \times 10^{-5}$ ,  $0,2 \times 10^{-5}$  o  $0,1 \times 10^{-5}$  m<sup>2</sup>/s) a 40°C. En algunas realizaciones, la viscosidad cinemática es menos de 3 centiStokes ( $0,3 \times 10^{-5}$  m<sup>2</sup>/s) a 40°C. En algunas realizaciones, el punto de vertido de un aceite natural interesterificado es inferior a, 5°C, 0°C, -10°C, -12°C, -15°C, -20°C, -25°C, -30°C, -35°C, -40°C, -45°C, o -50°C. En algunas realizaciones, el punto de fluidez es inferior a -10°C. En algunas realizaciones, el punto de fluidez es inferior a -20°C.

**[0156]** Ejemplo 53 describe el uso de un gen FatB de planta en algas para producir aceites en microalgas con mayor que 60% de miristato. En una realización, un gen que codifica una proteína que tiene al menos 90, 95, 96, 97, 98, o 99% de identidad de aminoácidos con la SEQ ID NO: 87 o SEQ ID NO: 89 se utiliza, en combinación con una mitad de cadena preferida LPAAT como se describe anteriormente.

## IX. ACEITE OLEICO/PALMÍTICO ALTO

**[0157]** En otro ejemplo, hay un alto aceite oleico con ácido aproximadamente el 60% oleico, ácido palmítico 25% y, opcionalmente, 5% poliinsaturados o menos. El alto aceite oleico puede producirse usando los métodos descritos en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 13/365.253. Por ejemplo, la célula puede tener ácidos nucleicos que pueden funcionar para suprimir una tioesterasa acil-ACP (por ejemplo, knockout o knockdown de un gen que codifica FATA), mientras que también expresa un gen que aumenta la actividad KASII. La célula puede tener modificaciones adicionales para inhibir la expresión de desaturasa de ácido graso delta 12, incluyendo la regulación de la expresión génica como descrito anteriormente. Como resultado, los ácidos grasos poliinsaturados pueden ser menos o igual que 5, 4, 3, 2, o 1% de área.

## X. ACEITE DE BAJOS SATURADOS

**[0158]** En una realización, un aceite natural se produce a partir de una célula recombinante. El aceite producido tiene un perfil de ácidos grasos que tiene menos que 4%, 3%, 2%, 1% (% de área), ácidos grasos saturados. En una realización específica, el aceite tiene 0,1 a 3,5% de ácidos grasos saturados. Algunos de estos aceites se pueden utilizar para producir un alimento con cantidades insignificantes de ácidos grasos saturados. Opcionalmente, estos aceites pueden tener perfiles de ácidos grasos que comprenden ácido oleico de al menos 90% o ácido oleico de al menos 90% con ácidos grasos poliinsaturados de al menos 3%. En una realización, un aceite natural producida por una célula recombinante comprende ácido oleico de al menos 90%, al menos 3% de la suma de ácido linoleico y ácido linolénico y tiene ácidos grasos saturados a menos de 3,5%. En una realización relacionada, un aceite natural producida por una célula recombinante comprende ácido oleico de al menos 90%, al menos 3% de la suma de ácido linoleico y ácido linolénico y tiene ácidos grasos saturados a menos de 3,5%, la mayoría de los ácidos grasos saturados como compuesta de longitud de la cadena 10 a 16. Estos aceites pueden ser producidos por las células recombinantes oleaginosas que incluyen pero no se limitan a los descritos aquí y en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 13/365.253. Por ejemplo, la sobreexpresión de una enzima KASII en una célula con un SAD altamente activo puede producir un alto aceite oleico con menos de o igual a 3,5% de saturados. Opcionalmente, una tioesterasa acil-ACP-oleato específico también se sobreexpresa y/o una tioesterasa endógena que tiene una propensión para hidrolizar cadenas de acilo de menos de C18 noqueado o suprimido. La tioesterasa acil-ACP-oleato específico puede ser un transgén con baja actividad hacia ACP-palmitato y ACP-estearato de manera que la relación de ácido oleico con respecto a la suma de ácido palmítico y ácido esteárico en el perfil de ácidos grasos del aceite producido es mayor de 3, 5, 7 ó 10. Alternativamente, o además, un gen FATA puede ser eliminado o derribado, como en el Ejemplo 36 a continuación. Un gen FATA puede ser eliminado o derribado y un KASII exógeno sobreexpresa. Otra modificación opcional es aumentar KASI y/o actividad KASIII, que puede suprimir adicionalmente la formación de ácidos grasos saturados de cadena más corta. Opcionalmente, uno o más aciltransferasas (por ejemplo, un LPAAT) que tienen especificidad para la transferencia de restos de acilo graso insaturado a un glicerol sustituido también se sobreexpresa y/o una aciltransferasa endógena es eliminado o atenuado. Una modificación opcional adicional es para aumentar la actividad de las enzimas de KCS que tienen especificidad para alargar ácidos grasos insaturados y/o una KCS endógena que tiene especificidad para alargar ácidos grasos saturados es eliminado o atenuado. Opcionalmente, oleato se aumenta a expensas de la producción de linoleato por knockout o knockdown de una desaturasa de ácido graso delta 12; por ejemplo, utilizando las técnicas de la sección IV de esta solicitud de patente.

**[0159]** Como se ha descrito en el Ejemplo 51, los niveles de grasas saturadas pueden reducirse también mediante la introducción de un gen exógeno que desatura el ácido palmítico a ácido palmitoleico. Ejemplos de genes adecuados para uso en las células oleaginosas se encuentran en las plantas, incluyendo *Macfadyena unguis* (uña de gato), *Macadamia integrifolia* (nuez de macadamia) y *Hippophae rhamnoides* (espino amarillo). SAD exógenos o endógenos

variantes que desaturan palmitoil-ACP también se pueden utilizar y se describen adicionalmente en el Ejemplo 51. Opcionalmente, el gen PAD o SAD tiene al menos 95% de identidad de secuencia de aminoácidos con el producto del gen descrito en el Ejemplo 51. Esta modificación puede usarse solo, o en combinación con modificaciones de oleato crecientes tales como los descritos inmediatamente antes, en la sección IX y en los ejemplos, incluyendo knockout o knockdown de uno o más alelos FATA endógenos y/o sobreexpresión de KASII. En una realización, una célula oleaginosa tal como microalgas oleaginosas tiene una combinación de (i) un knockout o knockdown FATA con (ii) la expresión de un gen de PAD exógeno (esto también podría ser una variante SAD con la actividad de PAD, véase el Ejemplo 55) y/o una mutación en un gen endógeno SAD para dar actividad de PAD. Tal como una célula puede comprender además un endógeno sobreexpresado o gen KASII exógeno. De conformidad con cualquiera de estas realizaciones de la invención, la célula oleaginosa produce un aceite que tiene un perfil de ácidos grasos con 1-2, 2-3, 3-4, 5-6, 7-8, 9-10, 10-15, 15-20, 20-30, 30-40, 40-60, ácido palmitoleico 60-70, 70-80, 80-90, o 90-100 por ciento de área. En una realización específica, la célula produce ácido oleico mayor que 50%, ácido palmitoleico superior al 1%, y 3,5% de área o menos de ácidos grasos saturados.

**[0160]** Además de las modificaciones genéticas anteriores, el aceite saturado bajo puede ser un aceite de alta estabilidad en virtud de cantidades bajas de ácidos grasos poliinsaturados. Métodos y caracterizaciones de alta estabilidad, los aceites bajos poliinsaturados son descritos en la sección anterior bajo el título aceites poliinsaturados bajos, incluyendo el método para reducir la actividad de desaturasa  $\Delta 12$  de ácido graso endógeno. En una realización específica, un aceite es producido por una célula microbiana oleaginosa que tiene una vía de síntesis de ácidos grasos de tipo II y no tiene ácidos grasos saturados de más de 3,5% y tampoco tiene ácidos grasos poliinsaturados de más de 3%. En otra realización específica, el aceite no tiene ácidos grasos saturados de más de 3% y tampoco tiene ácidos grasos poliinsaturados de más de 2%. En otra realización específica, el aceite no tiene ácidos grasos saturados de más de 3% y tampoco tiene ácidos grasos poliinsaturados de más de 1%.

**[0161]** El aceite bajo saturado y aceite bajo saturado/de alta estabilidad se pueden mezclar con aceites menos costosos para llegar a un nivel de ácido graso saturado dirigido a menos gasto. Por ejemplo, un aceite con grasas saturadas 1% puede mezclarse con un aceite que tiene 7% de grasa saturada (por ejemplo, aceite alto en oleico de girasol) para dar un aceite que tiene 3% de grasa saturada.

**[0162]** Aceites producidos de acuerdo con realizaciones de la presente invención se pueden utilizar en las industrias de combustibles de transporte, oleoquímicas, y/o de alimentos y cosméticos, entre otras aplicaciones. Por ejemplo, la transesterificación de los lípidos puede producir ésteres de ácidos grasos de cadena larga útiles como biodiesel. Otros procesos enzimáticos y químicos pueden ser adaptados para producir ácidos grasos, aldehídos, alcoholes, alcanos y alquenos. En algunas aplicaciones, diesel renovable, combustible de aviación, u otros compuestos de hidrocarburos se producen. La presente descripción también proporciona métodos para el cultivo de microalgas para una mayor productividad y una mayor producción de lípidos, y/o para más producción rentable de las composiciones descritas en este documento. Los métodos descritos aquí permiten la producción de aceites a partir de cultivos de células plásticas en gran escala; por ejemplo, 1.000, 10.000, 100.000 litros o más. En una realización, un aceite extraído de la célula tiene 3,5%, 3%, 2,5%, o 2% de grasa saturada o menos y se incorpora en un producto alimenticio. El producto alimenticio acabado tiene grasas saturadas 3,5, 3, 2,5, o 2% o menos.

## XI. MIMÉTICOS DE MEZCLA DE MANTECA DE CACAO/GRASA DE LECHE

**[0163]** En ciertas realizaciones, la célula produce un aceite natural que tiene un contenido dependiente de la temperatura de grasa sólida ("Curva SFC") que se aproxima a una mezcla de manteca de cacao y grasa de leche. Tales aceites se pueden usar cuando se podría utilizar la mezcla de manteca de cacao/grasa de leche; por ejemplo, en chocolates otros dulces, helados u otros postres helados, pasteles, o de masa, incluyendo para panes rápidos, u otros productos horneados. Los aceites pueden inhibir la floración, mejorar el sabor, mejorar la textura, o reducir los costos. En un ejemplo específico, el aceite natural se aproxima. Por consiguiente, un ejemplo de la divulgación está utilizando un aceite natural de una célula de microalgas recombinante para sustituir una mezcla de manteca de cacao/grasa de leche en una receta.

**[0164]** La Figura 17 muestra un gráfico de contenido de % de grasa sólida para varios aceites como sigue (a) aceite RBD P. moriformis sin ingeniería vía de lípidos, (b) manteca de cacao brasileña + 25% de grasa, (c) tres réplicas de aceite RBD P. moriformis a partir de una cepa que expresa los ácidos nucleicos de horquilla que reducen los niveles de un alelo SAD reduciendo así el ácido oleico y el aumento de ácido esteárico en el perfil de TAG, (d) aceite RBD P. moriformis a partir de una cepa que sobreexpresa una OTE (oleoil tioesterasa acil-ACP endógeno, ver Ejemplo 45), (e) de cacao de Malasia mantequilla + 25% de grasa, y (f) manteca de cacao de Malasia. Los valores de grasa de leche de manteca de cacao y manteca de cacao son valores de la literatura (Ac Bailey's Industrial Oils and Fat Products, 6<sup>o</sup> ed.)

**[0165]** En una realización de la presente invención, un aceite natural que es similar en propiedades térmicas a una mezcla de 75% de manteca de cacao/25% de grasa de leche producida por una de microalgas u otra célula se describe en las reivindicaciones. La célula comprende ácidos nucleicos recombinantes que pueden funcionar para alterar el perfil de ácidos grasos de los triglicéridos producidos por la célula con el fin de que el aceite tiene un contenido de grasa sólida (por ejemplo, tal como se determina por RMN) de  $38\% \pm 30\%$  a  $20^\circ\text{C}$ ,  $32\% \pm 30\%$  a  $25^\circ\text{C}$ ,  $17\% \pm 30\%$  a

30°C, y menos del 5%±30% a 35°C. Por el bien de la claridad, ±10% se refiere a por ciento de la SFC (por ejemplo, 30% de 5% SFC es 1,5% SFC por lo que el rango es de 3,5 a 6,5% SFC a 35°C). En realizaciones relacionadas, el aceite tiene un contenido de grasa sólida (por ejemplo, tal como se determina por RMN) del 38%±20% a 20°C, 32%±20% a 25°C, 17%±20% a 30°C, y menos del 5%±20% a 35°C o el aceite tiene un contenido de grasa sólida (por ejemplo, tal como se determina por RMN) del 38%±10% a 20°C, 32%±10% a 25°C, 17%±10% a 30°C, y menos del 5%±10% a 35°C.

## XII. COMPONENTES DE ACEITE MENORES

[0166] Los aceites producidos de acuerdo con los métodos anteriores en algunos casos se realizan utilizando una célula huésped de microalgas. Como se describió anteriormente, la microalga puede, sin limitación, clasificarse en Chlorophyta, Trebouxiophyceae, Chlorellales, Chlorellaceae, o Chlorophyceae. Se ha encontrado que las microalgas de Trebouxiophyceae pueden distinguirse de los aceites vegetales en función de sus perfiles de esteroides. Aceite producido por *Chlorella protothecoides* fue encontrado para producir esteroides que parecían ser brasicasterol, ergosterol, campesterol, estigmasterol, y β-sitosterol, cuando se detecta mediante GC-MS. Sin embargo, se cree que todos los esteroides producidos por *Chlorella* tienen C24β estereoquímica. Por lo tanto, se cree que las moléculas detectadas como campesterol, estigmasterol, y β-sitosterol, son en realidad 22,23-dihidrobrasicasterol, proferasterol y clionasterol, respectivamente. Por lo tanto, los aceites producidos por las microalgas se ha descrito anteriormente se pueden distinguir de los aceites vegetales por la presencia de esteroides con C24β estereoquímica y la ausencia de C24α estereoquímica en los esteroides presentes. Por ejemplo, los aceites producidos pueden contener 22,23-dihidrobrasicasterol mientras que carecen de campesterol; contienen clionasterol, mientras que carecen de β-sitosterol, y/o contienen poriferasterol mientras que carecen de estigmasterol. Alternativamente, o además, los aceites pueden contener cantidades significativas de Δ<sup>7</sup>-poriferasterol.

[0167] En una realización, los aceites proporcionados en este documento no son los aceites vegetales. Los aceites vegetales son aceites extraídos de plantas y semillas de plantas. Los aceites vegetales se pueden distinguir de los aceites no vegetales proporcionados en este documento sobre la base de su contenido de aceite. Una variedad de métodos para analizar el contenido de aceite se puede emplear para determinar la fuente del aceite o si se ha producido la adulteración de un aceite proporcionado en este documento con un aceite de un origen diferente (por ejemplo, plantas). La determinación se puede hacer sobre la base de uno o una combinación de los métodos analíticos. Estas pruebas incluyen, pero no se limitan a análisis de uno o más de los ácidos grasos libres, perfil de ácidos grasos, contenido total de triacilglicerol, contenido de diacilglicerol, los valores de peróxido, propiedades espectroscópicas (por ejemplo, absorción UV), perfil de esteroles, productos de degradación de esteroides, antioxidantes (por ejemplo, tocoferoles), pigmentos (por ejemplo, clorofila), los valores δ<sup>13</sup>C y análisis sensorial (por ejemplo, sabor, olor y sensación en la boca). Muchas de tales pruebas se han estandarizado para los aceites comerciales, tales como las normas del Codex Alimentarius para las grasas y aceites comestibles.

[0168] El análisis de perfil de esteroles es un método particularmente bien conocido para determinar la fuente biológica de la materia orgánica. Campesterol, b-sitosterol, y stigmasterol son esteroides vegetales comunes, siendo b-sitosterol un principio esteroles vegetal. Por ejemplo, se encontró que b-sitosterol estaba en mayor abundancia en un análisis de ciertos aceites de semillas, aproximadamente el 64% en el maíz, el 29% en semilla de colza, 64% en girasol, 74% en semilla de algodón, 26% en la soja, y 79% en aceite de oliva (Gul et al J. Cell and Molecular Biology. 5: 71-79, 2006).

[0169] Aceite aislado de cepa UTEX1435 Prototheca moriformis se aclararon por separado (CL), se refinaron y se blanquearon (RB), o se refinaron, blanquearon y desodorizaron (RBD) y se ensayaron para contenido de esteroles de acuerdo con el procedimiento descrito en JAOCS vol. 60, N° 8, agosto de 1983. Los resultados del análisis se muestran a continuación (unidades en mg/100 g):

	Esterol	Crudo	Aclarado	Refinado y blanqueado	Refinado, blanqueado y desodorizado
1	Ergosterol	384 (56%)	398 (55%)	293 (50%)	302 (50%)
2	5,22-colestadien-24-metil-3-ol (Brasicasterol)	14,6 (2,1%)	18,8 (2,6%)	14 (2,4%)	15,2 (2,5%)
3	24-metilcolest-5-en-3-ol (Campesterol o 22,23-dihidrobrasicasterol)	10,7 (1,6%)	11,9 (1,6%)	10,9 (1,8%)	10,8 (1,8%)
4	5,22-cholestadien-24-etil-3-ol (Stigmasterol o poriferasterol)	57,7 (8,4%)	59,2 (8,2%)	46,8 (7,9%)	49,9 (8,3%)
5	24-etilcolest-5-en-3-ol (β-sitosterol o clionasterol)	9,64 (1,4%)	9,92 (1,4%)	9,26 (1,6%)	10,2 (1,7%)
6	Otros esteroides	209	221	216	213
	Esteroides totales	685,64	718,82	589,96	601,1

**[0170]** Estos resultados muestran tres características llamativas. En primer lugar, se encontró que ergosterol era el más abundante de todos los esteroides, que representa aproximadamente el 50% o más del total de esteroides. La cantidad de ergosterol es mayor que la de campesterol,  $\beta$ -sitosterol, y stigmasterol combinado. El ergosterol es esteroide comúnmente encontrado en hongos y no se encuentran comúnmente en las plantas, y su presencia en particular en cantidades significativas sirve como un marcador útil para aceites no vegetales. En segundo lugar, se encontró que el aceite contenía brasicasterol. Con la excepción del aceite de colza, brasicasterol no se encuentra comúnmente en los aceites a base de plantas. En tercer lugar, a menos de 2%  $\beta$ -sitosterol se encontró que estaba presente.  $\beta$ -sitosterol es un destacado esteroide de planta que no se encuentra comúnmente en microalgas, y su presencia en particular en cantidades significativas sirve como un marcador útil para los aceites de origen vegetal. En resumen, cepa UTEX1435 *Prototheca moriformis* se ha encontrado que contiene tanto cantidades significativas de ergosterol como sólo cantidades pequeñas de  $\beta$ -sitosterol como un porcentaje del contenido total de esteroides. En consecuencia, la relación de ergosterol: $\beta$ -sitosterol o en combinación con la presencia de brasicasterol se pueden utilizar para distinguir este aceite a partir de aceites vegetales.

**[0171]** En algunas realizaciones, el contenido de aceite de un aceite proporcionado en este documento contiene, como un porcentaje del total de esteroides, menos del 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, o 1%  $\beta$ -sitosterol. En otras formas de realización el aceite está libre de  $\beta$ -sitosterol.

**[0172]** En algunas realizaciones, el aceite es libre de uno o más de  $\beta$ -sitosterol, campesterol, estigmasterol. En algunas realizaciones, el aceite está libre de  $\beta$ -sitosterol, campesterol, estigmasterol y. En algunas realizaciones, el aceite está libre de campesterol. En algunas realizaciones, el aceite está libre de estigmasterol.

**[0173]** En algunas realizaciones, el contenido de aceite de un aceite proporcionado en este documento comprende, como porcentaje del total de esteroides, menos del 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, o 1% de 24-etilcolest-5-en-3-ol. En algunas realizaciones, el 24-etilcolest-5-en-3-ol es clionasterol. En algunas realizaciones, el contenido de aceite de un aceite proporcionado en este documento comprende, como porcentaje del total de esteroides, por lo menos 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, o 10% clionasterol.

**[0174]** En algunas realizaciones, el contenido de aceite de un aceite proporcionado en este documento contiene, como un porcentaje del total de esteroides, menos de 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, o 1% 24-metilcolest-5-en-3-ol. En algunas realizaciones, el 24-metilcolest-5-en-3-ol es 22,23-dihidrobrasicasterol. En algunas realizaciones, el contenido de aceite de un aceite proporcionado en este documento comprende, como porcentaje del total de esteroides, por lo menos 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, o 10% 22,23-dihidrobrasicasterol.

**[0175]** En algunas realizaciones, el contenido de aceite de un aceite proporcionado en este documento contiene, como un porcentaje del total de esteroides, menos del 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, o 1% 5,22-colestadien-24-etil-3-ol. En algunas realizaciones, la 5,22-colestadien-24-etil-3-ol es poriferasterol. En algunas realizaciones, el contenido de aceite de un aceite proporcionado en este documento comprende, como porcentaje del total de esteroides, por lo menos 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, o 10% poriferasterol.

**[0176]** En algunas realizaciones, el contenido de aceite de un aceite proporcionado en el presente documento contiene ergosterol o brasicasterol o una combinación de los dos. En algunas realizaciones, el contenido de aceite contiene, como un porcentaje del total de esteroides, por lo menos 5%, 10%, 20%, 25%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, o 65% ergosterol. En algunas realizaciones, el contenido de aceite contiene, como un porcentaje del total de esteroides, por lo menos 25% ergosterol. En algunas realizaciones, el contenido de aceite contiene, como un porcentaje del total de esteroides, por lo menos 40% ergosterol. En algunas realizaciones, el contenido de aceite contiene, como un porcentaje del total de esteroides, por lo menos 5%, 10%, 20%, 25%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, o 65% de una combinación de ergosterol y brasicasterol.

**[0177]** En algunas realizaciones, el contenido de aceite contiene, como un porcentaje del total de esteroides, por lo menos 1%, 2%, 3%, 4% o 5% de brasicasterol. En algunas realizaciones, el contenido de aceite contiene, como un porcentaje del total de esteroides de menos de 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, o 5% de brasicasterol.

**[0178]** En algunas realizaciones la relación de ergosterol a brasicasterol es al menos 5: 1, 10: 1, 15: 1, o 20: 1.

**[0179]** En algunas realizaciones, el contenido de aceite contiene, como un porcentaje del total de esteroides, por lo menos 5%, 10%, 20%, 25%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, o 65% ergosterol y menos de 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, o 1%  $\beta$ -sitosterol. En algunas realizaciones, el contenido de aceite contiene, como un porcentaje del total de esteroides, por lo menos 25% ergosterol y menos de 5%  $\beta$ -sitosterol. En algunas realizaciones, el contenido de aceite comprende además brasicasterol.

### XIII. COMBUSTIBLES Y PRODUCTOS QUÍMICOS

**[0180]** Los aceites mencionados anteriormente solos o en combinación son útiles en la producción de alimentos, combustibles y productos químicos (incluyendo plásticos, espumas, películas, etc.). Los aceites, triglicéridos, ácidos grasos de los aceites pueden ser sometidos a la activación CH, metilación hidroamino, metoxi-carbonatación,

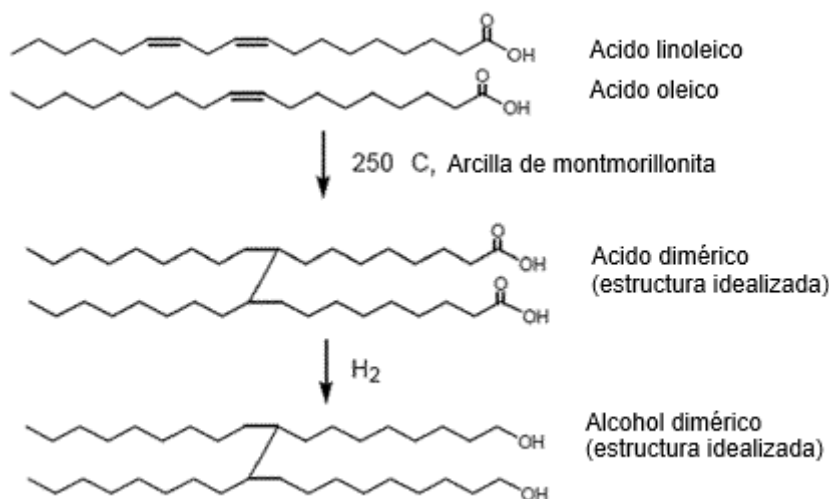


ozonólisis, las transformaciones enzimáticas, epoxidación, la metilación, la dimerización, tiolación, metátesis, hidroalquilación, lactonización, u otros procesos químicos.

**[0181]** Los aceites pueden ser convertidos a los alcanos (por ejemplo, diesel renovable) o ésteres (por ejemplo, ésteres de metilo o etilo para biodiesel producidos por transesterificación). Los alcanos o ésteres pueden usarse como combustible, como disolventes o lubricantes, o como materia prima química. Los métodos para la producción de diesel renovable y biodiesel están bien establecidos en la técnica. Véase, por ejemplo, WO2011/150411.

**[0182]** En un ejemplo específico de la presente descripción, un aceite de alto oleico o alto contenido de ácido oleico de alta estabilidad descrito anteriormente se esterifica. Por ejemplo, los aceites pueden ser transesterificados con metanol para dar un aceite que es rico en oleato de metilo. Como se ha descrito en el Ejemplo 49, se han encontrado tales formulaciones para comparar favorablemente con oleato de metilo de aceite de soja.

**[0183]** En otro ejemplo específico, el aceite se convierte a diácidos C36 o productos de diácidos C36. Los ácidos grasos producidos a partir del petróleo se pueden polimerizar para dar una composición rica en ácidos dímeros C36. En un ejemplo específico, el aceite de alto oleico se divide para dar un material de ácido graso de alto oleico que se polimeriza para dar una composición rica en ácidos C36-dímero. Opcionalmente, el aceite es alto aceite oleico de alta estabilidad (por ejemplo, mayor que 60% de ácido oleico con menos de 3% ácidos grasos poliinsaturados, ácido oleico mayor que 70% con menos de 2% ácidos grasos poliinsaturados, o ácido oleico mayor que 80% con menos de 1% poliinsaturados). Se cree que el uso de un alto oleico, alta estabilidad, material de partida dará menores cantidades de productos cíclicos, que pueden ser deseables en algunos casos. Después de hidrolizar el aceite, se obtiene una alta concentración de ácido oleico. En el proceso de hacer los ácidos dímeros, una corriente de alto ácido oleico se convertirá en un ácido dímero "más limpio" C36 y no produce trímeros ácidos (C54) y otros subproductos cíclicos más complejos que se obtienen debido a la presencia de ácidos C18: 2 y C18: 3. Por ejemplo, el aceite se puede hidrolizar a los ácidos grasos y los ácidos grasos purificados y dimerizarse a 250°C en presencia de arcilla montmorillonita. Ver SRI Natural Fatty Acid, de marzo de 2009. Un producto rico en dímeros C36 de ácido oleico se recupera.



**[0184]** Además, los ácidos dímeros C36 pueden ser esterificados y hidrogenados para dar dioles. Los dioles pueden ser polimerizados por deshidratación catalítica. Los polímeros también pueden producirse por transesterificación de dimerdioles con carbonato de dimetilo.

**[0185]** Para la producción de combustible de acuerdo con los métodos de la invención, lípidos producidos por las células de la invención son cosechados, o recogidos de otra manera, por cualquier medio conveniente. Los lípidos se pueden aislar por extracción de células enteras. Las células se rompen primero, y luego los lípidos asociados con intracelular y membrana de la célula/pared de la célula, así como hidrocarburos extracelulares pueden ser separados de la masa de células, tales como mediante el uso de centrifugación. Lípidos intracelulares producidos en células oleaginosas, en algunas realizaciones, se extrajeron después de lisar las células. Una vez extraídos, los lípidos se refinan adicionalmente para producir aceites, combustibles, o productos oleoquímicos.

**[0186]** Varios métodos están disponibles para la separación de lípidos a partir de lisados celulares. Por ejemplo, lípidos y derivados de lípidos tales como aldehídos grasos, alcoholes grasos, e hidrocarburos tales como alcanos se pueden extraer con un disolvente hidrófobo, tal como hexano (ver Frenz et al 1989, Enzyme Microb Technol., 11: 717). Los lípidos y derivados de lípidos también se pueden extraer utilizando licuefacción (ver por ejemplo Sawayama et al 1999, Biomass and Bioenergy 17: 33-39 y Inoue et al 1993, Biomass Bioenergy 6 (4): 269-274); licuación de aceite (véase, por ejemplo Minowa et al 1995, Fuel 74 (12): 1735-1738); y extracción supercrítica de CO<sub>2</sub> (véase, por ejemplo Mendes et al 2003, Inorganica Chimica Acta 356: 328-334). Miao y Wu describe un protocolo de la recuperación de

los lípidos de microalgas de un cultivo de *Chlorella protothecoides* en donde las células se recogieron por centrifugación, se lavaron con agua destilada y se secaron por liofilización. El polvo de células resultante se pulverizó en un mortero y después se extrajo con *n*-hexano. Miao y Wu, Biosource Technology (2006) 97: 841-846.

**[0187]** Los lípidos y derivados de lípidos se pueden recuperar por extracción con un disolvente orgánico. En algunos casos, el disolvente orgánico preferido es hexano. Típicamente, se añade directamente el disolvente orgánico al lisado sin separación previa de los componentes del lisado. En una realización, el lisado generado por uno o más de los métodos descritos anteriormente se pone en contacto con un disolvente orgánico durante un período de tiempo suficiente para permitir el lípido y/o componentes de hidrocarburos para formar una solución con el disolvente orgánico. En algunos casos, la solución puede ser entonces refinada de nuevo para recuperar los componentes de lípidos o de hidrocarburos deseados específicos. Métodos de extracción con hexano son bien conocidos en la técnica.

**[0188]** Los lípidos producidos por las células *en vivo*, o enzimáticamente modificados *in vitro*, como se describe en el presente documento pueden estar opcionalmente procesados adicionalmente por medios convencionales. El procesamiento puede incluir "craqueo" para reducir el tamaño, y por lo tanto incrementar la proporción hidrógeno: carbono, de moléculas de hidrocarburos. Métodos de craqueo catalítico y térmicos se utilizan rutinariamente en hidrocarburos y procesamiento de aceite de triglicérido. Métodos catalíticos implican el uso de un catalizador, tal como un catalizador ácido sólido. El catalizador puede ser de sílice-alúmina o una zeolita, que dan como resultado la rotura heterolítica o asimétrica de un enlace carbono-carbono para dar lugar a una carbocación y un anión hidruro. Estos intermediarios reactivos a continuación, se someten a cualquiera de reordenamiento o transferencia de hidruro con otro hidrocarburo. Las reacciones se pueden por lo tanto regenerar los intermedios para dar lugar a un mecanismo de cadena de auto-propagación. Los hidrocarburos también pueden ser procesados para reducir, opcionalmente a cero, el número de enlaces dobles o triples carbono-carbono en los mismos. Los hidrocarburos también pueden ser procesados para eliminar un anillo o estructura cíclica en él. Los hidrocarburos también pueden ser procesados para aumentar la proporción hidrógeno: carbono. Esto puede incluir la adición de hidrógeno ("hidrogenación") y/o el "craqueo" de hidrocarburos en hidrocarburos más pequeños.

**[0189]** Los métodos térmicos implican el uso de temperatura y presión para reducir el tamaño de hidrocarburos elevado. Una temperatura elevada de aproximadamente 800°C y presión de aproximadamente 700kPa pueden ser utilizadas. Estas condiciones generan "luz", un término que se utiliza a veces para referirse a moléculas de hidrocarburos ricos en hidrógeno (a diferencia de flujo de fotones), mientras que se genera también, por condensación, moléculas de hidrocarburos más pesados que son relativamente agotados de hidrógeno. La metodología proporciona la rotura homolítica, o simétrica, y produce alquenos, que pueden estar opcionalmente saturados enzimáticamente como se describe anteriormente.

**[0190]** Métodos catalíticos y térmicos son estándar en las plantas para el procesamiento y refinación de hidrocarburos de petróleo. Por lo tanto hidrocarburos producidos por las células como se describe en el presente documento pueden ser recogidos y procesados o refinados a través de medios convencionales. Ver Hillen et al. (Biotechnology and Bioengineering, Vol XXIV. 193-205 (1982)) para un informe sobre el hidrocraqueo de hidrocarburos producidos por microalgas. En realizaciones alternativas, la fracción se trata con otro catalizador, tal como un compuesto orgánico, el calor, y/o un compuesto inorgánico. Para el procesamiento de los lípidos en biodiesel, un proceso de transesterificación se utiliza como se describe a continuación en esta sección.

**[0191]** Hidrocarburos producidos a través de métodos de la presente invención son útiles en una variedad de aplicaciones industriales. Por ejemplo, la producción de sulfonato de alquilbenceno lineal (LAS), un tensioactivo aniónico se utiliza en casi todos los tipos de detergentes y productos de limpieza, utiliza los hidrocarburos que comprenden generalmente una cadena de 10-14 átomos de carbono. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N°: 6.946.430; 5.506.201; 6.692.730; 6.268.517; 6.020.509; 6.140.302; 5.080.848; y 5.567.359. Tensioactivos, tales como LAS, se pueden utilizar en la producción de composiciones y detergentes para el cuidado personal, tales como los descritos en la Patente de Estados Unidos N°: 5.942.479; 6.086.903; 5.833.999; 6.468.955; y 6.407.044.

**[0192]** Creciente interés se dirige a la utilización de componentes de hidrocarburos de origen biológico en los combustibles, tales como el biodiesel, diesel renovable, y combustible de aviación, puesto que los materiales biológicos de partida renovables que pueden reemplazar materiales derivados de combustibles fósiles de partida están disponibles, y el uso del mismo es deseable. Hay una necesidad urgente de métodos para producir componentes de hidrocarburos a partir de materiales biológicos. La presente divulgación satisface esta necesidad proporcionando métodos para la producción de biodiesel, diesel renovable, y combustible para aviones utilizando los lípidos generados por los métodos descritos en el presente documento como un material biológico para producir biodiesel, diesel renovable, y combustible de aviación.

**[0193]** Combustibles diesel tradicionales son destilados de petróleo ricos en hidrocarburos parafínicos. Tienen intervalos de ebullición tan amplios como 370° a 780° F, que son adecuados para la combustión en un motor de encendido por compresión, tal como un vehículo de motor diesel. La Sociedad Americana de Pruebas y Materiales (ASTM) establece el grado de diesel de acuerdo con el intervalo de ebullición, junto con rangos permisibles de otras propiedades del combustible, como el número de cetano, punto de enturbiamiento, punto de inflamación, viscosidad, punto de anilina, contenido de azufre, agua contenido, contenido de cenizas, la corrosión tira de cobre, y residuo de

carbono. Técnicamente, cualquier material destilado de hidrocarburo derivado de la biomasa o de otra forma que cumpla con la especificación ASTM apropiado puede definirse como combustible diesel (ASTM D975), combustible de aviación (ASTM D1655), o como biodiesel si es un éster metílico de ácido graso (D6751 ASTM).

5 **[0194]** Después de la extracción, los componentes de lípidos y/o hidrocarburos recuperados de la biomasa microbiana descritos en este documento pueden ser sometidos a tratamiento químico para la fabricación de un combustible para uso en vehículos diesel y motores a reacción.

10 **[0195]** El biodiesel es un líquido que varía en color - entre marrón dorado y oscuro - en función de la materia prima de producción. Es prácticamente inmiscible con agua, tiene un alto punto de ebullición y baja presión de vapor. Biodiesel se refiere a un combustible procesado diesel equivalente para su uso en vehículos de motor diesel. El biodiesel es biodegradable y no tóxico. Un beneficio adicional de biodiesel más de combustible diesel convencional es menor desgaste del motor. Típicamente, el biodiesel comprende ésteres de alquilo C14-C18. Diversos procesos convierten biomasa o un lípido producido y aislado como se describe en este documento para los combustibles diesel. Un método  
15 preferido para producir biodiesel es por transesterificación de un lípido, como se describe en el presente documento. Un éster de alquilo preferido para uso como biodiesel es un éster metílico o éster etílico.

**[0196]** Biodiesel producido mediante un método descrito en el presente documento puede utilizarse solo o mezclado con el combustible diesel convencional a cualquier concentración en la mayoría de los vehículos modernos motores diesel. Cuando se mezcla con el combustible diesel convencional (diesel de petróleo), el biodiesel puede estar presente desde aproximadamente 0,1% a aproximadamente 99,9%. Gran parte del mundo utiliza un sistema conocido como el factor "B" para indicar la cantidad de biodiesel en cualquier mezcla de combustible. Por ejemplo, el combustible que contiene 20% de biodiesel se etiqueta B20. El biodiesel puro se conoce como B100.

25 **[0197]** El biodiesel puede ser producido por transesterificación de triglicéridos contenidos en la biomasa rica en petróleo. Por lo tanto, en otro ejemplo de la presente descripción se proporciona un método para la producción de biodiesel. En un ejemplo preferido, el método para la producción de biodiesel comprende las etapas de (a) cultivo de un microorganismo que contiene lípidos usando métodos descritos en este documento (b) lisar un microorganismo que contiene lípidos para producir un lisado, (c) aislar lípidos a partir del microorganismo lisado y (d) la transesterificación de la composición de los lípidos, lo que produce biodiesel. Los métodos para el crecimiento de un microorganismo, lisar un microorganismo para producir un lisado, tratar el lisado en un medio que comprende un disolvente orgánico para formar una mezcla heterogénea y separar el lisado tratado en una composición lipídica que se han descrito anteriormente y también puede ser utilizado en el método de producción de biodiesel. El perfil de lípidos de biodiesel es por lo general muy similar al perfil de lípidos de la materia prima de aceite.

35 **[0198]** Composiciones lipídicas pueden ser sometidas a la transesterificación para producir ésteres de ácidos grasos de cadena larga útiles como biodiesel. Reacciones de transesterificación preferidas se describen a continuación e incluyen transesterificación y transesterificación catalizada por base usando lipasas recombinantes. En un proceso de transesterificación catalizada por base, los triacilglicéridos se hacen reaccionar con un alcohol, tal como metanol o etanol, en presencia de un catalizador alcalino, típicamente hidróxido de potasio. Esta reacción forma ésteres de metilo o etilo y glicerina (glicerol) como subproducto.

45 **[0199]** La transesterificación también se ha llevado a cabo, como se discutió anteriormente, utilizando una enzima, tal como una lipasa en lugar de una base. La transesterificación catalizada por lipasa puede llevarse a cabo, por ejemplo, a una temperatura entre la temperatura ambiente y 80°C, y una relación molar de la etiqueta para el alcohol inferior de más de 1: 1, preferiblemente de aproximadamente 3: 1. Las lipasas adecuadas para uso en la transesterificación incluyen, pero no se limitan a, los enumerados en la Tabla 9. Otros ejemplos de lipasas útiles para la transesterificación se encuentran en, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.798.793.; 4.940.845 5.156.963; 5.342.768; 5776741 y WO89/01032. Tales lipasas incluyen, pero no se limitan a, lipasas producidas por microorganismos del Rhizopus, Aspergillus, Candida, Mucor, Pseudomonas, Rhizomucor, Candida, y Humicola y lipasa de páncreas.

55 **[0200]** Procesos posteriores también se pueden utilizar si el biodiesel se utilizará en temperaturas particularmente frías. Tales procesos incluyen acondicionamiento para el invierno y fraccionamiento. Ambos procesos están diseñados para mejorar el flujo en frío y el rendimiento de invierno del combustible mediante la reducción del punto de enturbiamiento (la temperatura a la que el biodiesel comienza a cristalizar). Hay varios enfoques para el biodiesel de invierno. Un método consiste en mezclar el biodiesel con diesel de petróleo. Otro enfoque es el uso de aditivos que pueden disminuir el punto de enturbiamiento de biodiesel. Otro enfoque es eliminar ésteres metílicos saturados indiscriminadamente mezclando los aditivos y permitiendo la cristalización de ácidos grasos saturados y luego filtrando los cristales. El fraccionamiento separa selectivamente ésteres metílicos en componentes o fracciones individuales, lo que permite la eliminación o inclusión de ésteres metílicos específicos. métodos de fraccionamiento incluyen fraccionamiento de urea, fraccionamiento de disolvente y la destilación térmica.

65 **[0201]** Otro valioso combustible proporcionado por los métodos de la presente descripción es diesel renovable, que comprende alcanos, tales como C10: 0, C12: 0, C14: 0, C16: 0 y C18: 0 y, por tanto, son distinguibles de biodiesel. Diesel renovable de alta calidad se adecua a la norma ASTM D975. Los lípidos producidos por los métodos de la presente invención pueden servir como materia prima para producir diesel renovable. Por lo tanto, en otro ejemplo de

la presente descripción, se proporciona un método para la producción de diesel renovable. Diesel renovable puede ser producido por al menos tres procesos: procesamiento hidrotérmico (hidrotratamiento); hidrotratamiento; y licuefacción indirecta. Estos procesos producen destilados no éster. Durante estos procesos, triacilglicéridos producido y aislado como se describe en el presente documento, se convierten en alcanos.

**[0202]** En un ejemplo, el método para producir diesel renovable comprende (a) el cultivo de un microorganismo que contiene lípidos usando métodos dados a conocer en el presente documento (b) lisar el microorganismo para producir un lisado, (c) aislar lípidos a partir del microorganismo lisado, y (d) desoxigenación y hidrotratamiento de los lípidos para producir un alcano, con lo que se produce diesel renovable. Los lípidos adecuados para la fabricación de diesel renovable se pueden obtener mediante extracción a partir de biomasa microbiana usando un disolvente orgánico tal como hexano, o mediante otros métodos, tales como los descritos en la patente US 5.928.696. Algunos métodos adecuados pueden incluir prensado mecánico y centrifugación.

**[0203]** En algunos métodos, el lípido microbiano está agrietado primero en conjunción con hidrotratamiento para reducir la longitud de cadena de carbono y saturar los enlaces dobles, respectivamente. El material luego se isomeriza, también en combinación con hidrotratamiento. La fracción de nafta puede retirarse entonces a través de destilación, seguido de destilación adicional para vaporizar y separar por destilación los componentes deseados en el combustible diesel para satisfacer una norma ASTM D975, dejando los componentes que son más pesados que lo deseado para cumplir con el estándar D975. El hidrotratamiento, hidrocrackeo, desoxigenación y métodos de isomerización de los aceites de la modificación química, incluidos los aceites de triglicéridos, son bien conocidos en la técnica. Véase por ejemplo solicitudes de patente europea EP1741768 (A1); EP1741767 (A1); EP1682466 (A1); EP1640437 (A1); EP1681337 (A1); EP1795576 (A1); y Patentes de Estados Unidos 7.238.277; 6.630.066; 6.596.155; 6.977.322; 7.041.866; 6.217.746; 5.885.440; 6.881.873.

**[0204]** En un ejemplo del método para la producción de diesel renovable, el tratamiento de los lípidos para producir un alcano se lleva a cabo por el hidrotratamiento de la composición lipídica. En el procesamiento hidrotérmico, típicamente, la biomasa se hace reaccionar en agua a una temperatura y presión elevadas para formar aceites y sólidos residuales. Las temperaturas de conversión son normalmente de 300° a 660° F, con presión suficiente para mantener el agua principalmente como un líquido, de 100 a 170 atmósfera estándar (atm). Los tiempos de reacción son del orden de 15 a 30 minutos. Después de que se completó la reacción, los orgánicos se separan del agua. De este modo se produce un destilado adecuado para diesel.

**[0205]** En algunos métodos de fabricación de diesel renovable, la primera etapa de tratar un triglicérido es de hidroprocesamiento para saturar los enlaces dobles, seguido de desoxigenación a temperatura elevada en presencia de hidrógeno y un catalizador. En algunos métodos, la hidrogenación y la desoxigenación se producen en la misma reacción. En otros métodos de desoxigenación se produce antes de la hidrogenación. A continuación, se realiza opcionalmente la isomerización, también en presencia de hidrógeno y un catalizador. Componentes de la nafta se eliminan preferiblemente a través de destilación. Para ejemplos, véanse las patentes 5475160 (de hidrogenación de triglicéridos) de Estados Unidos; 5.091.116 (desoxigenación, de hidrogenación y de eliminación de gas); 6.391.815 (de hidrogenación); y 5.888.947 (isomerización).

**[0206]** Un método adecuado para la hidrogenación de triglicéridos incluye la preparación de una solución acuosa de sales de cobre, zinc, magnesio y lantano y otra solución de metal alcalino o, preferiblemente, carbonato de amonio. Las dos soluciones se pueden calentar a una temperatura de aproximadamente 20°C a aproximadamente 85°C y dosifican juntos en un recipiente de precipitación a tasas tales que el pH en el recipiente de precipitación se mantiene entre 5,5 y 7,5 con el fin de formar un catalizador. El agua adicional se puede utilizar ya sea inicialmente en el recipiente de precipitación o se añade simultáneamente con la solución de sal y la solución de precipitación. El precipitado resultante se puede lavar a fondo, se seca, se calcina a aproximadamente 300°C y se activa en hidrógeno a temperaturas que varían de aproximadamente 100°C a aproximadamente 400°C. Uno o más triglicéridos pueden estar entonces en contacto y se hacen reaccionar con hidrógeno en presencia del catalizador descrito anteriormente en un reactor. El reactor puede ser un reactor de lecho de goteo, reactor de gas-sólido de lecho fijo, reactor de columna de burbujas empaquetada, tanque continuamente agitado, un reactor de fase en suspensión, o cualquier otro tipo de reactor adecuado conocido en la técnica. El proceso puede llevarse a cabo tanto de manera discontinua como de manera continua. Las temperaturas de reacción están típicamente en el intervalo de aproximadamente 170°C a aproximadamente 250°C mientras que las presiones de reacción están típicamente en el intervalo de aproximadamente 300 psig a aproximadamente 2000 psig. Además, la relación molar de hidrógeno a triglicéridos en el proceso de la presente invención está típicamente en el intervalo de aproximadamente 20: 1 a aproximadamente 700: 1. El proceso se lleva a cabo típicamente a una velocidad espacial horaria en peso (WHSV) en el intervalo de aproximadamente 0,1 h<sup>-1</sup> a aproximadamente 5 h<sup>-1</sup>. Un experto en la técnica reconocerá que el período de tiempo requerido para la reacción variará en función de la temperatura utilizada, la relación molar de hidrógeno a triglicéridos, y la presión parcial de hidrógeno. Los productos producidos por tales procesos de hidrogenación incluyen alcoholes grasos, glicerol, trazas de parafinas y triglicéridos sin reaccionar. Estos productos son típicamente separados por medios convencionales tales como, por ejemplo, destilación, extracción, filtración, cristalización, y similares.

**[0207]** Refinerías de petróleo utilizan hidroprocesamiento para eliminar las impurezas mediante el tratamiento de alimentaciones con hidrógeno. temperaturas de conversión de hidroprocesamiento son típicamente de 300° a 700° F.

Las presiones son típicamente de 40 a 100 atm. Los tiempos de reacción son típicamente del orden de 10 a 60 minutos. Los catalizadores sólidos se emplean para aumentar ciertas velocidades de reacción, mejorar la selectividad para ciertos productos, y optimizar el consumo de hidrógeno.

5 **[0208]** Los métodos adecuados para la desoxigenación de un aceite incluye calentar un aceite a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 350° F a aproximadamente 550° F y poner en contacto continuamente el aceite calentado con nitrógeno bajo que varía de aproximadamente atmosférico anteriormente durante al menos presión al menos aproximadamente 5 minutos.

10 **[0209]** Los métodos adecuados para la isomerización incluyen el uso de isomerización alcalina y otra isomerización de aceite conocida en la técnica.

**[0210]** El hidrotratamiento y hidroprocesamiento en última instancia, conducen a una reducción en el peso molecular de la alimentación de triglicéridos. La molécula de triglicérido se reduce a cuatro moléculas de hidrocarburos en condiciones de hidroprocesamiento: una molécula de propano y tres moléculas de hidrocarburos más pesados, típicamente en el intervalo de C8 a C18.

20 **[0211]** Por lo tanto, en un ejemplo, el producto de una o más reacción(es) química(s) realizado en composiciones de lípidos de la invención es una mezcla de alcano que comprende ASTM D975 diesel renovable. La producción de hidrocarburos por microorganismos es revisado por Metzger et al. Appl Microbiol Biotechnol (2005) 66: 486-496 y una mirada retrospectiva en el U.S.Department of Energy's Aquatic Species Program: Biodiesel from Algae, NREL/TP-580-24190, John Sheehan, Terri Dunahay, John Benemann and Paul Roessler (1998).

25 **[0212]** Las propiedades de destilación de un combustible diesel se describen en términos de T10-T90 (temperatura a 10% y 90%, respectivamente, el volumen de destilado). El T10-T90 del material producido en el Ejemplo 13 era 57,9°C. Métodos de hidrotratamiento, isomerización, y otra modificación covalente de los aceites descritos en este documento, así como los métodos de destilación y fraccionamiento (tales como filtración en frío) descritos aquí, se pueden emplear para generar composiciones de diesel renovable con otros intervalos de T10-T90, tales como 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60 y 65 °C utilizando aceites de triglicéridos producidos según los métodos descritos en este documento.

30 **[0213]** Métodos de hidrotratamiento, isomerización, y otra modificación covalente de los aceites descritos en este documento, así como los métodos de destilación y fraccionamiento (tales como filtración en frío) descritos aquí, se pueden emplear para generar composiciones de diesel renovable con otros valores T10, tales como T10 entre 180 y 295, entre 190 y 270, entre 210 y 250, entre 225 y 245, y al menos 290.

35 **[0214]** Métodos de hidrotratamiento, isomerización, y otra modificación covalente de los aceites descritos en este documento, así como los métodos de destilación y fraccionamiento (tales como filtración en frío) descrita en este documento se pueden emplear para generar composiciones de diesel renovable con ciertos valores T90, tales como T90 entre 280 y 380, entre 290 y 360, entre 300 y 350, entre 310 y 340, y al menos 290.

40 **[0215]** La FBP del material producido en el Ejemplo 13 era 300°C. Métodos de hidrotratamiento, isomerización, y otra modificación covalente de los aceites descritos en este documento, así como los métodos de destilación y fraccionamiento (tales como filtración en frío) que se describen aquí, se pueden emplear para generar composiciones de diesel renovable con otros valores FBP, tales como FBP entre 290 y 400, entre 300 y 385, entre 310 y 370, entre 315 y 360, y al menos 300.

45 **[0216]** Otros aceites proporcionados por los métodos de la invención y composiciones de la divulgación pueden ser sometidos a combinaciones de hidrotratamiento, isomerización, y otra modificación covalente incluyendo aceites con perfiles de lípidos, incluyendo (a) al menos 1% -5%, preferiblemente al menos 4%, C8-C14; (b) al menos 0,25% -1%, preferiblemente al menos 0,3%, C8; (c) al menos 1% - 5%, preferiblemente al menos 2%, C10; (d) al menos 1% -5%, preferiblemente al menos 2%, C12; y (3) al menos 20% -40%, preferiblemente al menos 30% C8-C14.

50 **[0217]** Un diesel tradicional de contenido de azufre ultra-bajo puede ser producido de cualquier forma de biomasa por un proceso de dos pasos. En primer lugar, la biomasa se convierte en un gas de síntesis, una mezcla gaseosa rica en hidrógeno y monóxido de carbono. A continuación, el gas de síntesis se convierte catalíticamente a los líquidos. Típicamente, la producción de líquidos se logra utilizando Fischer-Tropsch de síntesis (FT). Esta tecnología se aplica a carbón, gas natural y aceites pesados. Por lo tanto, en todavía otro ejemplo preferido del método para la producción de diesel renovable, el tratamiento de la composición de lípidos para producir un alcano se lleva a cabo por licuefacción indirecta de la composición lipídica.

60 **[0218]** La presente descripción también proporciona métodos para producir combustible para aviones. El combustible de avión es claro y de color pajizo. El combustible más común es un combustible a base de aceite sin plomo/parafina clasificado como Avión A-1, que se produce a un conjunto internacionalmente estandarizado de especificaciones. El combustible de avión es una mezcla de un gran número de diferentes hidrocarburos, posiblemente tantos como mil o más. La gama de sus tamaños (pesos moleculares o números de carbono) está restringido por los requisitos para el producto, por ejemplo, punto de congelación o punto de humo. Combustible de avión de tipo Kerosene (incluyendo

Jet A y Jet A-1) tiene una distribución de número de carbono entre aproximadamente 8 y 16. Combustible de avión de tipo corte ancho o nafta (incluyendo Jet B) típicamente tiene una distribución de número de carbonos entre aproximadamente 5 y 15 carbonos.

**[0219]** En un ejemplo de la divulgación, un combustible de avión se produce mediante la mezcla de combustibles de algas con combustible de avión existente. Los lípidos producidos por los métodos de la presente invención pueden servir como materia prima para producir el combustible para aviones. Por lo tanto, en otro ejemplo de la presente descripción, se proporciona un método para la producción de combustible para aviones. Por la presente se proporcionan dos métodos para producir el combustible para aviones a partir de los lípidos producidos por los métodos de la presente invención: craqueo catalítico fluido (FCC); y hidrodesoxigenación (HDO).

**[0220]** Craqueo catalítico fluido (FCC) es un método que se utiliza para producir olefinas, especialmente propileno a partir de fracciones de crudo pesado. Los lípidos producidos por el método de la presente invención se pueden convertir en olefinas. El proceso implica hacer fluir los lípidos producidos a través de una zona de FCC y recoger una corriente de producto que comprende olefinas, que es útil como un combustible de aviación. Los lípidos producidos se ponen en contacto con un catalizador de craqueo en condiciones de craqueo para proporcionar una corriente de producto que comprende olefinas e hidrocarburos útiles como combustible de avión.

**[0221]** En un ejemplo, el método para producir combustible para aviones comprende (a) cultivar un microorganismo que contiene lípidos usando métodos descritos en este documento, (b) lisar el microorganismo que contiene lípidos para producir un lisado, (c) aislar lípidos a partir del lisado, y (d) tratar la composición de lípidos, lo que produce el combustible para aviones. En un ejemplo del método para la producción de un combustible de aviación, la composición lipídica puede hacerse fluir a través de una zona de craqueo catalítico fluido, que, en una realización, puede comprender poner en contacto la composición de lípidos con un catalizador de craqueo en condiciones de craqueo para proporcionar una corriente de producto que comprende olefinas C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>.

**[0222]** En ciertos ejemplos de este método, puede ser deseable eliminar cualquier contaminante que pueda estar presente en la composición de lípidos. Por lo tanto, antes de hacer fluir la composición de lípidos a través de una zona de craqueo catalítico fluido, la composición lipídica se trata previamente. El pretratamiento puede implicar poner en contacto la composición de lípidos con una resina de intercambio iónico. La resina de intercambio iónico es una resina de intercambio iónico ácida, tal como Amberlyst™-15 y se puede usar como un lecho en un reactor a través del cual se hace fluir la composición de lípidos, ya sea de flujo ascendente o flujo descendente. Otros pretratamientos pueden incluir lavados ácidos suaves al contactar la composición de lípidos con un ácido, tales como ácido sulfúrico, acético, nítrico o clorhídrico. El contacto se realiza con una solución ácida diluida normalmente a temperatura ambiente y presión atmosférica.

**[0223]** La composición de los lípidos, opcionalmente pretratada, se hace fluir a una zona de FCC donde los componentes hidrocarbonados están agrietadas a olefinas. El craqueo catalítico se lleva a cabo poniendo en contacto la composición de lípidos en una zona de reacción con un catalizador compuesto de material en partículas finamente dividido. La reacción es craqueo catalítico, a diferencia de hidrocrqueo, y se lleva a cabo en ausencia de hidrógeno añadido o el consumo de hidrógeno. Como el craqueo avanza la reacción, cantidades sustanciales de coque son depositadas sobre el catalizador. El catalizador se regenera a altas temperaturas quemando coque del catalizador en una zona de regeneración. Coke catalizador que contiene, referido en este documento como "catalizador coquizado", es transportado continuamente desde la zona de reacción a la zona de regeneración para ser regenerado y reemplazado por catalizador regenerado esencialmente libre de coque de la zona de regeneración. La fluidización de las partículas del catalizador por varias corrientes gaseosas permite el transporte de catalizador entre la zona de reacción y zona de regeneración. Los métodos para craqueo de hidrocarburos, tales como las de la composición de lípidos descrita en el presente documento, en una corriente fluidizada de catalizador, el transporte de catalizador entre las zonas de reacción y regeneración, y la combustión de coque en el regenerador son bien conocidos por los expertos en la técnica de los procesos FCC. Aplicaciones y catalizadores de FCC ejemplares útiles para el craqueo de la composición de lípidos para producir olefinas C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> se describen en la patente de los Estados Unidos. N<sup>os</sup> 6.538.169, 7.288.685.

**[0224]** Catalizadores de FCC adecuados generalmente comprenden al menos dos componentes que pueden o no pueden estar en la misma matriz. En algunas realizaciones, ambos componentes pueden distribuirse a través de todo el recipiente de reacción. El primer componente en general incluye cualquiera de los catalizadores bien conocidos que se utilizan en la técnica de craqueo catalítico fluidizado, tal como un catalizador activo amorfo de tipo arcilla y/o un tamiz molecular cristalino de alta actividad. Catalizadores de tamiz molecular pueden ser preferidos sobre catalizadores amorfos debido a su muy mejorada selectividad a productos deseados. En algunos ejemplos preferidos, las zeolitas se pueden usar como el tamiz molecular en los procesos de FCC. Preferiblemente, el primer componente de catalizador comprende una zeolita de poro grande, tal como una zeolita de tipo Y, un material de alúmina activa, un material aglutinante, que comprende sílice o alúmina y un relleno inerte tal como caolín.

**[0225]** En un ejemplo, el agrietamiento de la composición de lípidos de la presente descripción, tiene lugar en la sección de tubería vertical o, alternativamente, la sección de elevación, de la zona de FCC. La composición de lípidos se introduce en el tubo de subida por una boquilla que resulta en la rápida vaporización de la composición lipídica.

Antes de contactar con el catalizador, la composición lipídica ordinariamente tiene una temperatura de aproximadamente 149°C a aproximadamente 316°C (300° F a 600° F). El catalizador se hace fluir desde un recipiente de fusión a la columna ascendente donde hace contacto con la composición lipídica durante un tiempo de suspensión de 2 segundos o menos.

**[0226]** El catalizador mezclado y composición de lípidos reaccionada de los vapores se descargan desde la parte superior de la columna ascendente a través de una salida y se separan en una corriente de vapor de producto craqueado que incluye las olefinas y una colección de partículas del catalizador cubiertas con cantidades sustanciales de coque y generalmente se denomina "catalizador coquizado". En un esfuerzo por minimizar el tiempo de contacto de la composición lipídica y el catalizador que puede promover la conversión adicional de productos deseados a otros productos indeseables, cualquier disposición de separadores tales como una disposición de brazo de remolino se puede utilizar para eliminar el catalizador coquizado de la corriente de producto de forma rápida. El separador, por ejemplo, brazo separador de remolino, se encuentra en una porción superior de una cámara con una zona de extracción situada en la parte inferior de la cámara. El catalizador separado por la disposición de brazo de remolino cae hacia abajo en la zona de extracción. La corriente de vapor de producto craqueado que comprende hidrocarburos craqueados que incluyen olefinas ligeras y un poco de salida de catalizador de la cámara a través de un conducto que está en comunicación con ciclones. los ciclones retiran los restos de partículas de catalizador de la corriente de vapor producto para reducir las concentraciones de partículas a niveles muy bajos. La corriente de vapor producto a continuación, sale de la parte superior del recipiente de separación. El catalizador separado por los ciclones se devuelve al recipiente de separación y luego a la zona de extracción. La zona de extracción elimina los hidrocarburos adsorbidos de la superficie del catalizador mediante contacto a contracorriente con vapor de agua.

**[0227]** Baja presión parcial de hidrocarburo opera para favorecer la producción de olefinas ligeras. De acuerdo con ello, la presión de tubo ascendente se fija en unos 172 a 241 kPa (25 a 35 psia) con una presión parcial de hidrocarburo de aproximadamente 35 a 172 kPa (5 a 25 psia), con una presión preferida de hidrocarburo parcial de aproximadamente 69 a 138 kPa (10 a 20 psia). Esta presión parcial relativamente baja para hidrocarburo se logra mediante el uso de vapor de agua como un diluyente en la medida en que el diluyente es de 10 a 55% en peso de la composición de lípidos y preferiblemente de aproximadamente 15% en peso de la composición de lípidos. Otros diluyentes como el gas seco pueden ser usados para alcanzar presiones parciales de hidrocarburos equivalentes.

**[0228]** La temperatura de la corriente craqueada en la salida del tubo ascendente será de aproximadamente 510°C a 621°C (950° F a 1150° F). Sin embargo, las temperaturas de salida del tubo ascendente por encima de 566°C (1050° F) hacen más gas seco y más olefinas. Mientras que las temperaturas de salida del tubo ascendente por debajo de 566°C (1050° F) hacen menos etileno y propileno. Por consiguiente, se prefiere llevar a cabo el proceso de FCC a una temperatura preferida de aproximadamente 566°C a aproximadamente 630°C, la presión preferida de aproximadamente 138 kPa a aproximadamente 240 kPa (20 a 35 psia). Otra condición para el proceso es el catalizador a la proporción de composición de lípidos que puede variar de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 y preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 15.

**[0229]** En un ejemplo del método para la producción de un combustible de aviación, la composición lipídica se introduce en la sección de ascensor de un reactor FCC. La temperatura en la sección de elevación será muy caliente y el intervalo de aproximadamente 700°C (1292° F) a aproximadamente 760°C (1400° F) con un catalizador a la proporción de composición de lípidos de aproximadamente 100 a aproximadamente 150. Se prevé que introducir la composición de lípidos en la sección de elevación producirá cantidades considerables de propileno y etileno.

**[0230]** En otra realización del método para la producción de un combustible de avión que utiliza la composición de los lípidos o los lípidos producidos como se describe en el presente documento, la estructura de la composición de los lípidos o los lípidos es rota por un proceso denominado hidrodeseoxigenación (HDO). HDO significa la eliminación de oxígeno por medio de hidrógeno, es decir, el oxígeno se retira mientras que romper la estructura del material. dobles enlaces olefínicos son hidrogenados y cualquiera de los compuestos de azufre y nitrógeno se eliminan. La eliminación de azufre se denomina hidrodeseulfuración (HDS). El pretratamiento y la pureza de las materias primas (composición de lípidos o los lípidos) contribuyen a la vida útil del catalizador.

**[0231]** En general, en la etapa de HDO/HDS, el hidrógeno se mezcla con el material de alimentación (composición de los lípidos o los lípidos) y después la mezcla se pasa a través de un lecho de catalizador como un flujo en co-corriente, ya sea como una única fase o un material de alimentación de dos fases. Después de la etapa de HDO/MDS, la fracción de producto se separa y se pasa a un reactor de isomerización separada. Un reactor de isomerización para el material de partida biológico se describe en la literatura (FI 100 248) como un reactor co-corriente.

**[0232]** El procedimiento para producir un combustible mediante la hidrogenación de una alimentación de hidrocarburos, por ejemplo, la composición de los lípidos o los lípidos en el presente documento, también puede realizarse haciendo pasar la composición de los lípidos o los lípidos como un flujo en co-corriente con gas hidrógeno a través de una primera zona de hidrogenación, y a partir de entonces el efluente hidrocarbonado se hidrogena adicionalmente en una segunda zona de hidrogenación pasando gas de hidrógeno a la segunda zona de hidrogenación como un flujo en contracorriente con respecto al efluente de hidrocarburos. aplicaciones y catalizadores HDO ejemplares útiles para el craqueo de la composición de lípidos para producir olefinas C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> se describen en la

patente de los Estados Unidos. Nº 7.232.935.

**[0233]** Típicamente, en la etapa de hidrodesoxigenación, la estructura del componente biológico, tales como la composición de los lípidos o los lípidos en el presente documento, consiste en compuestos de oxígeno, nitrógeno, fósforo y azufre descompuestos, y se eliminan hidrocarburos ligeros como gas, y los enlaces olefínicos están hidrogenados. En el segundo paso del proceso, es decir, en el denominado paso de isomerización, la isomerización se lleva a cabo para la ramificación de la cadena de hidrocarburos y para mejorar el rendimiento de la parafina a bajas temperaturas.

**[0234]** En el primer paso, es decir, la etapa de HDO del proceso de craqueo, el gas de hidrógeno y la composición de los lípidos o los lípidos de la presente invención que van a ser hidrogenados se pasan a un sistema de lecho de catalizador HDO ya sea como flujos de co-corriente o contracorriente, comprendiendo dicho sistema de lecho de catalizador uno o más catalizador(es) de lecho, preferiblemente 1-3 lechos de catalizador. La etapa de HDO se hace funcionar normalmente de una manera co-corriente. En el caso de un sistema de lecho de catalizador de HDO que comprende dos o más lechos de catalizador, uno o más de los lechos pueden ser operados usando el principio de flujo a contracorriente. En la etapa de HDO, la presión varía entre 20 y 150 bar, preferiblemente entre 50 y 100 bar, y la temperatura varía entre 200 y 500°C, preferiblemente en el intervalo de 300-400°C. En la etapa de HDO, se pueden usar catalizadores de hidrogenación conocidos que contienen metales del Grupo VII y/o VIB del sistema periódico. Preferiblemente, los catalizadores de hidrogenación son compatibles Pd, Pt, Ni, NiMo o un catalizador de CoMo, siendo el soporte alúmina y/o sílice. Típicamente, se utilizan catalizadores NiMo/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> y CoMo/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

**[0235]** Antes de la etapa de HDO, la composición de lípidos o los lípidos en este documento pueden opcionalmente ser tratados por hidrogenación previa en condiciones más suaves, evitando así reacciones secundarias de los dobles enlaces. Tal hidrogenación previa se lleva a cabo en presencia de un catalizador de hidrogenación previa a temperaturas de 50-400°C y a presiones de hidrógeno de 1-200 bar (100 a 20000 kPa), preferiblemente a una temperatura entre 150 y 250°C y a una presión de hidrógeno entre 10 y 100 bar (1000-10000 kPa). El catalizador puede contener metales del grupo VIII y/o VIB del sistema periódico. Preferiblemente, el catalizador de hidrogenación previa es un catalizador de Pd, Pt, Ni, NiMo o un catalizador de CoMo, siendo el soporte alúmina y/o soportado sobre sílice.

**[0236]** Una corriente gaseosa de la etapa de HDO que contiene hidrógeno se enfría y luego compuestos de monóxido de carbono, dióxido de carbono, nitrógeno, fósforo y azufre, hidrocarburos ligeros gaseosos y otras impurezas se eliminan de la misma. Después de la compresión, el hidrógeno purificado o hidrógeno reciclado se devuelve de nuevo al primer lecho de catalizador y/o entre los lechos de catalizador para compensar la corriente de gas retirado. El agua se elimina del líquido condensado. El líquido se hace pasar al primer lecho de catalizador o entre los lechos de catalizador.

**[0237]** Después de la etapa de HDO, el producto se somete a una etapa de isomerización. Es sustancial para el proceso que las impurezas se eliminen lo más completamente posible antes de que los hidrocarburos se ponen en contacto con el catalizador de isomerización. La etapa de isomerización comprende una etapa de separación opcional, en la que el producto de reacción de la etapa de HDO puede purificarse mediante arrastre con vapor de agua o un gas adecuado tal como un hidrocarburo ligero, nitrógeno o hidrógeno. La etapa de separación opcional se lleva a cabo de una manera a contracorriente en una unidad de aguas arriba del catalizador de isomerización, en donde el gas y el líquido se ponen en contacto unos con otros, o antes de que el reactor de isomerización real en una unidad de separación separado utilizando el principio de contracorriente.

**[0238]** Después de la etapa de separación del gas de hidrógeno y la composición lipídica hidrogenado o lípidos en el presente documento, y opcionalmente una mezcla de n-parafina, se pasan a una unidad de isomerización reactiva que comprende uno o varios lecho(s) de catalizador. Los lechos de catalizador de la etapa de isomerización pueden funcionar ya sea en co-corriente o a contracorriente.

**[0239]** Es importante para el proceso que se aplique el principio de flujo a contracorriente en la etapa de isomerización. En la etapa de isomerización se hace esto mediante la realización de cualquiera de la etapa de separación opcional o la etapa de reacción de isomerización o ambos en forma de contracorriente. En la etapa de isomerización, la presión varía en el intervalo de 20-150 bar (2000-15.000 kPa), preferiblemente en el intervalo de 20-100 bar (2000-10000 kPa), la temperatura está comprendida entre 200 y 500°C, preferiblemente entre 300 y 400°C. En la etapa de isomerización, catalizadores de isomerización conocidos en la técnica pueden ser utilizados. Catalizadores de isomerización adecuados contienen un tamiz molecular y/o un metal del Grupo VII y/o un portador. Preferiblemente, el catalizador de isomerización contiene SAPO-11 o SAPO41 o ZSM-22 o ZSM-23 o ferrierita y Pt, Pd o Ni y Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> o SiO<sub>2</sub>. catalizadores de isomerización típicos son, por ejemplo, Pt/SAPO-11/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Pt/ZSM-22/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Pt/ZSM-23/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> y Pt/SAPO-11/SiO<sub>2</sub>. La etapa de isomerización y la etapa de HDO se pueden llevar a cabo en el mismo recipiente a presión o en recipientes a presión separados. Hidrogenación previa opcional se puede llevar a cabo en un recipiente de presión separado o en el mismo recipiente a presión como el HDO y pasos de isomerización.

**[0240]** Por lo tanto, en un ejemplo, el producto de una o más reacciones químicas es una mezcla de alcano que comprende HRJ- 5. En otra realización, el producto de las una o más reacciones químicas es una mezcla de alcano



que comprende combustible de avión ASTM D1655. En algunos ejemplos, la composición que se adecua al combustible de avión de la especificación de la norma ASTM 1655 tiene un contenido de azufre que es menor que 10 ppm. En otros ejemplos, la composición conforme al combustible de avión de la especificación de la norma ASTM 1655 tiene un valor de T10 de la curva de destilación de menos de 205°C. En otro ejemplo, la composición conforme al combustible de avión de la especificación de la norma ASTM 1655 tiene un punto de ebullición final (FBP) de menos de 300°C. En otro ejemplo, la composición conforme al combustible de avión de la especificación de la norma ASTM 1655 tiene un punto de inflamación de al menos 38°C. En otro ejemplo, la composición conforme al combustible de avión de la especificación de la norma ASTM 1655 tiene una densidad de entre 775K/M3 y 840K/M3. En otro ejemplo, la composición conforme al combustible de avión de la especificación de la norma ASTM 1655 tiene un punto de congelación que está por debajo de -47°C. En otro ejemplo, la composición conforme al combustible de avión de la especificación de la norma ASTM 1655 tiene un calor neto de combustión que es de al menos 42,8 MJ/K. En otro ejemplo, la composición conforme al combustible de avión de la especificación de la norma ASTM 1655 tiene un contenido de hidrógeno que es al menos 13,4% en masa. En otro ejemplo, la composición conforme al combustible de avión de la especificación de la norma ASTM 1655 tiene una estabilidad térmica, como se ha probado por JFTOT gravimétrica cuantitativa a 260°C, que está por debajo de 3 mm de Hg. En otro ejemplo, la composición conforme al combustible de avión de la especificación de la norma ASTM 1655 tiene una goma existente que está por debajo de 7 mg/dl.

**[0241]** Por lo tanto, la presente descripción proporciona una variedad de métodos en las que se realiza la modificación química de los lípidos de microalgas para producir productos útiles en una variedad de aplicaciones industriales y otros. Ejemplos de procedimientos de modificación de aceite producido por los métodos descritos en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, la hidrólisis del aceite, hidroprocesamiento del aceite, y la esterificación del aceite. Otros modificación química de los lípidos de microalgas incluyen, sin limitación, epoxidación, oxidación, hidrólisis, sulfataciones, sulfonación, etoxilación, propoxilación, amidación, y saponificación. La modificación del aceite de microalgas produce productos oleoquímicos básicos que se pueden modificar aún más en productos oleoquímicos derivados seleccionados para una función deseada. De una manera similar a la descrita anteriormente con referencia a alimentar los procesos de producción, estas modificaciones químicas también se pueden realizar en aceites generados a partir de los cultivos microbianos descritos en este documento. Ejemplos de productos oleoquímicos básicos incluyen, pero no se limitan a, los jabones, ácidos grasos, ésteres grasos, alcoholes grasos, compuestos de nitrógeno grasos incluyendo amidas grasas, ésteres metílicos de ácidos grasos y glicerol. Ejemplos de productos oleoquímicos derivados incluyen, pero no se limitan a, nitrilos grasos, ésteres, ácidos dímeros, quats, tensioactivos, alcanolamidas de ácidos grasos, sulfatos de alcoholes grasos, resinas, emulsionantes, alcoholes grasos, olefinas, lodos de perforación, polioles, poliuretanos, poliacrílatos, goma, velas, cosméticos, jabones metálicos, jabones, ésteres de metilo alfa-sulfonados, sulfatos de alcoholes grasos, etoxilatos de alcoholes grasos, sulfatos de éter de alcohol graso, imidazolin, agentes tensioactivos, detergentes, ésteres, quats, productos de ozonólisis, aminas grasas, alcanolamidas de ácidos grasos, etoxisulfatos, monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos (incluyendo triglicéridos de cadena media), lubricantes, fluidos hidráulicos, grasas, fluidos dieléctricos, agentes de desmoldeo, fluidos para el trabajo de metales, fluidos de transferencia de calor, otros fluidos funcionales, productos químicos industriales (por ejemplo, limpiadores, adyuvantes de procesamiento textil, plastificantes, estabilizadores, aditivos), recubrimientos de superficies, pinturas y lacas, aislamiento cableado eléctrico, y alcanos superiores.

**[0242]** La hidrólisis de los constituyentes de ácidos grasos de los glicerolípidos producidas por los métodos de la invención produce ácidos grasos libres que pueden derivatizarse para producir otros productos químicos útiles. La hidrólisis se produce en presencia de agua y un catalizador que puede ser o bien un ácido o una base. Los ácidos grasos libres liberados pueden ser derivatizados para producir una variedad de productos, como se informa en la siguiente: Patente de Estados Unidos N° 5,304,664 (ácidos grasos altamente sulfatados); 7,262,158 (composiciones de limpieza); 7,115,173 (composiciones de suavizante de telas); 6,342,208 (emulsiones para tratamiento de la piel); 7,264,886 (composiciones repelentes de agua); 6,924,333 (aditivos de pintura); 6.596.768 (piensos rumiantes enriquecidos en lípidos); y 6,380,410 (tensioactivos para detergentes y productos de limpieza).

**[0243]** En algunos procedimientos, el primer paso de modificación química puede ser de hidroprocesamiento para saturar los enlaces dobles, seguido de desoxigenación a temperatura elevada en presencia de hidrógeno y un catalizador. En otros métodos, la hidrogenación y la desoxigenación pueden ocurrir en la misma reacción. En todavía otros métodos, la desoxigenación se produce antes de la hidrogenación. La isomerización se puede realizar entonces opcionalmente, también en presencia de hidrógeno y un catalizador. Finalmente, los gases y los componentes de nafta se pueden eliminar si se desea. Por ejemplo, véanse las patentes 5475160 (de hidrogenación de triglicéridos) de Estados Unidos; 5.091.116 (desoxigenación, hidrogenación y eliminación de gas); 6.391.815 (de hidrogenación); y 5.888.947 (isomerización).

**[0244]** En algunos ejemplos de la divulgación, los aceites de triglicéridos son parcial o completamente desoxigenados. Las reacciones de desoxigenación forman productos deseados, incluyendo, sin limitación, ácidos grasos, alcoholes grasos, polioles, cetonas y aldehídos. En general, sin estar limitado por ninguna teoría en particular, las reacciones de desoxigenación implican una combinación de varias diferentes rutas de reacción, incluyendo sin limitación: hidrogenólisis, hidrogenación, hidrogenación-hidrogenólisis consecutivo, hidrogenólisis-hidrogenación consecutivo, y las reacciones de hidrogenación-hidrogenólisis combinadas, resultando en al menos la eliminación parcial de oxígeno del éster de ácido graso o ácido graso para producir productos de reacción, tales como alcoholes grasos, que pueden

ser convertidos fácilmente a los productos químicos deseados por el procesamiento posterior. Por ejemplo, un alcohol graso se puede convertir en olefinas través de la reacción FCC o a alcanos superiores a través de una reacción de condensación.

5 **[0245]** Una tal modificación química es la hidrogenación, que es la adición de hidrógeno a dobles enlaces en los componentes de ácido graso de glicerolípidos o de ácidos grasos libres. El proceso de hidrogenación permite la transformación de aceites líquidos en grasas semisólidas o sólidas, que pueden ser más adecuadas para aplicaciones específicas.

10 **[0246]** La hidrogenación del aceite producido por los métodos descritos en el presente documento puede realizarse en conjunción con uno o más de los métodos y/o materiales proporcionados en este documento, como se informa en las siguientes: Patentes de Estados Unidos N<sup>os</sup> 7,288,278 (aditivos o medicamentos de comida); 5,346,724 (productos de lubricación); 5,475,160 (alcoholes grasos); 5,091,116 (aceites comestibles); 6,808,737 (grasas estructurales para margarina y diferenciales); 5,298,637 (sustitutos de grasa reducidos en calorías); 6,391,815 (catalizador de hidrogenación y adsorbente de azufre); 5,233,099 y 5,233,100 (alcoholes grasos); 4,584,139 (catalizadores de hidrogenación); 6,057,375 (espuma de agentes supresores); y 7,118,773 (emulsiones comestibles).

20 **[0247]** Un experto en la técnica reconocerá que varios procesos se pueden usar para hidrogenar los hidratos de carbono. Un método adecuado incluye poner en contacto el hidrato de carbono con hidrógeno o hidrógeno mezclado con un gas adecuado y un catalizador bajo condiciones suficientes en un reactor de hidrogenación para formar un producto hidrogenado. El catalizador de hidrogenación generalmente puede incluir Cu, Re, Ni, Fe, Co, Ru, Pd, Rh, Pt, Os, Ir, y aleaciones o cualquier combinación de los mismos, ya sea solo o con promotores tales como W, Mo, Au, Ag, Cr, Zn, Mn, Sn, B, P, Bi, y aleaciones o cualquier combinación de los mismos. Otros materiales catalizadores de hidrogenación eficaces incluyen ya sea de níquel soportado o rutenio modificado con renio. En una realización, el catalizador de hidrogenación también incluye uno cualquiera de los soportes, dependiendo de la funcionalidad deseada del catalizador. Los catalizadores de hidrogenación se pueden preparar por métodos conocidos por los expertos normales en la técnica.

30 **[0248]** En algunos ejemplos el catalizador de hidrogenación incluye un catalizador de metal del Grupo VIII soportado y un material de esponja de metal (por ejemplo, un catalizador de níquel esponja). Níquel Raney proporciona un ejemplo de un catalizador de esponja de níquel activado adecuado para uso en esta invención. En otros ejemplos, la reacción de hidrogenación en la invención se realiza usando un catalizador que comprende un catalizador de níquel-renio o un catalizador de níquel tungsteno-modificado. Un ejemplo de un catalizador adecuado para la reacción de hidrogenación de la invención es un catalizador de níquel-renio soportado sobre carbono.

35 **[0249]** En un ejemplo, un catalizador de níquel Raney adecuado puede prepararse mediante el tratamiento de una aleación de cantidades aproximadamente iguales en peso de níquel y aluminio con una solución alcalina acuosa, por ejemplo, que contiene aproximadamente 25% en peso de hidróxido de sodio. El aluminio se disuelve selectivamente por la solución alcalina acuosa resultante en un material en forma de esponja que comprende principalmente níquel con cantidades menores de aluminio. La aleación inicial incluye metales promotores (es decir, de molibdeno o cromo) en la cantidad tal que aproximadamente 1 a 2% en peso permanece en el catalizador de esponja de níquel formado. En otro ejemplo, el catalizador de hidrogenación se prepara usando una solución de rutenio (iii) nitrosilnitrato, cloruro de rutenio (iii) en agua para impregnar un material de soporte adecuado. La solución se seca a continuación para formar un sólido que tiene un contenido de agua de menos de aproximadamente 1% en peso. El sólido se puede reducir a presión atmosférica en una corriente de hidrógeno a 300°C (sin calcinar) o 400°C (calcinado) en un horno de bola rotativo durante 4 horas. Después de enfriar y hacer inerte el catalizador con nitrógeno, 5% en volumen de oxígeno en nitrógeno se hace pasar sobre el catalizador durante 2 horas.

50 **[0250]** En determinados ejemplos, el catalizador descrito incluye un soporte de catalizador. El soporte del catalizador se estabiliza y es compatible con el catalizador. El tipo de soporte de catalizador utilizado depende del catalizador elegido y las condiciones de reacción. Los soportes adecuados para la invención incluyen, pero no se limitan a, carbono, sílice, sílice-alúmina, zirconia, titania, ceria, óxido de vanadio, nitrato, nitrato de boro, heteropolíácidos, hidroxiapatita, óxido de zinc, óxido de cromo, las zeolitas, los nanotubos de carbono, fullereno de carbono y cualquier combinación de los mismos.

55 **[0251]** Los catalizadores usados en esta invención se pueden preparar usando métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica. Los métodos adecuados pueden incluir, pero no se limitan a, humectación incipiente, impregnación por evaporación, deposición de vapor químico, recubrimiento por lavado, las técnicas de pulverización de magnetron, y similares.

60 **[0252]** Las condiciones para llevar a cabo la reacción de hidrogenación pueden variar en función del tipo de material de partida y los productos deseados. Un experto ordinario en la técnica, con el beneficio de esta descripción, reconocerá las condiciones de reacción apropiadas. En general, la reacción de hidrogenación se lleva a cabo a temperaturas de 80°C a 250°C, y preferiblemente a 90°C a 200°C, y lo más preferiblemente de 100°C a 150°C. En algunas realizaciones, la reacción de hidrogenación se lleva a cabo a presiones de 500 KPa a 14.000 KPa.

65

**[0253]** El hidrógeno utilizado en la reacción de hidrogenólisis de la divulgación actual puede incluir hidrógeno externo, hidrógeno reciclado, generado in situ de hidrógeno, y cualquier combinación de los mismos. Tal como se utiliza aquí, el término "hidrógeno externo" se refiere a hidrógeno que no se origina de la reacción de la biomasa misma, sino que se añade más bien al sistema de otra fuente.

**[0254]** En algunos ejemplos de la divulgación, es deseable convertir los hidratos de carbono a partir de una molécula más pequeña que se convertirá más fácilmente en hidrocarburos superiores deseados. Un método adecuado para esta conversión es a través de una reacción de hidrogenólisis. Se conocen diversos procedimientos para llevar a cabo la hidrogenólisis de hidratos de carbono. Un método adecuado incluye poner en contacto un hidrato de carbono con hidrógeno o hidrógeno mezclado con un gas adecuado y un catalizador de hidrogenólisis en un reactor de hidrogenólisis en condiciones suficientes para formar un producto de reacción que comprende moléculas o polioles más pequeños. Tal como se utiliza aquí, el término "moléculas más pequeñas o polioles" incluye cualquier molécula que tiene un peso molecular más pequeño, que puede incluir un número menor de átomos de carbono o átomos de oxígeno que el hidrato de carbono de partida. En un ejemplo, los productos de reacción incluyen moléculas pequeñas que incluyen polioles y alcoholes. Alguien de habilidad ordinaria en la técnica sería capaz de seleccionar el método apropiado mediante el cual llevar a cabo la reacción de hidrogenólisis.

**[0255]** En algunos ejemplos, un azúcar o alcohol de azúcar 5 y/o 6 de carbono se puede convertir en propilenglicol, etilenglicol y glicerol usando un catalizador de hidrogenólisis. El catalizador de hidrogenólisis puede incluir Cr, Mo, W, Re, Mn, Cu, Cd, Fe, Co, Ni, Pt, Pd, Rh, Ru, Ir, Os, y aleaciones o cualquier combinación de los mismos, ya sea solo o con promotores tales como Au, Ag, Cr, Zn, Mn, Sn, Bi, B, o, y aleaciones o cualquier combinación de los mismos. El catalizador de hidrogenólisis puede incluir también un catalizador piropolímero carbonoso que contiene metales de transición (por ejemplo, cromo, molibdeno, tungsteno, renio, manganeso, cobre, cadmio) o metales del Grupo VIII (por ejemplo, hierro, cobalto, níquel, platino, paladio, rodio, rutenio, iridio y osmio). En determinados ejemplos, el catalizador de hidrogenólisis puede incluir cualquiera de los metales anteriores combinados con un óxido de metal alcalinotérreo o adheridos a un soporte catalíticamente activo. En determinados ejemplos, el catalizador descrito en la reacción de hidrogenólisis puede incluir un soporte de catalizador tal como se describe anteriormente para la reacción de hidrogenación.

**[0256]** Las condiciones para llevar a cabo la reacción de hidrogenólisis varían en función del tipo de material de partida y los productos deseados. Un experto ordinario en la técnica, con el beneficio de esta descripción, reconocerá las condiciones apropiadas para usar para llevar a cabo la reacción. En general, la reacción de hidrogenólisis se realiza a temperaturas de 110°C a 300°C, y preferiblemente de 170°C a 220°C, y lo más preferiblemente de 200°C a 225°C. En algunos ejemplos, la reacción de hidrogenólisis se lleva a cabo en condiciones básicas, preferiblemente a un pH de 8 a 13, e incluso más preferiblemente a un pH de 10 a 12. En algunos ejemplos, la reacción de hidrogenólisis se lleva a cabo a presiones en un intervalo entre 60 KPa y 16.500 KPa, y preferiblemente en un intervalo de entre 1.700 KPa y 14.000 KPa, y aún más preferiblemente entre 4.800 KPa y 11.000 KPa.

**[0257]** El hidrógeno utilizado en la reacción de hidrogenólisis de la presente invención puede incluir hidrógeno externo, hidrógeno reciclado, hidrógeno generado in situ de, y cualquier combinación de los mismos.

**[0258]** En algunos ejemplos, los productos de reacción descritos anteriormente se pueden convertir en hidrocarburos superiores a través de una reacción de condensación en un reactor de condensación. En tales ejemplos, la condensación de los productos de reacción se produce en presencia de un catalizador capaz de formar hidrocarburos superiores. Si bien no se pretende estar limitado por la teoría, se cree que la producción de hidrocarburos superiores procede a través de una reacción de adición por etapas incluyendo la formación de carbono-carbono, o enlace carbono-oxígeno. Los productos de reacción resultantes incluyen cualquier número de compuestos que contienen estos restos, como se describe en más detalle a continuación.

**[0259]** En ciertos ejemplos, los catalizadores de condensación adecuados incluyen un catalizador ácido, un catalizador base, o un catalizador ácido/base. Tal como se utiliza aquí, el término "catalizador ácido/base" se refiere a un catalizador que tiene tanto un ácido como una funcionalidad de base. En algunos ejemplos el catalizador de condensación puede incluir, sin limitación, zeolitas, carburos, nitruros, óxido de circonio, alúmina, sílice, aluminosilicatos, fosfatos, óxidos de titanio, óxidos de zinc, óxidos de vanadio, óxidos de lantano, óxidos de itrio, óxidos de escandio, óxidos de magnesio, óxidos de cerio, óxidos de bario, óxidos de calcio, hidróxidos, heteropolíácidos, ácidos inorgánicos, resinas modificadas de ácido, resinas de base modificada, y cualquier combinación de los mismos. En algunos ejemplos, el catalizador de condensación puede incluir también un modificador. Modificadores adecuados incluyen La, Y, Sc, P, B, Bi, Li, Na, K, Rb, Cs, Mg, Ca, Sr, Ba, y cualquier combinación de los mismos. En algunos ejemplos, el catalizador de condensación puede incluir también un metal. Los metales adecuados incluyen Cu, Ag, Au, Pt, Ni, Fe, Co, Ru, Zn, Cd, Ga, In, Rh, Pd, Ir, Re, Mn, Cr, Mo, W, Sn, Os, aleaciones, y cualquier combinación de los mismos.

**[0260]** En determinados ejemplos, el catalizador descrito en la reacción de condensación puede incluir un soporte de catalizador como se ha descrito anteriormente para la reacción de hidrogenación. En determinados ejemplos, el catalizador de condensación es autoportante. Tal como se utiliza aquí, el término "autoportante" significa que el catalizador no necesita otro material que sirva de apoyo. En otros ejemplos, el catalizador de condensación se utiliza

conjuntamente con un soporte separado adecuado para la suspensión del catalizador. En un ejemplo, el soporte de catalizador de condensación es sílice.

**[0261]** Las condiciones bajo las que se produce la reacción de condensación variarán en función del tipo de material de partida y los productos deseados. Un experto ordinario en la técnica, con el beneficio de esta descripción, reconocerá las condiciones apropiadas para usar para llevar a cabo la reacción. En algunos ejemplos, la reacción de condensación se lleva a cabo a una temperatura a la que la termodinámica de la reacción propuesta son favorables. La temperatura para la reacción de condensación variará en función del poliol de partida específico o alcohol. En algunos ejemplos, la temperatura para la reacción de condensación se encuentra en un intervalo de 80°C a 500°C, y preferiblemente de 125°C a 450°C, y más preferiblemente de 125°C a 250°C. En algunos ejemplos, la reacción de condensación se lleva a cabo a presiones en un intervalo entre 0 kPa a 9000 kPa, y preferiblemente en un intervalo entre 0 kPa y 7000 kPa, y aún más preferiblemente entre 0 kPa y 5000 kPa.

**[0262]** Los alcanos superiores formados por la invención incluyen, pero no se limitan a, alcanos de cadena lineal o ramificada que tienen de 4 a 30 átomos de carbono, alquenos de cadena lineal o ramificada que tienen de 4 a 30 átomos de carbono, cicloalcanos que tienen de 5 a 30 átomos de carbono, cicloalquenos que tienen de 5 a 30 átomos de carbono, arilos, arilos fusionados, alcoholes y cetonas. alcanos adecuados incluyen, pero no se limitan a, butano, pentano, penteno, 2-metilbutano, hexano, hexeno, 2-metilpentano, 3-metilpentano, 2,2-dimetilbutano, 2,3-dimetilbutano, heptano, hepteno, octano, octeno, 2,2,4-trimetilpentano, hexano 2,3-dimetilo, 2,3,4-trimetilpentano, 2,3-dimetilpentano, nonano, noneno, decano, deceno, undecano, undeceno, dodecano, dodeceno, tridecano, trideceno, tetradecano, tetradeceno, pentadecano, pentadeceno, nonildecano, nonildeceno, eicosano, eicoseno, uneicosano, uneicoseno, doeicosano, doeicoseno, trieicosano, trieicoseno, tetraeicosano, tetraeicoseno, e isómeros de los mismos. Algunos de estos productos pueden ser adecuados para su uso como combustibles.

**[0263]** En algunas realizaciones, los cicloalcanos y los cicloalquenos son no sustituidos. En otras realizaciones, los cicloalcanos y cicloalquenos son mono-sustituidos. En todavía otras realizaciones, los cicloalcanos y cicloalquenos son multi-sustituidos. En las realizaciones que comprenden los cicloalcanos y cicloalquenos sustituidos, el grupo sustituido incluye, sin limitación, un alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene de 1 a 12 átomos de carbono, un alquileo de cadena lineal o ramificada que tiene de 1 a 12 átomos de carbono, un fenilo, y cualquier combinación de los mismos. Cicloalcanos y cicloalquenos adecuados incluyen, pero no se limitan a, ciclopentano, ciclopenteno, ciclohexano, ciclohexeno, metil-ciclopentano, metil-ciclopenteno, etil-ciclopentano, etil-ciclopenteno, etil-ciclohexano, etil-ciclohexeno, isómeros y cualquier combinación de los mismos.

**[0264]** En algunas realizaciones, los arilos formados son no sustituidos. En otra realización, los arilos formados son monosustituidos. En las realizaciones que comprenden los arilos sustituidos, el grupo sustituido incluye, sin limitación, un alquilo de cadena lineal o ramificada que tiene de 1 a 12 átomos de carbono, un alquileo ramificado o de cadena lineal que tiene 1 a 12 átomos de carbono, un fenilo, y cualquier combinación de los mismos. Arilos adecuados para la invención incluyen, pero no se limitan a, benceno, tolueno, xileno, etilbenceno, párrafo xileno, xileno meta, y cualquier combinación de los mismos.

**[0265]** Los alcoholes producidos en la invención tienen de 4 a 30 átomos de carbono. En algunas realizaciones, los alcoholes son cíclicos. En otras formas de realización, los alcoholes son ramificados. En otra realización, los alcoholes son de cadena lineal. Los alcoholes adecuados para la invención incluyen, pero no se limitan a, butanol, pentanol, hexanol, heptanol, octanol, nonanol, decanol, undecanol, dodecanol, tridecanol, tetradecanol, pentadecanol, hexadecanol, heptildecanol, octildecanol, nonildecanol, eicosanol, uneicosanol, doeicosanol, trieicosanol, tetraeicosanol, y sus isómeros.

**[0266]** Las cetonas producidas en la invención tienen de 4 a 30 átomos de carbono. En una realización, las cetonas son cíclicas. En otra realización, las cetonas son ramificadas. En otra realización, las cetonas son de cadena lineal. Cetonas adecuadas para la invención incluyen, pero no se limitan a, butanona, pentanona, hexanona, heptanona, octanona, nonanona, decanona, undecanona, dodecanona, tridecanona, tetradecanona, pentadecanona, hexadecanona, heptildecanona, octildecanona, nonildecanona, eicosanona, uneicosanona, doeicosanona, trieicosanona, tetraeicosanona, y sus isómeros.

**[0267]** Otra tal modificación química es la interesterificación. glicerolípidos producidos naturalmente no tienen una distribución uniforme de los constituyentes de ácidos grasos. En el contexto de los aceites, interesterificación se refiere al intercambio de radicales acilo entre dos ésteres de diferentes glicerolípidos. El proceso de interesterificación proporciona un mecanismo por el cual los constituyentes de ácidos grasos de una mezcla de glicerolípidos se pueden reorganizar para modificar el patrón de distribución. La interesterificación es un proceso químico conocido, y en general comprende el calentamiento (a aproximadamente 200°C) una mezcla de aceites durante un período (por ejemplo, 30 minutos) en presencia de un catalizador, tal como un metal alcalino o alquilato de metal alcalino (por ejemplo, metóxido de sodio). Este proceso se puede utilizar para aleatorizar el patrón de distribución de los constituyentes de ácidos grasos de una mezcla de aceite, o puede ser dirigido para producir un patrón de distribución deseado. Este método de modificación química de los lípidos se puede realizar en materiales proporcionados en este documento, como la biomasa microbiana con un porcentaje de peso de células secas como lípido de al menos 20%.

**[0268]** Interesterificación dirigida, en la que se busca un patrón de distribución específica de ácidos grasos, se puede realizar mediante el mantenimiento de la mezcla de aceite a una temperatura por debajo del punto de algunas TAG que puedan producir la fusión. Esto resulta en la cristalización selectiva de estas TAG, que los elimina eficazmente de la mezcla de reacción cuando se cristalizan. El proceso puede continuar hasta que la mayoría de los ácidos grasos en el aceite han precipitado, por ejemplo. Un proceso de interesterificación dirigido se puede utilizar, por ejemplo, para producir un producto con un contenido calórico inferior a través de la sustitución de los ácidos grasos de cadena más larga con sus homólogos de cadena más corta. La interesterificación dirigida también se puede utilizar para producir un producto con una mezcla de grasas que pueden proporcionar características de fusión deseadas y las características estructurales que se buscan en aditivos alimentarios o productos (por ejemplo, margarina) sin recurrir a la hidrogenación, que puede producir isómeros trans no deseados.

**[0269]** La interesterificación de aceites producidos por los métodos descritos en el presente documento puede realizarse en conjunción con uno o más de los métodos y/o materiales, o para producir productos, como se informa en las siguientes: Patente de Estados Unidos N<sup>o</sup> 6,080,853 (sustitutos de grasas no digeribles); 4,288,378 (estabilizador de mantequilla de cacahuete); 5,391,383 (aceite en aerosol comestible); 6,022,577 (grasas comestibles para productos alimenticios); 5,434,278 (grasas comestibles para productos alimenticios); 5,268,192 (productos de nueces bajos en calorías); 5,258,197 (composiciones comestibles calorías reducidas); 4,335,156 (producto de grasa comestible); 7,288,278 (aditivos alimentarios o medicamentos); 7,115,760 (procedimiento de fraccionamiento); 6,808,737 (grasas estructurales); 5,888,947 (lubricantes de motor); 5,686,131 (mezclas de aceite comestible); y 4,603,188 (composiciones de uretano curable).

**[0270]** En un ejemplo de acuerdo con la divulgación, la transesterificación del aceite, como se describe anteriormente, es seguida por la reacción del producto transesterificado con poliol, como se informa en la Patente de Estados Unidos N<sup>o</sup> 6.465.642, para producir poliésteres de ácido graso de poliol. Tal proceso de esterificación y la separación pueden comprender las etapas de la siguiente manera: hacer reaccionar un éster de alquilo inferior con poliol en presencia de jabón; la eliminación de jabón residual de la mezcla del producto; lavado con agua y secado de la mezcla del producto para eliminar las impurezas; blanqueo de la mezcla del producto para el refinamiento; separar al menos una porción del éster de alquilo inferior sin reaccionar a partir del poliéster de ácido graso de poliol en la mezcla de productos; y reciclar el éster de alquilo inferior sin reaccionar separado.

**[0271]** La transesterificación también se puede realizar sobre la biomasa microbiana con ésteres de ácidos grasos de cadena corta, como se informa en la Patente de EE.UU. 6.278.006. En general, la transesterificación puede llevarse a cabo mediante la adición de un éster de ácido graso de cadena corta a un aceite en presencia de un catalizador adecuado y calentando la mezcla. En algunos ejemplos, el aceite comprende de aproximadamente 5% a aproximadamente 90% de la mezcla de reacción en peso. En algunos ejemplos, los ésteres de ácidos grasos de cadena corta pueden ser de aproximadamente 10% a aproximadamente 50% de la mezcla de reacción en peso. Los ejemplos no limitantes de catalizadores incluyen catalizadores básicos, metóxido sódico, catalizadores ácidos incluyen ácidos inorgánicos tales como ácido sulfúrico y arcillas acidificadas, ácidos orgánicos tales como ácido metanosulfónico, ácido bencenosulfónico y ácido toluenosulfónico, y resinas ácidas tales como Amberlyst 15. Metales tales como el sodio y el magnesio, y el metal hidruros también son catalizadores útiles.

**[0272]** Otra tal modificación química es la hidroxilación, que implica la adición de agua a un doble enlace resultante de la saturación y la incorporación de un resto hidroxilo. El proceso de hidroxilación proporciona un mecanismo para la conversión de uno o más constituyentes de ácidos grasos de un glicerolípido a un ácido graso hidroxilado. La hidroxilación puede realizarse, por ejemplo, a través del método descrito en la Patente de Estados Unidos N<sup>o</sup> 5.576.027. Ácidos grasos hidroxilados, incluyendo aceite de ricino y sus derivados, son útiles como componentes en varias aplicaciones industriales, incluyendo los aditivos, agentes tensioactivos, agentes humectantes de pigmentos, agentes antiespumantes, aditivos impermeabilizantes, agentes plastificantes, agentes emulsionantes cosméticos y/o agentes desodorantes, así como en electrónica, productos farmacéuticos, pinturas, tintas, adhesivos, y lubricantes. Un ejemplo de cómo la hidroxilación de un glicérido puede ser realizada es la siguiente: grasa se puede calentar, preferiblemente a aproximadamente 30-50°C combinada con heptano y se mantiene a temperatura durante treinta minutos o más; ácido acético puede entonces ser añadido a la mezcla seguido de una solución acuosa de ácido sulfúrico seguido de una solución de peróxido de hidrógeno acuoso al que se añade en pequeños incrementos a la mezcla durante una hora; después del peróxido de hidrógeno acuoso, la temperatura se puede aumentar hasta al menos aproximadamente 60°C y se agita durante al menos seis horas; después de la agitación, la mezcla se deja sedimentar y una capa acuosa inferior formada por la reacción puede eliminarse mientras que la capa de heptano superior formada por la reacción se puede lavar con agua caliente que tiene una temperatura de aproximadamente 60°C; la capa de heptano lavada puede ser neutralizada con una solución acuosa de hidróxido potásico a un pH de aproximadamente 5 a 7 y luego se retira por destilación al vacío; el producto de reacción se puede secar a vacío a 100°C y el producto secado se desodoriza con vapor en condiciones de vacío y se filtra a aproximadamente 50° a 60°C utilizando tierra de diatomeas.

**[0273]** La hidroxilación de aceites microbianos producidos por los métodos descritos en el presente documento puede realizarse en conjunción con uno o más de los métodos y/o materiales, o para producir productos, como se informa en las siguientes: N<sup>o</sup> 6,590,113 (revestimientos y tinta a base de aceite de patente de EE.UU.); 4,049,724 (proceso de hidroxilación); 6,113,971 (mantequilla de aceite de oliva); 4,992,189 (aditivos lubricantes y lubricantes); 5,576,027

(leche hidroxilada); y 6,869,597 (cosméticos).

**[0274]** Glicerolípidos hidroxilados se pueden convertir a estóolidos. Estóolidos consisten en un glicerolípido en el que un constituyente de ácido graso hidroxilado se ha esterificado con otra molécula de ácido graso. La conversión de glicerolípidos hidroxilados a estóolidos puede llevarse a cabo calentando una mezcla de glicerolípidos y ácidos grasos y en contacto la mezcla con un ácido mineral, como se describe por Isbell et al, JAOCS 71 (2): 169-174 (1994). Estóolidos son útiles en una variedad de aplicaciones, incluyendo sin limitación los descritos en lo siguiente: Patente de Estados Unidos N° 7.196.124 (materiales elastoméricos y revestimientos para el suelo); 5,458,795 (aceites espesados para aplicaciones de alta temperatura); 5,451,332 (fluidos para aplicaciones industriales); 5,427,704 (aditivos de combustible); y 5,380,894 (lubricantes, grasas, plastificantes, y tintas de impresión).

**[0275]** Otra tal modificación química es la metátesis de olefinas. En metátesis de olefinas, un catalizador separa los carbonos alquilideno en un alqueno (olefina) y forma nuevos alquenos por el emparejamiento de cada uno de ellos con diferentes carbonos alquilidino. La reacción de metátesis de olefinas proporciona un mecanismo para procesos tales como el truncamiento de cadenas de alquilo de ácidos grasos insaturados en alquenos por etenólisis, reticulación de ácidos grasos a través de los vínculos de alqueno por la auto-metátesis, y la incorporación de nuevos grupos funcionales en ácidos grasos por metátesis cruzada con alquenos derivatizados.

**[0276]** En conjunto con otras reacciones, tales como transesterificación y hidrogenación, metátesis de olefinas puede transformar glicerolípidos insaturados en diversos productos finales. Estos productos incluyen oligómeros glicerolípido para ceras; glicerolípidos de cadena corta para lubricantes; cadenas de alquilo homo- y hetero-bifuncionales para los productos químicos y polímeros; ésteres para biocombustible de cadena corta; e hidrocarburos de cadena corta para combustible de avión. La metátesis de olefinas se puede realizar en los triacilglicerol y derivados de ácidos grasos, por ejemplo, usando los catalizadores y métodos descritos en la Patente de Estados Unidos N° 7,119,216, Pub. De Patente de EE.UU. N° 2010/0160506, y la Pub. de patente de EE.UU. N° 2010/0145086.

**[0277]** La metátesis de olefinas de bio-aceites generalmente comprende la adición de una solución de catalizador de Ru a una carga de aproximadamente 10 a 250 ppm en condiciones inertes a ésteres de ácidos grasos insaturados en presencia (metátesis cruzada) o ausencia (auto-metátesis) de otros alquenos. Las reacciones se dejaron proceder típicamente de horas a días y, finalmente, se produce una distribución de productos de alqueno. Un ejemplo de cómo la metátesis de olefinas se puede realizar en un derivado de ácido graso es como sigue: Una solución de la primera generación de catalizador de Grubbs (dicloro[2(1-metiletoxi- $\alpha$ -O)fenil]metilen- $\alpha$ -C] (triciclohexilfosfina) en tolueno a una carga de catalizador de 222 ppm puede ser añadido a un recipiente que contiene oleato de metilo desgasificado y seco. A continuación, el recipiente puede ser presurizado con aproximadamente 60 psig de gas etileno y se mantiene a o por debajo de aproximadamente 30°C durante 3 horas, con lo que aproximadamente puede producirse un rendimiento del 50% de metil 9-decenoato.

**[0278]** La metátesis de olefinas de aceites producidos por los métodos descritos en el presente documento puede realizarse en conjunción con uno o más de los métodos y/o materiales, o para producir productos, como se informa en la siguiente: Sol. de Patente PCT/US07/081427 (ácidos grasos  $\alpha$ -olefina) y Sol. de Patente de EE.UU. N°s 12/281,938 (cremas petróleo), 12/281.931 (cápsulas de pistola de paintball), 12/653.742 (plastificantes y lubricantes), 12/422,096 (compuestos orgánicos bifuncionales), y 11/795.052 (cera para velas).

**[0279]** Otras reacciones químicas que se pueden realizar en aceites microbianos incluyen hacer reaccionar triglicéridos con un agente de ciclopropanación para mejorar la fluidez y/o estabilidad a la oxidación, como se informa en la patente de EE.UU. 6.051.539; fabricación de ceras de triglicéridos, como se informa en la patente de EE.UU. 6.770.104; y epoxidación de triacilglicerol, como se informa en "The effect of fatty acid composition on the acrylation kinetics of epoxidized triacylglycerols", Journal of the American Oil Chemists' Society, 79:1, 59-63, (2001) y Free Radical Biology and Medicine, 37:1, 104-114 (2004).

**[0280]** La generación de biomasa microbiana de aceite de cojinete para el combustible y productos químicos como se describe anteriormente da como resultado la producción de harina de biomasa sin lípidos. Comida sin lípidos es un subproducto de la preparación de aceite de algas y es útil como alimento para animales de granja, por ejemplo, rumiantes, aves de corral, cerdos y la acuicultura. La harina resultante, aunque de reducido contenido de aceite, todavía contiene proteínas de alta calidad, hidratos de carbono, fibra, ceniza, aceite residual y otros nutrientes apropiados para un alimento para animales. Debido a que las células se lisaron predominantemente por el proceso de separación de aceite, la comida sin lípidos es fácilmente digerible por dichos animales. Comida sin lípidos opcionalmente se puede combinar con otros ingredientes, tales como grano, en un alimento para animales. Debido a que la comida sin lípidos tiene una consistencia de polvo, puede ser presionada en gránulos utilizando una extrusora o expansor u otro tipo de máquina, que están disponibles comercialmente.

**[0281]** La invención, habiendo sido descrita en detalle anteriormente, se ejemplifica en los siguientes ejemplos, que se ofrecen para ilustrar, pero no limitar, la invención reivindicada.

#### XIV. EJEMPLOS

**EJEMPLO 1: ANÁLISIS DE ÁCIDOS GRASOS POR DETECCIÓN DE ESTER METÍLICO DE ÁCIDOS GRASOS**

[0282] Muestras de lípidos se preparan a partir de biomasa seca. 20-40 mg de biomasa seca se resuspendió en 2 ml de 5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en MeOH, y 200 µl de tolueno que contiene una cantidad apropiada de un patrón interno adecuado (C19: 0) se añadió. La mezcla se soncó brevemente para dispersar la biomasa, después se calentó a 70 -75°C durante 3,5 horas. se añadieron 2 ml de heptano para extraer los ésteres metílicos de ácidos grasos, seguido de la adición de 2 ml de 6% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Ac) para neutralizar el ácido. La mezcla se agita vigorosamente, y una porción de la capa superior se transfirió a un vial que contenía Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Anhidro) para el análisis de cromatografía de gases usando métodos estándar de FAME GC/FID (detección de ionización de llama de cromatografía de gas de éster metílico del ácido graso).

**EJEMPLO 2: PURIFICACIÓN DE TRIACILGLICÉRIDO A PARTIR DE ACEITE Y MÉTODOS PARA DIGESTION DE LIPASA DE TRIACILGLICÉRIDO**

[0283] La fracción de triacilglícidos (TAG) de cada muestra de aceite se aisló disolviendo ~10 mg de aceite en diclorometano y cargarlo en un cartucho de extracción de Bond-Elut aminopropil en fase sólida (500 mg) acondicionado previamente con heptano. TAG se eluyeron con diclorometano-MeOH (1: 1) en un tubo de recogida, mientras que los lípidos polares fueron retenidos en la columna. El disolvente se eliminó con una corriente de gas nitrógeno. Tampón Tris y 2 mg de lipasa pancreática porcina (tipo II, Sigma, 100-400 unidades/mg) se añadieron a la fracción TAG, seguido de la adición de soluciones de sal y cloruro de calcio biliares. La lipasa pancreática porcina escinde ácidos grasos sn-1 y sn-3, generando de esta manera 2-monoacilglícidos y ácidos grasos libres. Esta mezcla se calentó con agitación a 40°C durante tres minutos, se enfrió brevemente, después se inactivó con 6 N de HCl. Después, la mezcla se extrajo con éter dietílico y la capa de éter se lavó con agua y después se secó sobre sulfato de sodio. El disolvente se eliminó con una corriente de nitrógeno. Para aislar la fracción de monoacilglícido (MAG), el residuo se disolvió en heptano y se cargó en un segundo cartucho de extracción en fase sólida de aminopropil pretratado con heptano. TAG residuales se eluyeron con éter dietílico-diclorometano-heptano (1: 9: 40), diacilglícidos (DAG) se eluyeron con acetato de etilo-heptano (1: 4), y MAG se eluyeron desde el cartucho con diclorometano-metanol (2: 1). El MAG resultante, DAG, y fracciones de TAG se concentraron a sequedad con una corriente de nitrógeno y se sometieron al método de transesterificación directa de análisis GC/FID como se ha descrito en el Ejemplo 1.

**EJEMPLO 3: INGENIERÍA DE MICROORGANISMOS PARA LOS ÁCIDOS GRASOS Y PERFILES DE SN-2 AUMENTADOS EN ÁCIDO LÁURICO A TRAVÉS DE EXPRESIÓN LPAAT EXÓGENA**

[0284] Este ejemplo describe el uso de polinucleótidos recombinantes que codifican una enzima de aciltransferasa *C. nucifera* 1-acil-sn-glicerol 3-fosfato (*cn* LPAAT) para diseñar un microorganismo en el que el perfil de ácidos grasos y el perfil sn-2 del microorganismo transformado se ha enriquecido en ácido láurico.

[0285] Una cepa mutagenizada clásicamente de *Prototheca moriformis* (UTEX 1435), Cepa A, se transformó inicialmente con el constructo plasmídico pSZ1283 de acuerdo con métodos de transformación biolística, como se describe en el documento PCT/US2009/066141, PCT/US2009/066142, PCT/US2011/038463, PCT/US2011/038464, y PCT/US2012/023696. pSZ1283, que se describe en el documento PCT/US2011/038463, PCT/US2011/038464, y PCT/US2012/023696, contenía la secuencia de codificación de la tioesterasa *Cuphea wrightii* FATB2 (*cwTE2*) (SEQ ID NO: 10), 5' (SEQ ID NO: 1) y 3' (SEQ ID NO: 2) secuencias de orientación recombinantes homólogas (que flanquean el constructo) a la región genómica 6S para la integración en el genoma nuclear y una región codificante de la invertasa de sacarosa *S. cerevisiae* SUC2 (SEQ ID NO: 4), para expresar la secuencia de la proteína dada en SEQ ID NO: 3, bajo el control de promotor β-tubulina/5'UTR *C. reinhardtii* (SEQ ID NO: 5) y nitrato reductasa 3' UTR *Chlorella vulgaris* (SEQ ID NO: 6). Este casete de expresión *S. cerevisiae* SUC2 se muestra como SEQ ID NO: 7 y sirvió como un marcador seleccionable. La secuencia de codificación de proteína *CwTE2* para expresar la secuencia de la proteína dada en SEQ ID NO: 11, estaba bajo el control del promotor *P. moriformis* Amt03/5'UTR (SEQ ID NO: 8) y nitrato reductasa 3'UTR *C. vulgaris*. La proteína de regiones de codificación *CwTE2* y *suc2* fueron optimizados por codones para reflejar el sesgo de codón inherente en genes nucleares UTEX 1435 *P. moriformis* como se describe en el documento PCT/US2009/066141, PCT/US2009/066142, PCT/US2011/038463, PCT/US2011/038464, y PCT/US2012/023696.

[0286] Tras la transformación de pSZ1283 en la cepa A, se seleccionaron los clones positivos en placas de agar con sacarosa como única fuente de carbono. Los transformantes primarios fueron entonces purificados clonalmente y un único transformante, cepa B, se seleccionó para su posterior modificación genética. Esta cepa de ingeniería genética se transformó con construcción de plásmido pSZ2046 para interrumpir el locus genómico pLoop de la cepa B. El constructo pSZ2046 comprendía la secuencia codificante de la enzima de aciltransferasa de 1-acil-sn-glicerol-3-fosfato *C. nucifera* (*cn* LPAAT) (SEQ ID NO: 12), 5' (SEQ ID NO: 13) y 3' (SEQ ID NO: 14) secuencias homólogas de recombinación de orientación (que flanquean el constructo) a la región genómica pLoop para la integración en el genoma nuclear y una secuencia de resistencia a la neomicina que codifica la proteína bajo el control de promotor β-tubulina/5'UTR *C. reinhardtii* (SEQ ID NO: 5), y nitrato reductasa 3' UTR *Chlorella vulgaris* (SEQ ID NO: 6). Este casete de expresión NeoR se muestra como SEQ ID NO: 15 y sirvió como un marcador seleccionable. La secuencia de codificación de la proteína *Cn* LPAAT estaba bajo el control del promotor Amt03/5'UTR *P. moriformis* (SEQ ID NO: 8) y nitrato reductasa 3'UTR *C. vulgaris*. Las regiones de codificación de proteína de *Cn* LPAAT y NeoR eran codones

optimizados para reflejar el sesgo de codón inherente en genes nucleares UTEX 1435 *P. moriformis* como se describe en el documento PCT/US2009/066141, PCT/US2009/066142, PCT/US2011/038463, PCT/US2011/038464, y PCT/US2012/023696. La secuencia de aminoácidos de *Cn LPAAT* se proporciona como SEQ ID NO: 16.

[0287] Tras la transformación de pSZ2046 en la cepa B, generando de este modo la cepa C, se seleccionaron los clones positivos en placas de agar que contienen G418 (Geneticina). Los transformantes individuales fueron clonalmente purificados y se cultivaron a pH 7,0 en condiciones adecuadas para la producción de lípidos tal como se detalla en el documento PCT/US2009/066141, PCT/US2009/066142, PCT/US2011/038463, PCT/US2011/038464, y PCT/US2012/023696. muestras de lípidos se prepararon a partir de biomasa seca de cada transformante y de perfiles de ácidos grasos de estas muestras se analizaron usando métodos de detección de ionización de llama de cromatografía de gases de éster metílico de ácido graso estándar (FAME GC/FID) como se describe en el Ejemplo 1. Los perfiles de ácido graso (expresados como Área% de ácidos grasos totales) de UTEX 1435 *P. moriformis* (U1) cultivado en glucosa como única fuente de carbono, sin transformar la cepa B y cinco pSZ2046 transformantes positivos (cepa C, 1-5) se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6. Efecto de la expresión LPAAT en los perfiles de ácidos grasos de *Prototheca moriformis* transformado (UTEX 1435) que comprende una tioesterasa que prefiere la cadena media.

%Área Ácido graso	U1	Cepa B	Cepa C-1	Cepa C-2	Cepa C-3	Cepa C-4	Cepa C-5
C10:0	0,01	5,53	11,37	11,47	10,84	11,13	11,12
C12:0	0,04	31,04	46,63	46,47	45,84	45,80	45,67
C14:0	1,27	15,99	15,14	15,12	15,20	15,19	15,07
C16:0	27,20	12,49	7,05	7,03	7,30	7,20	7,19
C18:0	3,85	1,30	0,71	0,72	0,74	0,74	0,74
C18:1	58,70	24,39	10,26	10,41	10,95	11,31	11,45
C18:2	7,18	7,79	7,05	6,93	7,30	6,88	7,01
C10-C12	0,50	36,57	58,00	57,94	56,68	56,93	56,79

[0288] Como se muestra en la Tabla 6, el perfil de ácidos grasos de la cepa B que expresan *cwTE2* mostró aumento de la composición de C10: 0, C12: 0 y C14: 0 ácidos grasos y una disminución en C16: 0, C18: 0 y C18: ácidos grasos 1 en relación con el perfil de ácidos grasos de la cepa UTEX 1435 no transformada. El impacto de la modificación genética adicional en el perfil de ácidos grasos de las cepas transformadas, es decir, la expresión de *CnLPAAT* en la cepa B, es un aumento aún más en la composición de C10: 0 y C12: 0 ácidos grasos, una disminución aún más en C16 : 0, C18: 0 y C18: 1 ácidos grasos, pero ningún efecto significativo sobre la composición de ácidos grasos C14: 0. Estos datos indican que la *CnLPAAT* muestra preferencia de sustrato en el contexto de un organismo huésped microbiano.

[0289] La Cepa Ais transformada *P. moriformis* caracterizada por un perfil de ácidos grasos comprende ácidos grasos C12 de menos de 0,5% y ácidos grasos C10-C12 de menos de 1%. En contraste, el perfil de ácidos grasos de la cepa B que expresa una tioesterasa *C. wrightii* comprende 31% C12: 0 ácidos grasos, con ácidos grasos C10-C12 que comprende más del 36% de los ácidos grasos totales. Además, los perfiles de ácidos grasos de la cepa C, que expresan una mayor tioesterasa de plantas y una enzima *Cn LPAAT*, comprendida entre 45,67% y 46,63% C12: 0 ácidos grasos, con ácidos grasos C10-C12% que comprenden entre 71 y 73% de ácidos grasos totales. El resultado de expresar una tioesterasa exógena era un aumento de 62 veces en el porcentaje de ácido graso C12 presente en el microbio de ingeniería. El resultado de expresar una tioesterasa exógena y *LPAAT* exógeno era un aumento de 92 veces en el porcentaje de ácidos grasos C12 presentes en el microbio modificado.

[0290] La fracción TAG de muestras de aceite extraído de las cepas A, B, y C se analizaron para el perfil sn-2 de sus triacilglicéridos. se extrajeron y se procesaron las etiquetas como se describe en el Ejemplo 2 y se analizaron como en los Ejemplos 1 y 2. La composición de ácidos grasos y los perfiles sn-2 de la fracción TAG del aceite extraído de las cepas A, B, y C (expresados como % de área de ácidos grasos totales) se presentan en la Tabla 7. Los valores no reportados se indican como "n.r."



Tabla 7. Efecto de expresión LPAAT en la composición de ácido graso y el perfil sn-2 de TAG producidas de *Prototheca moriformis* transformado (UTEX 1435) que comprende una tioesterasa que prefiere la cadena media.

Cepa	Cepa A (no transformada)		Cepa B (pSZ1500)		Cepa C (pSZ1500 + pSZ2046)	
Area % ácido graso	FA	Perfil sn-2	FA	Perfil sn-2	FA	Perfil sn-2
C10:0	n.r.	n.r.	11,9	14,2	12,4	7,1
C12:0	n.r.	n.r.	42,4	25	47,9	52,8
C14:0	1,0	0,6	12	10,4	13,9	9,1
C16:0	23,9	1,6	7,2	1,3	6,1	0,9
C18:0	3,7	0,3	n.r	n.r.	0,8	0,3
C18:1	64,3	90,5	18,3	36,6	9,9	17,5
C18:2	4,5	5,8	5,8	10,8	6,5	10
C18:3	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	1,1	1,6

[0291] Como se muestra en la Tabla 7, la composición de ácidos grasos de los triglicéridos (TAG) aislados de la cepa B que expresan cwTE2 se aumentó para C10: 0, C12: 0 y C14: 0 ácidos grasos y disminución de C16: 0 y C18: 1 ácidos grasos con relación al perfil de ácidos grasos de TAG aislados de Cepa A no transformada. El impacto de la modificación genética adicional en el perfil de ácidos grasos de las cepas transformadas, es decir, la expresión de CnLPAAT, era un aumento aún más en la composición de C10: 0 y C12: 0 ácidos grasos, una disminución aún más en C16: 0, C18: 0 y C18: 1 ácidos grasos, pero ningún efecto significativo sobre la composición de ácidos grasos C14: 0. Estos datos indican que la expresión de la CnLPAAT exógena mejora el perfil de ácidos grasos de cadena media de microbios transformados.

[0292] La cepa A *P. moriformis* transformada se caracteriza por un perfil de sn-2 de aproximadamente 0,6% C14, aproximadamente 1,6% C16: aproximadamente 0,3% C18: 0, aproximadamente 90% C18: 1, y aproximadamente 5,8% de C18: 2. En contraste con la cepa A, cepa B, que expresa una tioesterasa *C. wrightii* se caracteriza por un perfil de sn-2 que es más alto en ácidos grasos de cadena media y más bajo en ácidos grasos de cadena larga. Ácidos grasos C12 comprendían 25% del perfil de sn-2 de la cepa B. El impacto de la modificación genética adicional sobre el perfil sn-2 de las cepas transformadas, es decir, la expresión de CnLPAAT, era todavía un aumento adicional de ácidos grasos C12 (de 25% a 52,8%), una disminución en C18: 1 ácidos grasos (36,6% a 17,5%), y una disminución de C10: 0 ácidos grasos. (La composición de perfil sn-2 de C14: 0 y C16: 0 ácidos grasos fue relativamente similar para las cepas B y C.)

[0293] Estos datos demuestran la utilidad y eficacia de polinucleótidos que permiten la expresión de LPAAT exógeno para alterar el perfil de ácidos grasos de los microorganismos de ingeniería y, en particular en el aumento de la concentración de C10: 0 y C12: 0 ácidos grasos en células microbianas. Estos datos demuestran adicionalmente la utilidad y la eficacia de polinucleótidos que permiten tioesterasa exógena y la expresión de LPAAT exógeno para alterar el perfil sn-2 de TAG producidas por las células microbianas, en particular, en el aumento de la composición C12 de perfiles sn-2 y disminuyendo la composición C18: 1 de perfiles sn-2.

#### EJEMPLO 4: COMPORTAMIENTO TÉRMICO DE ACEITES PRODUCIDOS A PARTIR DE CÉLULAS MICROALGAS.

[0294] Las Figuras 1-14 incluyen perfiles de ácidos grasos y las curvas de fusión de aceites refinados, blanqueados y desodorizados de ingeniería genética *Prototheca moriformis*. En algunos casos, las modificaciones de las curvas de fusión se obtienen a través de la ingeniería genética. Por ejemplo, algunos de los aceites producidos tienen transiciones de fusión poco profundas y más agudas en relación con los aceites de microalgas de control (es decir, aquellos producidos a partir de cepas que carecen de una modificación genética dada) o con relación a aceites de plantas ampliamente disponibles. Además, la figura 12 muestra la calorimetría de exploración para un alto contenido de aceite palmítico cuando templado manteniéndose a temperatura ambiente durante varios días (trazo inferior) y para el mismo aceite después de realizar la primera exploración (trazo superior). Las exploraciones oscilaron entre -60°C a +50°C con una velocidad de calentamiento de 10°C/minuto. Las diferencias entre las dos huellas sugiere que el templado del aceite causó un cambio en la estructura cristalina dentro del aceite.

[0295] También se ha de notar que las Figuras 10 y 11 muestran las pruebas de estabilidad de RBD-5 y RBD 6.

Sorprendentemente, RBD-6, un aceite con menos de 0,1% 18: 2 y 18: 3 ácidos grasos era sustancialmente estable según lo medido por el índice de estabilidad oxidativa (Método AOCS Cd 12b-92), incluso después de 36 horas de calentamiento a 110°C.

5 **[0296]** Tabla 8, a continuación, da detalles de la ingeniería genética de las cepas identificadas en las Figuras 1-13.

Tabla 8. Cepas genéticamente modificadas.

10	RB Z	Tioesterasa Ulmus Americana
	RBD-1	Tioesterasa FATB2 Cuphea wrightii impulsada por amt03
	RBD-2	Tioesterasa Ulmus americana
15	RBD-3	Tioesterasa nativa específica a C. hookeriana C16: 0 con promotor amt03
	RBD Y	Tioesterasa Ulmus Americana con promotor Btub
	RBD X	Eliminación de SAD2B con tioesterasa C wrightii FAT2B nativa, promotor amt03
20	RBD W	SAD2B KO con C. wrightii FATB2 nativo impulsado por amt03 en el sitio de inserción
	RBD-4	cepa de control
25	RBD-5	FATA-1 knockout con Carthamus oleato sp. TE impulsado por el promotor amt03 en el sitio de inserción
	RBD-6	FADC knockout con tioesterasa de oleoil <i>Carthamus tinctorius</i>

#### 30 **EJEMPLO 5: CARACTERÍSTICAS DE ACEITE PROCESADO FABRICADO DE MICROORGANISMOS MODIFICADOS**

**[0297]** Métodos y efectos de la transformación *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) con vector de transformación pSZ1500 (SEQ ID NO: 17) se han descrito previamente en la Solicitud PCT N° PCT/US2011/038463, PCT/US2011/038464, y PCT/US2012/023696.

35 **[0298]** Un derivado clásicamente mutagenizado (para una mayor producción de aceite) de *Protheca moriformis* (UTEX 1435), Cepa A, se transformó con pSZ1500 de acuerdo con métodos de transformación biolística, como se describe en el documento PCT/US2009/066141, PCT/US2009/066142, PCT/US2011/038463, PCT/US2011/038464, y PCT/US2012/023696. Secuencia de nucleótidos comprendida por pSZ1500 de genes de tioesterasa de oleil *Carthamus tinctorius* (CtOTE), codones optimizados para la expresión en *P. moriformis* UTEX 1435. La construcción de expresión pSZ1500 incluía secuencias de recombinación homólogas 5' (SEQ ID NO: 18) y 3' (SEQ ID NO: 19) (de orientación que flanquean el constructo) a la región genómica FADC para la integración en el genoma nuclear y una región codificante de sacarosa de invertasa suc2 *S. cerevisiae* bajo el control de promotor  $\beta$ -tubulina/5'UTR *C. reinhardtii* (SEQ ID NO: 5) y nitrato reductasa 3' UTR *Chlorella vulgaris* (SEQ ID NO: 6). Este casete de expresión de SUC2 *S. cerevisiae* se muestra como SEQ ID NO: 7 y sirvió como un marcador de selección. La región de codificación CtOTE estaba bajo el control del promotor Amt03/5'UTR *P. moriformis* (SEQ ID NO: 8) y nitrato reductasa 3'UTR *C. vulgaris*, y el péptido de tránsito nativo fue sustituido por el péptido de tránsito de desaturasa de estearoil-ACP *C. protothecoides* (SEQ ID NO: 9). Las regiones de codificación de proteína CtOTE y suc2 fueron de codones optimizados para reflejar el sesgo de codón inherente a genes nucleares UTEX 1435 *P. moriformis* como se describe en el documento PCT/US2009/066141, PCT/US2009/066142, PCT/US2011/038463, PCT/US2011/038464, y PCT/US2012/023696.

50 **[0299]** Se seleccionaron transformantes pSZ1500 primarios de la cepa A en placas de agar que contienen sacarosa como única fuente de carbono, clonalmente purificada, y una sola línea de ingeniería, la cepa D se seleccionó para el análisis. La Cepa D se cultivó como se describe en el documento PCT/US2009/066141, PCT/US2009/066142, PCT/US2011/038463, PCT/US2011/038464, y PCT/US2012/023696. La extracción con hexano del aceite de la biomasa generada entonces se llevó a cabo utilizando métodos estándar, y el aceite de triglicérido resultante se determinó para ser libre de hexano residual. Otros métodos de extracción de aceite a partir de microalgas utilizando una prensa de torta de presión se describen en la Solicitud PCT N° PCT/US2010/031108.

60 **[0300]** Diferentes lotes de aceite extraídos de la biomasa de la cepa D fueron refinados, blanqueados y desodorizados utilizando métodos estándar de procesamiento de aceite vegetal. Estos procedimientos generan muestras de aceite RBD437, RBD469, RBD501, RBD502, RBD503, y RBD529, que se sometieron a protocolos de ensayo analítico de acuerdo con métodos definidos a través de la American Oil Chemists' Society, la American Society for Testing and Materials, y la International Organization for Standardization. Los resultados de estos análisis se resumen a continuación en las Tablas 9-14.

Tabla 9. Los resultados analíticos para muestra de aceite RBD469.

Número de método	Descripción de la prueba	Resultados	Unidades
AOCS Ca 3a-46	Impurezas insolubles	<0,01	%
AOCS Ca 5a-40	Ácidos Grasos Libres (Oleicos)	0,02	%
AOCS Ca 5a-40	Índice de acidez	0,04	mg de KOH/g
AOCS CA 9f-57	Aceite neutro	98,9	%
D97	Punto de turbidez	-15	grado C
D97	Punto de vertido	-18	grado C
	Humedad de Karl Fischer	0,01	%
AOCS Cc 13d-55 (modificado)	Clorofila	<0,01	ppm
	Índice de yodo	78,3	g I <sub>2</sub> /100g
AOCS Cd 8b-90	Valor de peróxido	0,31	meq / kg
ISO 6885	Valor de p-anisidina	0,65	
AOCS Cc 18-80	Punto de fusión descendente (Mettler)	6,2	grado C
AOCS Cd 11d-96	Tricilglicéridos	98,6	%
AOCS Cd 11d-96	Monoglicéridos	<0,01	%
AOCS Cd 11d-96	Diglicéridos	0,68	%
AOCS Cd 20-91	Compuestos polares totales	2,62	%
IUPAC, 2.507 y 2.508	Tricilglicéridos oxidados y polimerizados	17,62	%
AOCS Cc 9b-55	Punto de inflamabilidad	244	grado C
AOCS Cc 9a-48	Punto de humo	232	grado C
AOCS Cd 12b-92	Índice de estabilidad oxidativa Rancimat (110 ° C)	31,6	horas
AOCS Ca 6a-40	Materia no saponificada	2,28	%

**[0301]** El aceite RBD469 se analizó para contenido de oligoelementos, contenido de grasa sólida, y el color Lovibond de acuerdo con métodos AOCS. Los resultados de estos análisis se presentan a continuación en la Tabla 10, Tabla 10 y la Tabla 11.

Tabla 10. Análisis elemental ICP de aceite RBD469.

Número de método	Descripción de la prueba	Resultados en ppm
AOCS Ca 20-99 y AOCS Ca 17-01 (modificado)	Fósforo	1,09
	Calcio	0,1
	Magnesio	0,04
	Planchar	<0,02
	Azufre	28,8
	Cobre	<0,05
	Potasio	<0,50
	Sodio	<0,50
	Silicio	0,51
	Boro	0,06
	Aluminio	<0,20
	Plomo	<0,20
	Litio	<0,02
	Níquel	<0,20
	Vanadio	<0,05
	Zinc	<0,02
	Arsénico	<0,20
	Mercurio	<0,20
	Cadmio	<0,03
	Cromo	<0,02
	Manganeso	<0,05
	Plata	<0,05
	Titanio	<0,05
	Selenio	<0,50
UOP779	Cloruro orgánico	<1
UOP779	Cloruro inorgánico	7,24
AOCS Ba 4e-93	Nitrógeno	6,7

Tabla 11. Contenido de grasa sólida de aceite RBD469

Número de método	Contenido de grasa sólida	Resultado
AOCS Cd 12b-93	Contenido de grasa sólida 10°C	0,13%
AOCS Cd 12b-93	Contenido de grasa sólida 15°C	0,13%
AOCS Cd 12b-93	Contenido de grasa sólida 20°C	0,28%
AOCS Cd 12b-93	Contenido de grasa sólida 25°C	0,14%
AOCS Cd 12b-93	Contenido de grasa sólida 30°C	0,08%
AOCS Cd 12b-93	Contenido de grasa sólida 35°C	0,25%

Tabla 12. Color Lovibond de aceite RBD469

Número de método	Color	Resultado	Unidad
AOCS Cc 13j-97	rojo	2	Unidad
AOCS Cc 13j-97	amarillo	27	Unidad

**[0302]** Aceite RBD469 se sometió a transesterificación para producir ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME). El perfil de FAME resultante de RBD469 se muestra en la Tabla 12.

Tabla 13. Perfil FAME del aceite RBD469

Ácido graso	Área %
C10	0,01
C12: 0	0,04
C14: 0	0,64
C15: 0	0,08
C16: 0	8,17
C16: 1 iso	0,39
C16: 1	0,77
C17: 0	0,08
C18: 0	1,93
C18: 1	35,88
C18: 1 iso	0,05
C18: 2	0,05
C20: 0	0,3
C20: 1	0,06
C20: 1	0,44
C22: 0	0,11
C23: 0	0,03
C24: 0	0,1
Total de FAME identificadas	99,13

**[0303]** Los índices de estabilidad del aceite (OSI) de 6 muestras de aceite RBD sin antioxidantes suplementados y 3 muestras de aceite RBD suplementados con antioxidantes se analizaron de acuerdo con el Método AOCS de Índice de Estabilidad de Aceite de Cd 12b-92. Se muestran en la Tabla 14 los resultados de pruebas OSI AOCS Cd 12b-92, realizadas a 110°C, obtenidos usando un Metrohm 873 Biodiesel Rancimat. Resultados, excepto donde se indica con un asterisco (\*), son el promedio de múltiples OSI. Esas muestras no analizadas se indican (NA).

Tabla 14. Índice de Estabilidad de Aceite a 110°C de muestras de aceite RBD con y sin antioxidantes.

		OSI (horas) para cada muestra RBD					
		RBD437	RBD469	RBD502	RBD501	RBD503	RBD529
Antioxidante agregado	Concentración Antioxidante						
Ninguna	0 0	65,41	38,33	72,10	50,32	63,04	26,68
Tocoferol y palmitato de ascorbilo	35 ppm / 16,7 ppm	77,72	48,60	82,67	N / A	N / A	N / A
Tocoferol y palmitato de ascorbilo	140 ppm / 66,7 ppm	130,27	81,54 *	211,49 *	N / A	N / A	N / A
Tocoferol y palmitato de ascorbilo	1050 ppm / 500 ppm	> 157 *	> 144	242,5 *	N / A	N / A	N / A
Tocoferol	50 ppm	N / A	46,97	N / A	N / A	N / A	N / A
TBHQ	20 ppm	63,37	37,4	N / A	N / A	N / A	N / A

[0304] El perfil de ácidos no transformados *P. moriformis* (UTEX 1435) comprende menos de 60% de C18: 1 ácidos grasos y más que 7% C18: 2 ácidos grasos. En contraste, la cepa D (que comprende pSZ1500) exhibió perfiles de ácidos grasos con un aumento de la composición de C18: 1 ácidos grasos (a por encima del 85%) y una disminución en C18: 2 ácidos grasos (a menos de 0,06%). Tras la refinación, blanqueo, y desgomado, muestras de aceites RBD preparadas a partir del aceite hecho de la cepa E mostraron valores de OSI >26 h. Con la adición de antioxidantes, los OSI de aceites RBD preparados a partir de aceites de la cepa D aumentaron de 48,60 horas hasta más de 242 horas. En otros experimentos, se alcanzaron valores de OSI de más de 400 horas. Las propiedades adicionales de un aceite poliinsaturado bajo se dan en la Fig. 16.

#### EJEMPLO 6: MEJORAR LOS NIVELES DE LOS ÁCIDOS OLEICOS DE ÁCIDO DE MICROBIOS MODIFICADOS A TRAVÉS DE LA INTERRUPCIÓN ALÉLICA DE UNA DESATURASA DE ÁCIDOS GRASOS Y UNA TIOESTERASA DE ACIL-ACP

[0305] Este ejemplo describe el uso de un vector de transformación para interrumpir un locus FATA de una cepa *Prototheca moriformis* diseñada previamente para alto ácido oleico y baja producción de ácido linoleico. El casete de transformación utilizada en este ejemplo comprendía secuencias marcadoras seleccionables y nucleótidos que codifican una enzima KASII *P. moriformis* para modificar microorganismos en los que el perfil de ácidos grasos del microorganismo transformado se ha alterado para aumentar aún más el ácido oleico y los niveles de ácido palmítico bajados.

[0306] La Cepa D, descrita en el Ejemplo 5 y en el documento PCT/US2012/023696, es un derivado clásicamente mutagenizado (para una mayor producción de aceite) de *P. moriformis* (UTEX 1435) posteriormente transformada con el constructo de transformación pSZ1500 (SEQ ID NO: 17) de acuerdo con métodos de transformación biolística, como se describe en el documento PCT/US2009/066141, PCT/US2009/066142, PCT/US2011/038463, PCT/US2011/038464, y PCT/US2012/023696. Esta cepa se utilizó como huésped para la transformación con constructo pSZ2276 para aumentar la expresión de una enzima KASII mientras que concomitantemente la ablación de una tioesterasa de acil-ACP endógeno locus genético para generar la Cepa E. El constructo de transformación pSZ2276 incluía secuencias homólogas de recombinación de orientación 5' (SEQ ID NO: 20) y 3' (SEQ ID NO: 21) (que flanquean el constructo) a la región genómica FATA1 para la integración en el genoma nuclear *P. moriformis*, una región codificante de proteína THIC *A. thaliana* bajo el control del promotor de la actina/5'UTR *C. protothecoides* (SEQ ID NO: 22) y nitrato reductasa 3' UTR *C. vulgaris* (SEQ ID NO: 6). Este casete de expresión A<sub>T</sub>THIC se muestra como SEQ ID NO: 23 y sirvió como un marcador de selección. La región de codificación de proteína de KASII *P. moriformis* estaba bajo el control del promotor Amt03/5'UTR *P. moriformis* (SEQ ID NO: 8) y nitrato reductasa 3'UTR *C. vulgaris*, y el péptido de tránsito nativo de la enzima KASII fue sustituido por el péptido de tránsito de desaturasa de estearoil-ACP *C. protothecoides* (SEQ ID NO: 9). La secuencia optimizada por codon de PmKASII que comprende un péptido de tránsito de desaturasa de estearoil-ACP S106 *C. protothecoides* se proporciona la lista de secuencias como SEQ ID NO: 24. SEQ ID NO: 25 proporciona la traducción de la proteína de SEQ ID NO: 24. La proteína de regiones de PmKASII y codificación *suc2* fueron codones optimizados para reflejar el sesgo de codón inherente a genes nucleares UTEX 1435 *P. moriformis* como se describe en el documento PCT/US2009/066141, PCT/US2009/066142, PCT/US2011/038463, PCT/US2011/038464, y PCT/US2012/023696.

[0307] Transformantes pSZ2276 primarios de la cepa D se seleccionaron en placas de agar que carecen de tiamina, clonalmente purificada, y una sola línea de ingeniería, la cepa E fue seleccionada para el análisis. Cepa E fue cultivada en condiciones de producción de lípidos heterotróficos en pH 5,0 y pH 7,0 como se describe en el documento PCT/US2009/066141, PCT/US2009/066142, PCT/US2011/038463, PCT/US2011/038464, y PCT/US2012/023696. Muestras de lípidos se prepararon a partir de biomasa seca de cada transformante y perfiles de ácidos grasos de estas muestras se analizaron mediante métodos de detección de ionización de llama de cromatografía de gas de éster metílico de ácido graso estándar (FAME GC/FID) como se describe en el Ejemplo 1. Los perfiles de ácidos grasos (expresados como % de área de los ácidos grasos totales) de la línea transgénica derivada de la transformación con pSZ2276 en la Cepa D se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15. Perfiles de ácidos grasos de *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) Las cepas A, D y E diseñadas para aumentar el ácido oleico y disminuir los niveles de ácido linoleico.

Tensión	Construido(s) de transformación	pH	Área% Ácido graso				
			C16: 0	C18: 0	C18: 1	C18: 2	C20: 1
Cepa A	Ninguna	pH 5	26,6	3,3	60,5	6,7	0,07
Cepa A	Ninguna	pH 7	28,3	4,1	58	6,5	0,06
Cepa D	pSZ1500	pH 5	17	3,6	77,1	0,01	0,14
Cepa D	pSZ1500	pH 7	19,5	5,3	72,6	0,01	0,09
Cepa E	pSZ1500 + pSZ2276	pH 5	4,1	2,36	88,5	0,04	3,1
Cepa E	pSZ1500 + pSZ2276	pH 7	2,1	7,8	87,9	0,01	0,5

[0308] Como se muestra en la Tabla 15, la interrupción selectiva de alelos FADC con un casete de expresión CtOTE impactó los perfiles de ácidos grasos de microorganismos transformados. Perfiles de ácidos grasos de la cepa D (que comprende el vector de transformación pSZ1500) mostraron una mayor composición de C18: 1 ácidos grasos con una disminución concomitante en C16: 0 y C18: 2 ácidos grasos con respecto a la cepa A. La posterior transformación de la cepa D con pSZ2276 para sobreexpresar una proteína KASII *P. moriformis* (UTEX 1435) mientras que tiene lugar la ablación de forma concomitante de un locus genético FATA (generando de ese modo la cepa E) resultó en aún más impacto en los perfiles de ácidos grasos de los microorganismos transformados. Perfiles de ácidos grasos de la cepa E mostraron un aumento de composición de C18: 1 ácidos grasos, con una disminución adicional en C16: 0 ácidos grasos con respecto a las cepas A y D. La propagación de la cepa E en condiciones de cultivo a pH 7, para inducir la expresión del promotor Amt03, dio lugar a un perfil de ácidos grasos que fue mayor en C18: 0 y C18: 1 ácidos grasos y menor en C16: 0 ácidos grasos, en relación con la misma cepa cultivada a pH 5.

[0309] Estos datos demuestran la utilidad de múltiples modificaciones genéticas para impactar el perfil de ácidos grasos de un organismo huésped por aumento de los niveles de ácido oleico con concomitante disminución de los niveles de ácido linoleico y ácido palmítico. Además, este ejemplo ilustra el uso de polinucleótidos recombinantes para apuntar interrupción génica de un alelo FATA endógeno con un casete que comprende un promotor pH regulable para controlar la expresión de una región codificante de la proteína exógena KASII con el fin de alterar el perfil de ácidos grasos de un microbio huésped.

#### EJEMPLO 7: EXPRESIÓN CONDICIONAL DE UNA DESATURASA DE ÁCIDOS GRASOS

[0310] Este ejemplo describe el uso de un vector de transformación para expresar condicionalmente una desaturasa de ácidos grasos 12 delta (DCP) en una cepa *Prototheca moriformis* diseñada previamente para alto ácido oleico y la producción de ácido linoleico muy bajo en etapas de propagación de sembrado y de la productividad de lípidos. Los niveles de ácido linoleico muy bajos en aceites naturales son buscados para su uso en ciertas aplicaciones. Sin embargo, la ausencia de ácido linoleico durante la fase de división celular ("etapa de sembrado") de un microbio huésped es desventajosa. El ácido linoleico puede ser suplementado al medio de siembra para acelerar la división celular y no se añade durante la producción de lípidos, pero esta adición impone costes no deseados. Para superar este reto, un casete de transformación fue construido para la expresión regulada de una enzima FAD2 tal que los niveles de ácidos linoleicos suficientes para la división celular se podrían lograr y aceite con niveles muy bajos de ácidos linoleicos podrían ser producidos durante la fase de producción de aceite del cultivo de un microorganismo. El casete de transformación utilizado en este ejemplo comprendía un marcador seleccionable, un promotor de pH regulable, y secuencias de nucleótidos que codifica una enzima FAD2 *P. moriformis* para diseñar microorganismos en donde el perfil de ácidos grasos del microorganismo transformado se ha alterado para aumentar la producción de ácido oleico y la producción de ácido linoleico regulable.

[0311] Cepa D, descrita en los Ejemplos 5, 6, y en el documento PCT/US2012/023696, es un derivado clásicamente mutagenizado (para una mayor producción de aceite) de *P. moriformis* (UTEX 1435) posteriormente transformada con el constructo de transformación pSZ1500 (SEQ ID NO: 17) de acuerdo con métodos de transformación biolística, como se describe en el documento PCT/US2009/066141, PCT/US2009/066142, PCT/US2011/038463, PCT/US2011/038464, y PCT/US2012/023696. Esta cepa se utilizó como huésped para la transformación con constructo pSZ2413 para introducir un promotor pH impulsado para la regulación de una enzima FAD2 *P. moriformis*. El constructo de transformación pSZ2413 incluía secuencias de recombinación homólogas de orientación 5' (SEQ ID NO: 1) y 3' (SEQ ID NO: 2) (que flanquean el constructo) a la región genómica 6S para la integración en el genoma nuclear *P. moriformis*, una región codificante de proteína THIC *A. thaliana* bajo el control del promotor de la actina/5'UTR (SEQ ID NO: 22) y nitrato reductasa 3' UTR *C. vulgaris* (SEQ ID NO: 6). Este casete de expresión A/THIC se muestra como SEQ ID NO: 23 y sirvió como un marcador de selección. La región de codificación de la proteína

FAD2 *P. moriformis* estaba bajo el control del promotor Amt03/5'UTR *P. moriformis* (SEQ ID NO: 8) y nitrato reductasa 3'UTR *C. vulgaris*. La secuencia optimizada por codones de *PmFAD2* se proporciona en la lista de secuencias como SEQ ID NO: 26. SEQ ID NO: 27 proporciona la traducción de la proteína de SEQ ID NO: 26. La proteína de regiones de *PmFAD2* y codificación *suc2* fueron de codones optimizados para reflejar el sesgo de codón inherente a genes nucleares UTEX 1435 *P. moriformis* como se describe en el documento PCT/US2009/066141, PCT/US2009/066142, PCT/US2011/038463, PCT/US2011/038464, y PCT/US2012/023696.

**[0312]** Se seleccionaron transformantes pSZ2413 primarias de la cepa D en placas de agar que carecen de tiamina, clonalmente purificada, y los aislados de la línea de ingeniería, se seleccionó la cepa F para el análisis. Estos aislados se cultivaron en condiciones de producción de lípidos heterotróficos a pH 7,0 (para activar la expresión de FAD2 del promotor *PmAmt03*) y a pH 5,0, como se describe en el documento PCT/US2009/066141, PCT/US2009/066142, PCT/US2011/038463, PCT/US2011/038464, y PCT/US2012/023696. Las muestras de lípidos se prepararon a partir de biomasa seca de cada transformante y de perfiles de ácidos grasos de estas muestras se analizaron usando métodos de detección de ionización de llama de cromatografía de gases de éster metílico de ácido graso estándar (FAME GC/FID) como se describe en el Ejemplo 1. El perfil resultante de C18: 2 ácidos grasos (expresadas en % de área) de nueve aislados representativos de cepa transgénica F (F-1 hasta F-9) derivada de la transformación con pSZ2413 en la cepa D se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16. C18: 2 perfiles de ácidos grasos de *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) Cepas A, D y F.

Tensión	Constructo(s) de transformación	Área % C18: 2	
		5,0	7,0
A	Ninguna	07	26
D	pSZ1500	01	01
F-1	pSZ1500 + pSZ2413	37	29
F-2	pSZ1500 + pSZ2413	45	87
F-3	pSZ1500 + pSZ2413	50	79
F-4	pSZ1500 + pSZ2413	57	06
F-5	pSZ1500 + pSZ2413	57	58
F-6	pSZ1500 + pSZ2413	60	88
F-7	pSZ1500 + pSZ2413	62	52
F-8	pSZ1500 + pSZ2413	63	79
F-9	pSZ1500 + pSZ2413	77	53

**[0313]** Como se muestra en la Tabla 16 el impacto de la expresión regulada de la enzima *PmFAD2*, efectuado a través del cultivo de la cepa en diferentes niveles de pH, es un claro aumento en la composición de C18: 2 ácidos grasos en el microorganismo transformado. El ácido linoleico comprende de aproximadamente 6% a aproximadamente 7,3% de ácidos grasos de la cepa A. En contraste, la cepa D (que comprende el vector de transformación pSZ1500 para la ablación de ambos alelos FAD2) se caracteriza por un perfil de ácidos grasos de ácido linoleico 0,01%. Transformación de la cepa D con pSZ2413 para generar la cepa F resulta en un microbio recombinante en el que la producción de ácido linoleico está regulada por el promotor Amt03. La propagación de aislados de cepa F en condiciones de cultivo a pH 7, para inducir la expresión FAD2 a partir del promotor Amt03, resultó en un perfil de ácidos grasos caracterizado por aproximadamente un 4,5% a ácido linoleico aproximadamente 7,5%. En contraste, la propagación de aislados de cepa F en condiciones de cultivo a pH 5 resultó en un perfil de ácidos grasos caracterizado por aproximadamente 0,33 a ácido linoleico sobre 0,77%.

**[0314]** Estos datos demuestran la utilidad y la eficacia de polinucleótidos recombinantes que permiten la expresión condicional de una enzima FAD2 para alterar el perfil de ácidos grasos de los microorganismos modificados y, en particular, en la regulación de la producción de C 18: 2 ácidos grasos en las células microbianas.

#### EJEMPLO 8: ANÁLISIS DE PERFIL REGIOESPECÍFICO

**[0315]** Análisis de distribución de TAG LC/MS se llevaron a cabo usando un sistema de cromatografía de líquidos de rendimiento ultra alto Shimadzu Nexera que incluía un muestreador automático SIL-30AC, dos bombas LC-30AD, un DGU-20A5 desgasificador en línea, y un horno de columna CTO-20A, acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Shimadzu LCMS 8030 equipado con una fuente APCI. Los datos fueron adquiridos utilizando un análisis Q3 de *m/z* 350-1050 a una velocidad de barrido de 1428 u/seg en el modo de ion positivo con la presión del gas CID (argón) ajustado a 230 kPa. Los APCI, línea de desolvatación, y temperaturas de bloque de calor eran ajustados a 300, 250, y 200°C, respectivamente, las velocidades de flujo de los gases de nebulización y de secado eran 3,0 L/min



y 5,0 L/min, respectivamente, y la tensión de interfaz era de 4500 V. Las muestras de aceite se disolvieron en diclorometano-metanol (1: 1) a una concentración de 5 mg/ml, y 0,8 µL de la muestra se inyectó en Shimadzu Shim-pack XR-ODS III (2,2 µm, 2,0 x 200 mm) mantenido a 30°C. Un gradiente lineal de 30% de diclorometano-2-propanol (1: 1)/acetonitrilo al 51% diclorometano-2-propanol (1: 1)/acetonitrilo durante 27 minutos a 0,48 ml/min se utilizó para las separaciones cromatográficas.

#### EJEMPLO 9: INGENIERÍA DE MICROBIOS PARA AUMENTAR LA PRODUCCIÓN DE TRIACILGLICÉRIDOS SOS, POP, Y POS

**[0316]** Este ejemplo describe el uso de polinucleótidos recombinantes que codifican una enzima de tioesterasa que prefiere C18: 0 *Brassica napus* (*bnOTE*) para diseñar un microorganismo en el que la distribución de triacilglícrido del microorganismo transformado se ha enriquecido en triacilglícridos SOS, POS, y POP.

**[0317]** Una cepa clásicamente mutagenizada de *Prototheca moriformis* (UTEX 1435), Cepa A, se transformó inicialmente con el constructo plasmídico pSZ1358 de acuerdo con métodos de transformación biolística, como se describe en el documento PCT/US2009/066141, PCT/US2009/066142, PCT/US2011/038463, PCT/US2011/038464, y PCT/US2012/023696. pSZ1358, que se describe en el documento PCT/US2012/023696, contenía la secuencia de codificación de la tioesterasa *Brassica napus* (*bnOTE*) tioesterasa (SEQ ID NO: 28), secuencias de recombinación de orientación 5' (SEQ ID NO: 1) y 3' (SEQ ID NO: 2) homólogas (que flanquean el constructo) a la región genómica 6S para la integración en el genoma nuclear y una región codificante de la invertasa de sacarosa *suc2* *S. cerevisiae* (SEQ ID NO: 4), para expresar la secuencia de la proteína dada en SEQ ID NO: 3, bajo el control de promotor β-tubulina/5'UTR *C. reinhardtii* (SEQ ID NO: 5) y nitrato reductasa 3' UTR *Chlorella vulgaris* (SEQ ID NO: 6). Este casete de expresión *suc2* *S. cerevisiae* se muestra como SEQ ID NO: 7 y sirvió como un marcador seleccionable. La secuencia de codificación de proteína *BnOTE* para expresar la secuencia de la proteína dada en SEQ ID NO: 29, estaba bajo el control del promotor Amt03/5'UTR *P. moriformis* (SEQ ID NO: 8) y nitrato reductasa 3'UTR *C. vulgaris*. Las regiones de codificación de proteína de *BnOTE* y *suc2* fueron de codones optimizados para reflejar el sesgo de codón inherente a genes nucleares UTEX 1435 *P. moriformis* como se describe en el documento PCT/US2009/066141, PCT/US2009/066142, PCT/US2011/038463, PCT/US2011/038464, y PCT/US2012/023696.

**[0318]** Se seleccionaron transformantes pSZ1358 primarios de la cepa A en placas de agar que contienen sacarosa como única fuente de carbono, clonalmente purificada, y la línea de ingeniería única, Cepa G fue seleccionada para el análisis. Cepa G se cultivó en condiciones de producción de lípidos heterotróficas a pH 7,0 (para activar la expresión de *BnOTE* a partir del promotor PmAmt03) como se describe en el documento PCT/US2009/066141, PCT/US2009/066142, PCT/US2011/038463, PCT/US2011/038464, y PCT/US2012/023696. Las muestras de aceite obtenidas de la cepa A y cepa G se analizaron para la composición de ácidos grasos utilizando los métodos descritos en los Ejemplos 1 y 2, y, usando los métodos descritos en el Ejemplo 8, para la regiospecificidad de triacilglícridos en el aceite. Perfiles de ácidos grasos de TAG aislados de la cepa A y G se muestran en la Tabla 17. Tabla 18 presenta el perfil de regiospecificidad de TAG de POP, POS y SOS presentes en muestras de aceite de la Cepa A y G.

Tabla 17. Efecto de expresión *BnOTE* en la composición de ácidos grasos y el perfil sn-2 de TAG producida a partir de *Prototheca moriformis* transformada.

	Cepa A	Cepa G (pSZ1358)
Área% ácido graso	Perfil FA	Perfil FA
C10: 0	n.r.	0,5
C12: 0	n.r.	0,5
C14: 0	1,0	1,3
C16: 0	23,9	25,8
C18: 0	3,7	30,4
C18: 1	64,3	30,2
C18: 2	4,5	8,8
C18: 3 α	n.r.	0,4

Tabla 18. Efecto de la expresión de *BnOTE* sobre el perfil regioespecífico de las TAG de POP, POS y SOS producidos a partir de *Prototheca moriformis* transformada

	Cepa A (sin transformar)		Cepa G (pSZ1358)		Mantequilla de cocoa	
TAG	Área %	Área normalizada %	Área %	Área normalizada %	Área %	Área normalizada %
POP	13,09	76,8	10,6	23,5	17,9	22,1
POS	3,51	20,5	21,0	46,6	39,2	48,4
SOS	0,45	2,6	13,5	29,9	23,9	29,5
total	17,05	100	45,0	100	81,1	100

[0319] Como se muestra en la Tabla 17, la composición de ácidos grasos de TAG aislada de la cepa G que expresa *bnOTE* se aumentó marcadamente para C18: 0 ácidos grasos (de 3,7% a 30,4%) y disminuyó en C18: 1 ácidos grasos (de 64,3% a 30,2%) con respecto al perfil de ácidos grasos de TAG aislada de cepa A no transformada. La composición de ácidos grasos de TAG aislada de la cepa A se caracterizó por ácido palmítico al 23,9%, ácido esteárico al 3,7%, y ácido oleico al 64,3%, una proporción de P: S: O de aproximadamente 6,5: 1: 17,4. En contraste, la composición de ácidos grasos de TAG aislada de la cepa G se caracterizó por ácido palmítico al 25,8%, ácido esteárico del 30,4%, y ácido oleico al 30,2%, una proporción de P: O: S de 1: 1,18: 1,17.

[0320] El impacto de la expresión de una tioestereasa que prefiere C18: 0 en el perfil regioespecífico de TAG de POP, POS y SOS de los aceites producidos a partir del microorganismo transformado fue un aumento en todos los tres CTC como una proporción de los CTC totales presentes en el aceite. Como se muestra en la Tabla 18, la suma de TAG de POP + POS + SOS representó el 45% de las etiquetas producidas por la cepa G, mientras que TAG de POP, POS y SOS sumaron sólo alrededor del 17% de TAG producidas en la cepa A. Los porcentajes de POP, POS y SOS de cepa G se comparan con manteca de cacao en la Tabla 18. Como se puede ver, las proporciones de POP, POS y SOS de la cepa G son muy similares a las proporciones observadas en la manteca de cacao.

[0321] Estos datos demuestran la utilidad y eficacia de polinucleótidos que permiten la expresión de tioesterasa exógena para alterar el ácido graso y perfiles regioespecíficos de TAG de microorganismos de ingeniería, en particular para aumentar la distribución de TAG de POP, POS y SOS.

#### EJEMPLOS 10-33: Ingeniería de microorganismos

[0322] Ejemplos 10-33 a continuación describen la ingeniería de diversos microorganismos. Para alterar el perfil de ácidos grasos de un microorganismo, los microorganismos pueden ser modificados genéticamente en donde las enzimas de la ruta de biosíntesis de lípidos endógenos o exógenos se expresan, sobreexpresan o atenúan. Pasos para genéticamente modificar un microbio para alterar su perfil de ácidos grasos en cuanto al grado de insaturación de ácidos grasos y para disminuir o aumentar longitud de cadena de ácido graso comprenden el diseño y construcción de un vector de transformación (*p.ej.* un plásmido), la transformación del microbio con uno o más vectores, selección de microbios transformados (transformantes), el crecimiento del microbio transformado, y el análisis del perfil de ácidos grasos de los lípidos producidos por el microbio modificado.

[0323] Los transgenes que alteran los perfiles de ácidos grasos de organismos huésped pueden ser expresados en numerosos microbios eucariotas. Los ejemplos de la expresión de transgenes en los microbios eucariotas, incluyendo *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella ellipsoidea*, *Chlorella saccharophila*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella kessleri*, *Chlorella sorokiniana*, *Haematococcus pluvialis*, *Gonium pectorale*, *Volvox carteri*, *Dunaliella tertiolecta*, *Dunaliella viridis*, *Dunaliella salina*, *Closterium peracerosumstrigosum-littorale* compleja, *Nannochloropsis sp.*, *Thalassiosira pseudonana*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Navicula saprophila*, *Cylindrotheca fusiformis*, *Cyclotella cryptica*, *Symbiodinium microadriaticum*, *Amphidinium sp.*, *Chaetoceros sp.*, *Mortierella alpina*, y *Yarrowia lipolytica* se pueden encontrar en la literatura científica. Estas técnicas de expresión se pueden combinar con las enseñanzas de la presente invención para producir microorganismos de ingeniería con perfiles de ácidos grasos alterados.

[0324] Los transgenes que alteran los perfiles de ácidos grasos de organismos huésped o alterar la distribución regioespecífica de glicerolípids producidos por organismos huésped también pueden expresarse en numerosos microbios procariotas. Los ejemplos de la expresión de transgenes en los microbios oleaginosas incluyendo *Rhodococcus opacus* se pueden encontrar en la literatura. Estas técnicas de expresión se pueden combinar con las enseñanzas de la presente invención para producir microorganismos de ingeniería con perfiles de ácidos grasos alterados.

Tablas 19A-D. Listado de preferencia de codón.

Amino ácido	Codon	<i>Chlorella sorokiniana</i>	<i>Chlorella vulgaris</i>	<i>Chlorella ellipsoidea</i>	<i>Chlorella kessleri</i>	<i>Dunaliella tertiolecta</i>	<i>Volvox carteri</i>	<i>Haemato coccus pluvialis</i>
Ala	GCG	0.20	0.25	0.15	0.14	0.09	0.25	0.21
Ala	GCA	0.05	0.24	0.32	0.10	0.17	0.13	0.27
Ala	GCT	0.12	0.16	0.26	0.18	0.31	0.26	0.17
Ala	GCC	0.63	0.35	0.27	0.58	0.43	0.36	0.35
Arg	AGG	0.03	0.09	0.10	0.09	0.26	0.08	0.14
Arg	AGA	0.04	0.05	0.14	0.01	0.09	0.03	0.05
Arg	CGG	0.06	0.19	0.09	0.06	0.06	0.17	0.15
Arg	CGA	0.00	0.10	0.08	0.00	0.08	0.08	0.10
Arg	CGT	0.06	0.09	0.37	0.14	0.12	0.22	0.13
Arg	CGC	0.81	0.48	0.22	0.71	0.40	0.43	0.42
Asn	AAT	0.04	0.16	0.43	0.06	0.27	0.23	0.21
Asn	AAC	0.96	0.84	0.57	0.94	0.73	0.77	0.79
Asp	GAT	0.13	0.25	0.47	0.12	0.40	0.35	0.27
Asp	GAC	0.87	0.75	0.53	0.88	0.60	0.65	0.73
Cys	TGT	0.06	0.13	0.43	0.09	0.20	0.17	0.27
Cys	TGC	0.94	0.87	0.57	0.91	0.80	0.83	0.64
End	TGA	0.00	0.72	0.14	0.14	0.36	0.24	0.70
End	TAG	0.33	0.11	0.29	0.00	0.00	0.18	0.22
End	TAA	0.67	0.17	4.00	0.86	0.64	0.59	0.09
Gln	CAG	0.42	0.40	0.15	0.40	0.27	0.29	0.33
Gln	CAA	0.04	0.04	0.21	0.40	0.27	0.07	0.10
Glu	GAG	0.53	0.50	0.33	0.40	0.27	0.53	0.49
Glu	GAA	0.02	0.06	0.31	0.40	0.27	0.11	0.07
Gly	GGG	0.04	0.16	0.19	0.08	0.10	0.12	0.22
Gly	GGA	0.02	0.11	0.13	0.07	0.13	0.12	0.11
Gly	GGT	0.03	0.12	0.39	0.24	0.25	0.23	0.15
Gly	GGC	0.91	0.61	0.29	0.96	0.51	0.53	0.52
His	CAT	0.14	0.16	0.30	0.08	0.25	0.35	0.27
His	CAC	0.86	0.84	0.70	0.93	0.75	0.65	0.73

	Ile	ATA	0.00	0.04	0.07	0.01	0.04	0.08	0.09
	Ile	ATT	0.15	0.30	0.63	0.29	0.31	0.35	0.29
5	Ile	ATC	0.85	0.66	0.65	0.69	0.65	0.57	0.62
	Leu	TTG	0.03	0.07	0.03	0.05	0.14	0.14	0.16
	Leu	TTA	0.00	0.01	0.32	0.00	0.02	0.03	0.02
10	Leu	CTG	0.72	0.61	0.34	0.61	0.60	0.45	0.53
	Leu	CTA	0.01	0.03	0.03	0.04	0.04	0.07	0.07
	Leu	CTT	0.04	0.08	0.16	0.06	0.06	0.14	0.09
	Leu	CTC	0.20	0.20	0.12	0.24	0.14	0.17	0.13
15	Lys	AAG	0.98	0.94	0.54	0.98	0.90	0.90	0.84
	Lys	AAA	0.02	0.06	0.46	0.02	0.10	0.10	0.16
	Met	ATG	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
20	Phe	TTT	0.28	0.32	0.42	0.31	0.24	0.27	0.35
	Phe	TTC	0.72	0.68	0.58	0.69	0.76	0.73	0.65
	Pro	CCG	0.18	0.31	0.09	0.07	0.04	0.34	0.15
	Pro	CCA	0.06	0.17	0.36	0.07	0.04	0.20	0.24
25	Pro	CCT	0.10	0.14	0.25	0.17	0.04	0.19	0.29
	Pro	CCC	0.66	0.38	0.29	0.69	0.04	0.27	0.32
	Ser	AGT	0.03	0.04	0.14	0.02	0.08	0.08	0.07
	Ser	AGC	0.27	0.38	0.18	0.18	0.31	0.27	0.31
30	Ser	TCG	0.12	0.14	0.08	0.10	0.02	0.19	0.10
	Ser	TCA	0.03	0.08	0.14	0.08	0.09	0.09	0.14
	Ser	TCT	0.09	0.11	0.26	0.18	0.19	0.14	0.13
35	Ser	TCC	0.47	0.24	0.20	0.44	0.30	0.24	0.24
	Thr	ACG	0.11	0.20	0.13	0.05	0.12	0.27	0.19
	Thr	ACA	0.01	0.20	0.32	0.07	0.20	0.12	0.23
	Thr	ACT	0.12	0.13	0.29	0.12	0.24	0.20	0.18
40	Thr	ACC	0.76	0.47	0.26	0.76	0.44	0.41	0.40
	Trp	TGG	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	Tyr	TAT	0.07	0.15	0.43	0.27	0.28	0.24	0.19
45	Tyr	TAC	0.93	0.85	0.57	0.73	0.72	0.76	0.81
	Val	GTG	0.71	0.54	0.37	0.60	0.54	0.46	0.62
	Val	GTA	0.00	0.05	0.25	0.03	0.09	0.07	0.09
	Val	GTT	0.11	0.14	0.24	0.09	0.14	0.17	0.09
50	Val	GTC	0.18	0.27	0.14	0.28	0.23	0.30	0.21

55	Amino ácido	Codon	<i>Closterium peracerosum -strigosum- littorale complex</i>	<i>Dunaliell a viridis</i>	<i>Dunaliell a salina</i>	<i>Gonium pectorale</i>	<i>Phaeodactylu m tricornutum</i>	<i>Chaetoceros compressu m</i>
60	Ala	GCG	0.48	0.13	0.15	0.43	0.15	0.08
	Ala	GCA	0.10	0.27	0.20	0.09	0.10	0.37
	Ala	GCT	0.15	0.25	0.27	0.08	0.23	0.36
65	Ala	GCC	0.26	0.35	0.39	0.41	0.52	0.18

# ES 2 744 868 T3

5	Arg	AGG	0.04	0.25	0.22	0.13	0.02	0.14
	Arg	AGA	0.00	0.06	0.05	0.00	0.04	0.29
	Arg	CGG	0.18	0.08	0.12	0.40	0.10	0.00
	Arg	CGA	0.00	0.06	0.06	0.05	0.12	0.19
	Arg	CGT	0.13	0.15	0.13	0.08	0.41	0.38
	Arg	CGC	0.64	0.39	0.43	0.35	0.31	0.00
10	Asn	AAT	0.04	0.17	0.23	0.07	0.30	0.58
	Asn	AAC	0.96	0.83	0.77	0.93	0.65	0.42
	Asp	GAT	0.30	0.38	0.40	0.11	0.41	0.53
	Asp	GAC	0.70	0.62	0.60	0.89	0.59	0.47
15	Cys	TGT	0.06	0.24	0.17	0.20	0.39	0.44
	Cys	TGC	0.94	0.76	0.83	0.90	0.61	0.56
	End	TGA	0.75	0.31	0.37	0.50	0.06	0.50
20	End	TAG	0.00	0.15	0.14	0.00	0.13	0.00
	End	TAA	0.25	0.54	0.49	0.50	0.81	0.50
	Gln	CAG	0.53	0.36	0.32	0.31	0.23	0.16
	Gln	CAA	0.09	0.12	0.08	0.07	0.14	0.19
25	Glu	GAG	0.31	0.44	0.51	0.56	0.21	0.28
	Glu	GAA	0.06	0.09	0.09	0.07	0.42	0.37
	Gly	GGG	0.31	0.14	0.10	0.18	0.08	0.12
	Gly	GGA	0.06	0.11	0.12	0.09	0.34	0.33
30	Gly	GGT	0.09	0.22	0.22	0.07	0.30	0.39
	Gly	GGC	0.53	0.54	0.56	0.65	0.28	0.16
	His	CAT	0.33	0.25	0.25	0.43	0.28	0.84
	His	CAC	0.67	0.75	0.75	0.57	0.72	0.16
35	Ile	ATA	0.03	0.03	0.03	0.07	0.03	0.12
	Ile	ATT	0.23	0.25	0.31	0.33	0.51	0.65
	Ile	ATC	0.74	0.72	0.66	0.59	0.46	0.23
40	Leu	TTG	0.04	0.11	0.12	0.04	0.26	0.11
	Leu	TTA	0.00	0.01	0.01	0.00	0.02	0.14
	Leu	CTG	0.31	0.60	0.61	0.64	0.15	0.05
	Leu	CTA	0.01	0.05	0.04	0.01	0.05	0.08
45	Leu	CTT	0.04	0.07	0.08	0.05	0.18	0.51
	Leu	CTC	0.60	0.16	0.14	0.26	0.34	0.11
	Lys	AAG	0.86	0.87	0.89	0.93	0.75	0.52
	Lys	AAA	0.14	0.13	0.11	0.07	0.25	0.48
50	Met	ATG	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	Phe	TTT	0.09	0.25	0.29	0.10	0.44	0.65
	Phe	TTC	0.91	0.75	0.71	0.90	0.56	0.35
55	Pro	CCG	0.28	0.10	0.08	0.53	0.29	0.05
	Pro	CCA	0.15	0.10	0.17	0.09	0.12	0.45
	Pro	CCT	0.12	0.10	0.30	0.04	0.20	0.33
	Pro	CCC	0.44	0.10	0.45	0.34	0.40	0.17
60	Ser	AGT	0.04	0.09	0.06	0.02	0.12	0.14
	Ser	AGC	0.05	0.31	0.32	0.20	0.12	0.07

65

# ES 2 744 868 T3

Ser	TCG	0.22	0.04	0.06	0.42	0.19	0.08
Ser	TCA	0.16	0.08	0.10	0.09	0.06	0.31
Ser	TCT	0.05	0.17	0.15	0.07	0.15	0.23
Ser	TCC	0.47	0.31	0.30	0.20	0.35	0.18
Thr	ACG	0.30	0.16	0.13	0.42	0.23	0.10
Thr	ACA	0.06	0.21	0.18	0.03	0.13	0.38
Thr	ACT	0.22	0.18	0.23	0.08	0.19	0.27
Thr	ACC	0.42	0.46	0.46	0.47	0.45	0.25
Trp	TGG	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Tyr	TAT	0.07	0.16	0.21	0.12	0.18	0.67
Tyr	TAC	0.93	0.84	0.79	0.88	0.82	0.33
Val	GTG	0.50	0.64	0.62	0.57	0.22	0.30
Val	GTA	0.02	0.03	0.05	0.04	0.09	0.27
Val	GTT	0.06	0.11	0.11	0.04	0.22	0.10
Val	GTC	0.42	0.22	0.23	0.35	0.47	0.33

Amino ácido	Codon	<i>Cylindro- theca fusiformis</i>	<i>Amphi- dinium carterae</i>	<i>Symbiodini- um micro- adriacticum</i>	<i>Nanno- chlorop- sis sp</i>	<i>Cyclotell- a cryptica</i>	<i>Navicul- a pelliculo- sa</i>	<i>Thalassios- ira pseudona- na</i>	<i>C. reinhar- dtii</i>
Ala	GCG	0.07	0.17	0.22	0.24	0.11	0.00	0.11	0.35
Ala	GCA	0.14	0.33	0.26	0.10	0.16	0.13	0.25	0.08
Ala	GCT	0.35	0.29	0.20	0.17	0.45	0.44	0.33	0.13
Ala	GCC	0.43	0.20	0.32	0.48	0.27	0.44	0.30	0.43
Arg	AGG	0.09	0.15	0.27	0.00	0.09	0.05	0.18	0.05
Arg	AGA	0.14	0.03	0.27	0.00	0.05	0.10	0.17	0.01
Arg	CGG	0.06	0.08	0.09	0.00	0.04	0.05	0.06	0.20
Arg	CGA	0.16	0.18	0.09	0.29	0.08	0.35	0.11	0.04
Arg	CGT	0.34	0.18	0.09	0.14	0.47	0.20	0.34	0.09
Arg	CGC	0.22	0.40	0.18	0.57	0.28	0.25	0.15	0.62
Asn	AAT	0.42	0.37	0.21	0.00	0.25	0.47	0.43	0.09
Asn	AAC	0.58	0.63	0.79	1.00	0.75	0.53	0.57	0.91
Asp	GAT	0.54	0.54	0.50	0.20	0.52	0.20	0.56	0.14
Asp	GAC	0.46	0.46	0.50	0.80	0.48	0.80	0.44	0.86
Cys	TGT	0.44	0.75	0.50	0.00	0.29	0.10	0.54	0.10
Cys	TGC	0.56	0.25	0.50	1.00	0.71	0.90	0.46	0.90
End	TGA	0.13	0.50	1.00	0.00	0.10	0.00	0.31	0.27
End	TAG	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.38	0.22
End	TAA	0.77	0.50	0.00	1.00	0.90	1.00	0.31	0.52
Gln	CAG	0.12	0.33	0.28	0.41	0.19	0.21	0.16	0.38
Gln	CAA	0.25	0.15	0.17	0.00	0.17	0.28	0.19	0.04
Glu	GAG	0.23	0.41	0.50	0.59	0.38	0.17	0.40	0.55
Glu	GAA	0.39	0.10	0.06	0.00	0.26	0.34	0.26	0.03
Gly	GGG	0.06	0.19	0.32	0.10	0.10	0.03	0.12	0.11
Gly	GGA	0.47	0.10	0.12	0.05	0.45	0.28	0.51	0.06

# ES 2 744 868 T3

5	Gly	GGT	0.35	0.34	0.16	0.25	0.22	0.13	0.23	0.11
	Gly	GGC	0.12	0.37	0.40	0.60	0.24	0.56	0.14	0.72
	His	CAT	0.39	0.12	0.40	0.00	0.42	1.00	0.50	0.11
	His	CAC	0.61	0.88	0.60	1.00	0.58	0.00	0.50	0.89
	Ile	ATA	0.06	0.05	0.00	0.00	0.04	0.00	0.08	0.03
	Ile	ATT	0.42	0.53	0.38	0.14	0.53	0.73	0.38	0.22
10	Ile	ATC	0.52	0.42	0.63	0.86	0.42	0.27	0.54	0.75
	Leu	TTG	0.26	0.35	0.39	0.22	0.20	0.16	0.29	0.04
	Leu	TTA	0.09	0.01	0.00	0.00	0.03	0.00	0.05	0.01
	Leu	CTG	0.09	0.22	0.39	0.09	0.06	0.12	0.08	0.73
15	Leu	CTA	0.05	0.00	0.04	0.00	0.03	0.04	0.06	0.03
	Leu	CTT	0.37	0.31	0.13	0.04	0.39	0.36	0.20	0.05
	Leu	CTC	0.13	0.12	0.04	0.65	0.29	0.32	0.32	0.15
20	Lys	AAG	0.60	0.93	0.85	1.00	0.70	0.83	0.76	0.95
	Lys	AAA	0.40	0.07	0.15	0.00	0.30	0.17	0.24	0.05
	Met	ATG	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	Phe	TTT	0.37	0.21	0.25	0.20	0.31	0.78	0.38	0.16
25	Phe	TTC	0.63	0.79	0.75	0.80	0.69	0.22	0.62	0.84
	Pro	CCG	0.11	0.14	0.18	0.08	0.10	0.21	0.16	0.33
	Pro	CCA	0.33	0.42	0.09	0.08	0.16	0.29	0.31	0.08
	Pro	CCT	0.32	0.22	0.41	0.25	0.35	0.21	0.31	0.13
30	Pro	CCC	0.24	0.22	0.32	0.58	0.39	0.29	0.23	0.47
	Ser	AGT	0.12	0.13	0.09	0.00	0.09	0.13	0.18	0.04
	Ser	AGC	0.09	0.24	0.14	0.13	0.08	0.28	0.11	0.35
35	Ser	TCG	0.13	0.03	0.05	0.00	0.15	0.25	0.17	0.25
	Ser	TCA	0.12	0.25	0.05	0.00	0.12	0.08	0.12	0.05
	Ser	TCT	0.30	0.16	0.23	0.13	0.39	0.25	0.23	0.07
	Ser	TCC	0.24	0.19	0.45	0.75	0.18	0.03	0.19	0.25
40	Thr	ACG	0.09	0.14	0.10	0.28	0.10	0.18	0.21	0.30
	Thr	ACA	0.15	0.28	0.10	0.00	0.15	0.09	0.19	0.08
	Thr	ACT	0.39	0.12	0.10	0.17	0.33	0.41	0.28	0.10
	Thr	ACC	0.37	0.47	0.70	0.56	0.43	0.32	0.32	0.52
45	Trp	TGG	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
	Tyr	TAT	0.38	0.32	0.20	0.00	0.38	0.20	0.39	0.10
	Tyr	TAC	0.62	0.68	0.80	1.00	0.62	0.80	0.61	0.90
50	Val	GTG	0.11	0.65	0.67	0.31	0.16	0.18	0.29	0.67
	Val	GTA	0.06	0.05	0.00	0.00	0.09	0.09	0.16	0.03
	Val	GTT	0.38	0.08	0.11	0.15	0.42	0.09	0.28	0.07
	Val	GTC	0.46	0.21	0.22	0.54	0.33	0.64	0.27	0.22

55

60

Amino ácido	Codon	<i>Yarrowia lipolytica</i>	<i>Mortierella alpina</i>	<i>Rhodococcus opacus</i>
Ala	GCG	0.08	0.14	0.35

65

# ES 2 744 868 T3

	Ala	GCA	0.11	0.12	0.14
	Ala	GCT	0.35	0.29	0.09
5	Ala	GCC	0.46	0.45	0.43
	Arg	AGG	0.05	0.05	0.05
	Arg	AGA	0.13	0.06	0.02
10	Arg	CGG	0.12	0.06	0.26
	Arg	CGA	0.52	0.09	0.12
	Arg	CGT	0.11	0.32	0.11
	Arg	CGC	0.07	0.42	0.44
15	Asn	AAT	0.17	0.15	0.21
	Asn	AAC	0.83	0.85	0.79
	Asp	GAT	0.35	0.42	0.24
20	Asp	GAC	0.65	0.58	0.76
	Cys	TGT	0.46	0.13	0.26
	Cys	TGC	0.54	0.87	0.74
	End	TGA	0.16	0.05	0.72
25	End	TAG	0.38	0.25	0.17
	End	TAA	0.46	0.70	0.11
	Gln	CAG	0.33	0.36	0.28
30	Gln	CAA	0.08	0.06	0.06
	Glu	GAG	0.44	0.49	0.45
	Glu	GAA	0.14	0.09	0.22
	Gly	GGG	0.05	0.03	0.18
35	Gly	GGA	0.28	0.29	0.15
	Gly	GGT	0.32	0.32	0.20
	Gly	GGC	0.34	0.36	0.48
40	His	CAT	0.34	0.27	0.20
	His	CAC	0.66	0.73	0.80
	Ile	ATA	0.03	0.01	0.05
45	Ile	ATT	0.44	0.33	0.14
	Ile	ATC	0.53	0.66	0.81
	Leu	TTG	0.09	0.27	0.09
	Leu	TTA	0.02	0.00	0.01
50	Leu	CTG	0.37	0.26	0.41
	Leu	CTA	0.05	0.02	0.03
	Leu	CTT	0.18	0.12	0.06
55	Leu	CTC	0.29	0.32	0.40
	Lys	AAG	0.84	0.91	0.80
	Lys	AAA	0.16	0.09	0.20
	Met	ATG	1.00	1.00	1.00
60	Phe	TTT	0.38	0.39	0.09
	Phe	TTC	0.62	0.61	0.91
	Pro	CCG	0.10	0.07	0.52
65	Pro	CCA	0.10	0.08	0.09
	Pro	CCT	0.32	0.36	0.07



Pro	CCC	0.47	0.49	0.32
Ser	AGT	0.07	0.05	0.08
Ser	AGC	0.11	0.14	0.23
Ser	TCG	0.16	0.32	0.33
Ser	TCA	0.08	0.08	0.07
Ser	TCT	0.28	0.12	0.05
Ser	TCC	0.30	0.29	0.24
Thr	ACG	0.11	0.17	0.28
Thr	ACA	0.14	0.10	0.11
Thr	ACT	0.26	0.23	0.07
Thr	ACC	0.49	0.49	0.53
Trp	TGG	1.00	1.00	1.00
Tyr	TAT	0.18	0.20	0.18
Tyr	TAC	0.82	0.80	0.82
Val	GTG	0.33	0.22	0.37
Val	GTA	0.05	0.02	0.05
Val	GTT	0.26	0.27	0.10
Val	GTC	0.36	0.49	0.49

Tabla 20. Proteínas de la vía de biosíntesis de lípidos.

**3-cetoacil ACP sintasa**

*Cuphea hookeriana* sintasa-ACP 3-cetoacil (Nº de acceso GenBank AAC68861.1), *Cuphea wrightii* beta-ketoacil-ACP sintasa II (Nº de acceso GenBank AAB37271.1), *Cuphea lanceolata* betacetoacil-ACP sintasa IV (Nº de acceso GenBank CAC59946.1), *Cuphea wrightii* beta-cetoacil-ACP sintasa II (Nº de acceso GenBank AAB37270.1), *Ricinus communis* cetoacil-ACP sintasa (Nº de acceso GenBank XP\_002516228), *Gossypium hirsutum* cetoacil-ACP sintasa (Nº de acceso GenBank ADK23940.1), *Glicina max* plastid 3-ceto-acil-ACP sintasa II-A (Nº de acceso GenBank AAW88763.1), *Elaeis guineensis* beta-cetoacil-ACP sintasa II (Nº de acceso GenBank AAF26738.2), *Helianthus annuus* plástidos 3-ceto-acil-ACP sintasa I (Nº de acceso GenBank ABM53471.1), *Glicina MAX3*-ceto-acil-ACP sintasa I (Nº de acceso GenBank NP\_001238610.1), *Helianthus annuus* plástidos 3-ceto-acil-ACP sintasa II (Nº de acceso GenBank ABI18155.1), sintasa de *Brassica napus* beta-cetoacil ACP-2 (Nº de acceso GenBank AAF61739.1), *Perilla frutescens* beta-cetoacil-ACP sintasa II (Nº de acceso GenBank AAC04692.1), *Helianthus annuus* beta-cetoacil-ACP sintasa II (Nº de acceso de GenBank ABI18155), *Ricinus communis* beta-cetoacil-ACP sintasa II (Nº de acceso de GenBank AAA33872), *Haematococcus pluvialis* beta-cetoacil proteína portadora de acilo sintasa (Nº de acceso de GenBank HM560033.1), *Jatropha curcas* beta cetoacil-ACP sintasa I (Nº de acceso de GenBank ABJ90468.1), *Populus trichocarpa* beta-cetoacil-ACP sintasa I (Nº de acceso de GenBank XP\_002303661.1), *Coriandrum sativum* beta-cetoacil-ACP sintasa I (Nº de acceso de GenBank AAK58535.1), *Arabidopsis thaliana* 3-oxoacil-[acil-portador-proteína] sintasa I (Nº de acceso de GenBank NP\_001190479.1), *Vitis vinifera* 3-oxoacil-[acil-portador-proteína] sintasa I (Nº de acceso de GenBank XP\_002272874.2)

**Tioesterasas acil-ACP graso**

(continuado)

tioesterasa de acil-ACP graso *Umbellularia californica* (Nº de acceso GenBank AAC49001), tioesterasa de acil-ACP *Cinnamomum camphora* (Nº de acceso GenBank Q39473), tioesterasa de acil-ACP graso *Umbellularia californica* (Nº de acceso GenBank Q41635), tioesterasa de acil-ACP graso *Myristica fragrans* (Nº de acceso GenBank AAB71729), tioesterasa de acil-ACP graso *Myristica fragrans* (Nº de acceso GenBank AAB71730), tioesterasa de acil-ACP graso *Elaeis guineensis* (Nº de acceso GenBank ABD83939), tioesterasa de acil-ACP graso *Elaeis guineensis* (Nº de acceso GenBank AAD42220), tioesterasa de acil-ACP graso *Populus tomentosa* (Nº de acceso GenBank ABC47311), tioesterasa de acil-ACP graso *Arabidopsis thaliana* (Nº de acceso GenBank NP\_172327), tioesterasa de acil-ACP graso *Arabidopsis thaliana* (Nº de acceso GenBank CAA85387), tioesterasa de acil-ACP graso *Arabidopsis thaliana* (Nº de acceso GenBank CAA85388), tioesterasa de acil-ACP graso *Gossypium hirsutum* (Nº de acceso GenBank Q9SQI3), tioesterasa de acil-ACP graso *Cuphea lanceolata* (Nº de acceso GenBank CAA54060), tioesterasa de acil-ACP graso *Cuphea hookeriana* (Nº de acceso GenBank AAC72882), tioesterasa de acil-ACP *Cuphea calophylla subsp. mesostemon* (Nº de acceso GenBank ABB71581), tioesterasa de acil-ACP graso *Cuphea lanceolata* (Nº de acceso GenBank CAC19933), tioesterasa de acil-ACP graso *Elaeis guineensis* (Nº de acceso GenBank AAL15645), tioesterasa de acil-ACP graso *Cuphea hookeriana* (Nº de acceso GenBank Q39513), tioesterasa de acil-ACP graso *Gossypium hirsutum* (Nº de acceso GenBank AAD01982), tioesterasa de acil-ACP graso *Vitis vinifera* (Nº de acceso GenBank CAN81819), tioesterasa de acil-ACP graso *Garcinia mangostana* (Nº de acceso GenBank AAB51525), tioesterasa de acil-ACP graso *Brassica juncea* (Nº de acceso GenBank ABI18986), tioesterasa de acil-ACP graso *Madhuca longifolia* (Nº de acceso GenBank AAX51637), tioesterasa de acil-ACP graso *Brassica napus* (Nº de acceso GenBank ABH11710), tioesterasa de acil-ACP graso *Brassica napus* (Nº de acceso GenBank CAA52070.1), *Oryza sativa* (grupo indica cultivar) tioesterasa de acil-ACP graso (Nº de acceso GenBank EAY86877), *Oryza sativa* (grupo Japonica cultivar) tioesterasa de acil-ACP graso (Nº de acceso GenBank NP\_001068400), *Oryza sativa* (grupo indica cultivar) tioesterasa de acil-ACP graso (Nº de acceso GenBank EAY99617), tioesterasa de acil-ACP graso *Cuphea hookeriana* (Nº de acceso GenBank AAC49269), tioesterasa de acil-ACP graso *Ulmus americana* (Nº de acceso GenBank AAB71731), tioesterasa de acil-ACP graso *Cuphea lanceolata* (Nº de acceso GenBank CAB60830), tioesterasa de acil-ACP graso *Cuphea palustris* (Nº de acceso GenBank AAC49180), *Iris germanica* tioesterasa de acil-ACP graso (Nº de acceso GenBank AAG43858), tioesterasa de acil-ACP graso *Iris germanica* (Nº de acceso GenBank AAG43858.1), tioesterasa de acil-ACP graso *Cuphea palustris* (Nº de acceso GenBank AAC49179), tioesterasa de acil-ACP graso *Myristica fragrans* (Nº de acceso GenBank AAB71729), tioesterasa de acil-ACP graso *Myristica fragrans* (Nº de acceso GenBank AAB717291.1), tioesterasa de acil-ACP graso *Cuphea hookeriana* (Nº de acceso GenBank U39834), tioesterasa de acil-ACP graso *Umbellularia californica* (Nº de acceso GenBank M94159), tioesterasa de acil-ACP graso *Cinnamomum camphora* (Nº de acceso GenBank U31813), tioesterasa de acil-ACP graso *Ricinus communis* (Nº de acceso GenBank ABS30422.1), tioesterasa de acil-ACP graso *Helianthus annuus* (Nº de acceso de GenBank AAL79361.1), tioesterasa de acil-ACP graso *Jatropha curcas* (Nº de acceso de GenBank ABX82799.3), tioesterasa de proteína portadora de oleoil-acil *Zea mays*, (Nº de acceso de GenBank ACG40089.1), tioesterasa de acil-ACP graso *Haematococcus pluvialis* (Nº de acceso de GenBank HM560034.1)

Enzimas de desaturasa

(continuado)

desaturasa de ácido graso 3C *Linum usitatissimum*, (Nº de acceso GenBank ADV92272.1), desaturasa de ácido graso omega-3 *Ricinus communis*, el retículo endoplásmico, putativo, (Nº de acceso GenBank EEF36775.1), desaturasa de ácido graso omega-3 *Vernicia fordii*, (Nº de acceso GenBank AAF12821), desaturasa de ácido graso cloroplasto omega 3 isoforma 2 *Glicina max*, (Nº de acceso GenBank ACF19424.1), *Prototheca moriformis* FAD-D omega 3 desaturasa (SEQ ID NO: 35), *Prototheca moriformis* desaturasa linoleato (SEQ ID NO: 36), *Carthamus tinctorius* delta 12 desaturasa, (Nº de acceso de GenBank ADM48790.1), *Gossypium hirsutum* omega-6 desaturasa, (Nº de acceso de GenBank CAA71199.1), *Glicina max* desaturasa microsomal (Nº de acceso de GenBank BAD89862.1), *Zea mays* desaturasa de ácido graso (Nº de acceso de GenBank ABF50053.1), *Brassica napa* desaturasa de ácido linoleico (Nº de acceso de GenBank AAA32994.1), *camelina sativa* omega-3 desaturasa (SEQ ID NO: 37), *Prototheca moriformis* delta 12 desaturasa alelo 2 (SEQ ID NO: 38), *camelina sativa* omega-3 FAD7-1 (SEQ ID NO: 39), *Helianthus annuus* desaturasa de estearoil-ACP, (Nº de acceso de GenBank AAB65145.1), *Ricinus communis* desaturasa de estearoil-ACP, (Nº de acceso de GenBank AACG59946.1), *Brassica juncea* delta-9-desaturasa plastídica de estearoil-ACP (Nº de acceso de GenBank AAD40245.1), *Glicina max* desaturasa de estearoil-ACP (Nº de acceso de GenBank ACJ39209.1), *Olea europaea* desaturasa de estearoil-ACP (Nº de acceso de GenBank AAB67840.1), *Vernicia fordii* estearoil-acil-portadora desaturasa de proteína, (Nº de acceso de GenBank ADC32803.1), *Descurainia sophia* delta-12 desaturasa de ácido graso (Nº de acceso de GenBank ABS86964.2), *Euphorbia lagascae* desaturasa de ácidos oleicos delta 12 (Nº de acceso GenBank AAS57577.1), *Chlorella vulgaris* desaturasa ácido graso delta 12 (Nº de acceso de GenBank ACF98528), *Chlorella vulgaris* desaturasa ácido graso omega-3 (Nº de acceso GenBank BAB78717), *Haematococcus pluvialis* omega-3 desaturasa de ácido graso (Nº de acceso de GenBank HM560035.1), *Haematococcus pluvialis* desaturasa estearoil-ACP (Nº de acceso de GenBank EF586860.1), *Haematococcus pluvialis* estearoil-ACP-desaturasa N° de Acceso a Genbank EF523479.1

#### Enzimas de oleato de 12-hidroxilasa

*Ricinus communis* oleato de 12-hidroxilasa (Nº de acceso GenBank AAC49010.1), *Physaria lindheimeri* oleato de 12- hidroxilasa (Nº de acceso GenBank ABQ01458.1), *Physaria lindheimeri* mutante bifuncional oleato de 12-hidroxilasa: desaturasa (Nº de acceso GenBank ACF17571.1.), *Physaria lindheimeri* oleato bifuncional de 12-hidroxilasa: desaturasa (Nº de acceso de GenBank ACQ42234.1), *Physaria lindheimeri* oleato bifuncional de 12-hidroxilasa: desaturasa (Nº de acceso GenBank AAC32755.1.), *Arabidopsis lyrata subsp. lyrata* (Nº de acceso GenBank XP\_002884883.1)

#### Enzimas glicerol 1-3-fosfato

*Arabidopsis thaliana* aciltransferasa de glicerol-3-fosfato BAA00575, *Chlamydomonas reinhardtii* aciltransferasa fosfato-3-glicerol (Nº de acceso GenBank EDP02129), *Chlamydomonas reinhardtii* aciltransferasa de glicerol-3-fosfato (Nº de acceso GenBank Q886Q7), *Cucurbita moschata* acil-(acil-portador-proteína): aciltransferasa de glicerol-3-fosfato (Nº de acceso GenBank BAB39688.), *Elaeis guineensis* aciltransferasa de glicerol-3-fosfato, ((Nº de acceso GenBank AAF64066), *Garcinia mangostana* aciltransferasa de glicerol-3-fosfato (Nº de acceso GenBank ABS86942), *Gossypium hirsutum* aciltransferasa de glicerol-3-fosfato (Nº de acceso GenBank ADK23938), *Jatropha curcas* aciltransferasa de glicerol-3-fosfato (Nº de acceso GenBank ADV77219), *Jatropha curcas* aciltransferasa plastidial de glicerol-3-fosfato (Nº de acceso GenBank ACR61638), *Ricinus communis* aciltransferasa plastidial glicerol-fosfato (Nº de acceso GenBank EEF43526), *Vicia faba* aciltransferasa de glicerol-3-fosfato (Nº de acceso de GenBank AAD05164), *Zea mays* aciltransferasa de glicerol-3-fosfato (Nº de acceso GenBank ACG45812)

#### Enzimas de aciltransferasa de ácido lisofosfatídico

(continuado)

*Arabidopsis thaliana* 1-acil-sn-aciltransferasa de glicerol-3-fosfato (Nº de acceso de GenBank AEE85783), *Brassica juncea* 1-acil-sn-aciltransferasa de glicerol-3-fosfato (Nº de acceso de GenBank ABQ42862), *Brassica juncea* 1-acil-sn-aciltransferasa de glicerol-3-fosfato (Nº de acceso de GenBank ABM92334), *Brassica napus* 1-acil-sn-aciltransferasa de glicerol-3-fosfato (Nº de acceso de GenBank de CAB09138), *Chlamydomonas reinhardtii* aciltransferasa de ácido lisofosfatídico (Nº de acceso de GenBank EDP02300), *Cocos nucifera* aciltransferasa de ácido lisofosfatídico (Nº de acceso GenBank AAC49119), *Limnanthes alba* aciltransferasa de ácido lisofosfatídico (Nº de acceso de GenBank EDP02300), *Limnanthes douglasii* 1-acil-sn-aciltransferasa de glicerol-3-fosfato (putativo) (Nº de acceso de GenBank CAA88620), *Limnanthes douglasii* acil-CoA: aciltransferasa sn-1-acilglicerol-3-fosfato (Nº de acceso de GenBank ABD62751), *Limnanthes douglasii* O-aciltransferasa de 1-acilglicerol-3-fosfato (Nº de acceso de GenBank CAA58239), *Ricinus communis* aciltransferasa de 1-acil-sn-glicerol-3-fosfato (Nº de acceso de GenBank EEF39377)

Enzimas de aciltransferasa de diacilglicerol

*Arabidopsis thaliana* aciltransferasa de diacilglicerol (Nº de acceso GenBank CAB45373), *Brassica juncea* aciltransferasa de diacilglicerol (Nº de acceso GenBank AAY40784), *Elaeis guineensis* aciltransferasa de diacilglicerol putativo (Nº de acceso GenBank AEQ94187), *Elaeis guineensis* aciltransferasa de diacilglicerol putativo (Nº de acceso GenBank AEQ94186), *Glicina max* acil CoA: aciltransferasa de diacilglicerol (Nº de acceso GenBank AAT73629.), *Helianthus annuus* aciltransferasa de diacilglicerol (Nº de acceso GenBank ABX61081), *Olea europaea* acil-CoA: aciltransferasa de diacilglicerol 1 (Nº de acceso GenBank AAS01606.), *Ricinus communis* aciltransferasa de diacilglicerol (Nº de acceso GenBank AAR11479)

Enzimas de aciltransferasa de diacilglicerol de fosfolípidos

Fosfolípido *Arabidopsis thaliana*: aciltransferasa de diacilglicerol (Nº de acceso GenBank AED91921.), *Elaeis guineensis* fosfolípido putativo: aciltransferasa de diacilglicerol (Nº de acceso GenBank AEQ94116.), *Glicina max* fosfolípidos: aciltransferasa de diacilglicerol 1 (Nº de acceso GenBank Nº XP\_003541296), *Jatropha curcas* fosfolípido: aciltransferasa de diacilglicerol (Nº de acceso GenBank AEZ56255.), *Ricinus communis* fosfolípido: aciltransferasa de diacilglicerol (Nº de acceso GenBank ADK92410.), *Ricinus communis* fosfolípido: aciltransferasa de diacilglicerol (Nº de acceso GenBank AEW99982)

#### EJEMPLO 34: INGENIERÍA DE MICROALGAS PARA AUXOTROFIA DE ÁCIDOS GRASOS

[0325] Cepa B del Ejemplo 3, *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) modificado para expresar una *Cuphea wrightii* tioesterasa (cwTE2), fue utilizada como el organismo huésped para su posterior modificación genética para noquear ambos alelos tioesterasa endógenos, FATA1-1 y FATA1-2. Aquí, una primera construcción de transformación fue generada para integrar un casete de expresión de neomicina en la cepa B en el locus FATA1-1. Este constructo, pSZ2226, incluidas secuencias de recombinación homólogas 5' (SEQ ID NO: 30) y 3' (SEQ ID NO: 31) (de orientación que flanquean el constructo) para el locus FATA1-1 del genoma nuclear y una secuencia de codificación de proteínas de resistencia de neomicina bajo el control del promotor  $\beta$ -tubulina/5'UTR *C. reinhardtii* (SEQ ID NO: 5) y *Chlorella vulgaris* nitrato reductasa 3' UTR (SEQ ID NO: 6). Este casete de expresión NeoR se muestra como SEQ ID NO: 15 y sirvió como un marcador seleccionable.

[0326] Tras la transformación de pSZ2226 en la cepa B, se seleccionaron los transformantes individuales en placas de agar que contienen sacarosa y G418. Un único aislado, la cepa H, se seleccionó para su posterior modificación genética. Una segunda construcción de transformación, pSZ2236, se generó para integrar los polinucleótidos que permiten la expresión de un marcador seleccionable de tiamina en la cepa H en el locus FATA1-2. pSZ2236 incluidas secuencias de recombinación 5' (SEQ ID NO: 32) y 3' (SEQ ID NO: 33) homólogas (de orientación que flanquean el constructo) a la región genómica FATA1-2 para la integración en *P. moriformis* (UTEX 1435) del genoma nuclear y una región codificante de proteína THIC *A. thaliana* bajo el control de *C. protothecoides* promotor de la actina/5'UTR (SEQ ID NO: 22) y *C. vulgaris* nitrato reductasa 3' UTR (SEQ ID NO: 6). Este casete de expresión A<sup>t</sup>THIC se muestra como SEQ ID NO: 23 y sirvió como un marcador seleccionable. Tras la transformación de la cepa H con pSZ2236 para generar la cepa I, los transformantes individuales fueron seleccionados en placas de agar que comprenden ácidos grasos libres. Cepa I era capaz de propagar sobre placas de agar y en medio carente de tiamina y suplementado con ácidos grasos libres.

#### EJEMPLO 35: MICROORGANISMOS DE INGENIERÍA PARA LA PRODUCCIÓN AUMENTADA DE ÁCIDO ESTEÁRICO

[0327] Una cepa clásicamente mutagenizada de *Prototheca moriformis* (UTEX 1435), Cepa J, se transformó con el constructo plásmido pSZ2281 de acuerdo con métodos de transformación biolística, como se describe en el

documento PCT/US2009/066141, PCT/US2009/066142, PCT/US2011/038463, PCT/US2011/038464, y PCT/US2012/023696. pSZ2281 incluía horquillas de ARN que codifican polinucleótidos (SAD2hpC, SEQ ID NO: 34) para regular a la baja la expresión de desaturasa de estearoil-ACP, secuencias de recombinación homóloga de orientación 5' (SEQ ID NO: 1) y 3' (SEQ ID NO: 2) (que flanquea el constructo) a la región genómica 6S para la integración en el genoma nuclear, y *S. suc2 cerevisiae* región codificante de la invertasa de sacarosa (SEQ ID NO: 4), para expresar la secuencia de la proteína dada en SEQ ID NO: 3, bajo el control de *C. reinhardtii* promotor  $\beta$ -tubulina/5'UTR (SEQ ID NO: 5) y *Chlorella vulgaris* nitrato reductasa 3' UTR (SEQ ID NO: 6). *S. cerevisiae* *suc2* casete de expresión se muestra como SEQ ID NO: 7 y sirvió como un marcador seleccionable. La secuencia de polinucleótido que codifica la horquilla de ARN SAD2hpC estaba bajo el control de *C. protothecoides* promotor de la actina/5'UTR (SEQ ID NO: 22) y *C. vulgaris* nitrato reductasa 3' UTR (SEQ ID NO: 6).

**[0328]** Tras la transformación de la cepa J con constructo pSZ2281, generando de este modo la cepa K, se seleccionaron los clones positivos en placas de agar que contienen sacarosa como única fuente de carbono. Los transformantes individuales fueron clonalmente purificados y propagados en condiciones heterotróficas adecuadas para la producción de lípidos como los que se detallan en el documento PCT/US2009/066141, PCT/US2009/066142, PCT/US2011/038463, PCT/US2011/038464, y PCT/US2012/023696. Muestras de lípidos se preparan a partir de biomasa seca y se analizaron usando los métodos de detección de ionización de cromatografía de gases de éster metílico de ácidos grasos de llama convencionales como se describe en el Ejemplo 1 (ver también PCT/US2012/023696). Los perfiles de ácidos grasos (expresados como % de área de los ácidos grasos totales) de *P. moriformis* UTEX cepa J propagado en glucosa como única fuente de carbono y tres aislados representativos de la cepa K, propagada en sacarosa como única fuente de carbono, se presenta en la Tabla 21.

Tabla 21. Perfiles de ácidos grasos de células *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) diseñadas para expresar una construcción de ARN de horquilla orientado a gen de desaturasa de ACP estearoil/products génicos.

Área % ácido graso	Cepa J	Cepa K-1	Cepa K-2	Cepa K-3	Cepa K-4
C8: 0					0,02
C10: 0	0,01	0,00	0,02	0,02	0,04
C12: 0	0,03	0,05	0,05	0,05	0,08
C14: 0	1,22	0,89	0,87	0,77	1,2
C16: 0	26,75	29,23	28,96	27,55	28,06
C18: 0	3,06	37,39	36,76	36,41	40,82
C18: 1	59,62	23,90	24,76	26,92	22,02
C18: 2	7,33	5,44	5,54	5,54	4,53
C18: 3					0,14
C20: 0					1,43

**[0329]** Los datos presentados en la Tabla 21 muestran un claro impacto de la expresión de constructo de ARN de horquilla SAD2 en los perfiles de ácidos grasos C18: 0 y C18: 1 del organismo transformado. Los perfiles de ácidos grasos de los transformantes de cepa K que comprenden un constructo de ARN de horquilla SAD2 demostraron un aumento en el porcentaje de ácidos grasos saturados C18: 0 con una disminución concomitante de ácidos grasos insaturados C18: 1. Perfiles de ácidos grasos de la cepa no transformada comprenden de aproximadamente 3% C18: 0. Perfiles de ácidos grasos de las cepas transformadas comprenden aproximadamente 37% de C18: 0. Estos datos ilustran la expresión exitosa y el uso de polinucleótidos que permiten la expresión de un constructo de horquilla de ARN SAD en *Prototheca moriformis* para alterar el porcentaje de ácidos grasos saturados en los microbios huésped manipulados, y en particular en el aumento de la concentración de ácidos grasos C18: 0 y la disminución de ácidos grasos C18: 1 en las células microbianas.

**[0330]** También mostrada en la Tabla 21, la cepa K-4 tenía un nivel aún elevado adicional de estearato. La cepa K4 fue creada mediante la inserción de la construcción de cepas K1-K3 en el locus de la SAD2B. Por lo tanto, por la anulación de una copia del gen SAD y la inhibición de las copias restantes a nivel del ARN, una reducción adicional en el ácido oleico y el aumento de estearato correspondiente se obtuvo. Análisis de los triglicéridos de aceite RBD obtenidos de cepa K4 mostró aproximadamente 12% de POP, 27% de POS y 18% de SOS.

**EJEMPLO 36: INGENIERÍA DE MICROORGANISMOS PARA LA PRODUCCIÓN AUMENTADA DE LOS ÁCIDOS OLEICOS A TRAVÉS KNOCKDOWN DE UNA TIOESTERASA DE ACIL-ACP ENDÓGENA**

**[0331]** Una cepa mutagenizada clásicamente de *Prototheca moriformis* (UTEX 1435), Cepa J, se transformó de forma independiente con cada uno de los constructos pSZ2402-pSZ2407 de acuerdo con métodos de transformación biolística, como se describe en el documento PCT/US2009/066141, PCT/US2009/066142, PCT/US2011/038463, PCT/US2011/038464 y PCT/US2012/023696. Cada uno de los constructos pSZ2402-pSZ2407 incluyó diferentes polinucleótidos que codifican un ARN de horquilla dirigida contra transcripciones de ARNm FATA1 *Prototheca moriformis* para regular a la baja la expresión de tioesterasa de acil-ACP graso, secuencias de recombinación 5' (SEQ ID NO: 1) y 3' (SEQ ID NO: 2) homólogas de orientación (que flanquean el constructo) a la región genómica 6S para la integración en el genoma nuclear, y *S. cerevisiae* *suc2* región de codificación de sacarosa invertasa (SEQ ID NO: 4) para expresar la secuencia de la proteína dada en SEQ ID NO: 3 bajo el control de *C. reinhardtii* promotor  $\beta$ -tubulina/5'UTR (SEQ ID NO: 5) y *Chlorella vulgaris* nitrato reductasa 3' UTR (SEQ ID NO: 6). *S. cerevisiae* *suc2* casete de expresión se muestra como SEQ ID NO: 7 y sirvió como un marcador seleccionable. Lista de secuencias identidades para los polinucleótidos correspondientes a cada horquilla se enumeran en la Tabla 22. La secuencia de polinucleótido que codifica cada horquilla de ARN estaba bajo el control de *C. reinhardtii* promotor  $\beta$ -tubulina/5'UTR (SEQ ID NO: 5) y *C. vulgaris* nitrato reductasa 3' UTR (SEQ ID NO: 6).

Tabla 22. Construcciones de plásmidos utilizados para transformar *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) Cepa J.

Construcción de plásmido	Designación de horquilla	SEQ ID NO:
pSZ2402	PmFATA-hpB	SEQ ID NO: 40
pSZ2403	PmFATA-hpC	SEQ ID NO: 41
pSZ2404	PmFATA-hpD	SEQ ID NO: 42
pSZ2405	PmFATA-hpE	SEQ ID NO: 43
pSZ2406	PmFATA-hpF	SEQ ID NO: 44
pSZ2407	PmFATA-hpG	SEQ ID NO: 45

**[0332]** Tras la transformación independiente de la cepa J con cada una de las construcciones enumeradas en la Tabla 22, se seleccionaron los clones positivos en placas de agar que contienen sacarosa como única fuente de carbono. Los transformantes individuales fueron purificados clonalmente y propagados en condiciones heterotróficas adecuadas para la producción de lípidos como los que se detallan en el documento PCT/US2009/066141, PCT/US2009/066142, PCT/US2011/038463, PCT/US2011/038464, y PCT/US2012/023696. Muestras de lípidos se preparan a partir de biomasa seca y se analizan usando los métodos de detección de ionización de cromatografía de gases de éster metílico de ácidos grasos de llama convencionales como se describe en el Ejemplo 1 (ver también PCT/US2012/023696). Los perfiles de ácidos grasos (expresados como % de área de los ácidos grasos totales) de *P. moriformis* (UTEX 1435) Cepa J propaga en glucosa como única fuente de carbono y aislados representativos de cada transformación de la cepa J, propagada en sacarosa como única fuente de carbono, se presentan en la Tabla 23.

Tabla 23. Perfiles de ácidos grasos de células *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) diseñadas para expresar construcciones de ARN en horquilla orientadas a gen de tioesterasa de acil-ACP graso/productos génicos.

Constructo	Área% Ácido Graso						
	C10: 0	C12: 0	C14: 0	C16: 0	C18: 0	C18: 1	C18: 2
Cepa J sin transformar	0	0,05	1,32	26,66	3,1	59,07	7,39
PmFATA-hpB	0,04	0,07	1,36	24,88	2,24	61,92	6,84
	0	0,08	1,33	25,34	2,39	61,72	6,5
	0	0,07	1,29	25,44	2,26	61,7	6,69
	0	0,06	1,33	25,1	2,37	61,56	6,87
PmFATA-hpC	0	0,08	1,18	22,03	1,71	63,8	8,63
	0	0,07	1,21	24,5	2,23	62,32	7,19
	0	0,08	1,29	24,93	2,24	62,02	7,01
	0,05	0,06	1,29	25,45	2,26	61,81	6,76
PmFATA-hpD	0	0,02	0,68	15,8	1,88	72,64	6,96
	0	0,03	0,78	17,56	1,7	71,8	6,03
	0	0,03	0,92	19,04	2,03	68,82	7,05
	0	0,04	1,27	23,14	2,25	65,27	6,07

(continúa)

5	Constructo	Área% Ácido Graso					
		C10: 0	C12: 0	C14: 0	C16: 0	C18: 0	C18: 1
10	PmFATA-hpE	0	0,03	0,79	18,55	2,13	69,66
		0	0,04	1,11	21,01	1,74	65,18
		0	0,03	1,08	21,11	1,54	64,76
		0	0,03	1,17	21,93	1,71	63,89
15	PmFATA-hpF	0,03	0,04	0,34	8,6	1,69	78,08
		0	0,03	0,49	10,2	1,52	76,97
		0	0,03	1	20,47	2,22	66,34
		0	0,03	1,03	21,61	1,88	65,39
20	PmFATA-hpG	0	0,03	1,03	20,57	2,36	64,73
		0	0,03	1,2	24,39	2,47	61,9
		0	0,04	1,29	24,14	2,29	61,41

[0333] Los datos presentados en la Tabla 23 muestran un claro impacto de la expresión de construcciones de ARN de horquilla FATA en perfiles de ácidos grasos C18: 0 y C18: 1 del organismo transformado. Los perfiles de ácidos grasos de los transformantes de cepa J comprenden un constructo de ARN de horquilla FATA demostraron un aumento en el porcentaje de C18: 1 de ácidos grasos con una disminución concomitante de C16: 0 y C18: 0 ácidos grasos. Perfiles de ácidos grasos de la cepa J no transformada son aproximadamente 26,66% C16: 0, 3% C18: 0, y alrededor de 59% de C18: 1 ácidos grasos. Por el contrario, los perfiles de ácidos grasos de las cepas transformadas comprenden tan bajo como 8,6% C16: 0 y 1,54% C18: 0 y más que 78% de C18: 1 ácidos grasos.

[0334] Estos datos ilustran la utilidad y uso exitoso de polinucleótido de construcciones de horquilla ARN FATA en *Prototheca moriformis* para alterar el perfil de ácidos grasos de microbios modificados, y en particular en el aumento de la concentración de C18: 1 ácidos grasos y la disminución de C18: 0 y C16: 0 ácidos grasos en las células microbianas.

#### EJEMPLO 37: MICROORGANISMOS DE INGENIERÍA PARA LA PRODUCCIÓN AUMENTADA DE ÁCIDOS GRASOS DE CADENA MEDIA A TRAVÉS DE SOBREEXPRESIÓN KASI O KASIV

[0335] Este ejemplo describe el uso de polinucleótidos recombinantes que codifican enzimas KASI o KASIV para diseñar microorganismos en los cuales los perfiles de ácidos grasos de los microorganismos transformados han sido enriquecidos en ácido láurico, C10: 0 y ácidos grasos saturados totales.

[0336] Cada uno de los constructos pSZD1132, pSZD1133, pSZD1134, o pSZD1201 se usó independientemente para transformar la cepa B del Ejemplo 3, *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) modificado para expresar *Cuphea wrightii* tioesterasa (cwTE2), de acuerdo con los métodos de transformación biolística, como se describe en el documento PCT/US2009/066141, PCT/US2009/066142, PCT/US2011/038463, PCT/US2011/038464, y PCT/US2012/023696. Cada uno de los constructos anteriores incluyeron diferentes polinucleótidos que codifican una enzima KASI o KASIV, secuencias de recombinación de orientación 5' (SEQ ID NO: 13) y 3' (SEQ ID NO: 14) homólogas (que flanquean el constructo) a la región genómica pLoop para la integración en el genoma nuclear, y una secuencia de resistencia a la neomicina que codifica la proteína bajo el control de *C. reinhardtii* promotor  $\beta$ -tubulina/5'UTR (SEQ ID NO: 5) y *Chlorella vulgaris* nitrato reductasa 3' UTR (SEQ ID NO: 6). Este casete de expresión NeoR se muestra como SEQ ID NO: 15 y sirvió como un marcador seleccionable. Lista de secuencias idénticas para los polinucleótidos correspondientes a cada constructo se enumeran en la Tabla 20. La secuencia de polinucleótido que codifica cada enzima KAS estaba bajo el control de *P. moriformis* UTEX 1435 promotor Amt03/5'UTR (SEQ ID NO: 8) y *C. vulgaris* nitrato reductasa 3' UTR (SEQ ID NO: 6). Las regiones codificadoras de proteína de las enzimas KAS y el gen de resistencia de neomicina fueron optimizados por codon para reflejar el sesgo de codon inherente a genes nucleares *P. moriformis* UTEX 1435 como se describe en el documento PCT/US2009/066141, PCT/US2009/066142, PCT/US2011/038463, PCT/US2011/038464, y PCT/US2012/023696.

[0337] Tras la transformación de los plásmidos individuales en la cepa B, se seleccionaron los clones positivos en placas de agar que contienen G418. Los transformantes individuales fueron clonalmente purificados y se hicieron crecer en sacarosa como única fuente de carbono a pH 7,0 en condiciones adecuadas para la producción de lípidos tal como se detalla en el documento PCT/US2009/066141, PCT/US2009/066142, PCT/US2011/038463, PCT/US2011/038464, y PCT/US2012/023696. Muestras de lípidos se prepararon a partir de biomasa seca de cada transformante y de perfiles de ácidos grasos de estas muestras se analizaron usando métodos de detección de

ionización éster metílico de cromatografía de gases de la llama de ácido graso estándar (FAME GC/FID) como se describe en el Ejemplo 1. Los perfiles de ácidos grasos (expresados como % de área de los ácidos grasos totales) de la cepa B y cuatro transformantes positivos de cada uno de pSZ2046 (cepas MP, 1-4) se presentan en la Tabla 24.

Tabla 24. Constructos plásmidos utilizados para transformar *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) Cepa B.

Construcción de plásmido	Fuente KASI / KASIV	Péptido de tránsito	SEQ ID NO:
pSZD1134	<i>Cuphea wrightii</i> Número de acceso GenBank U67317	Nativo	SEQ ID NO: 46
pSZD1201	<i>Cuphea wrightii</i>	PmSAD	SEQ ID NO: 47
pSZD1132	<i>Cuphea pulcherrima</i> Número de acceso GenBank AAC68860	Nativo	SEQ ID NO: 48
pSZD1133	<i>Cuphea hookeriana</i>	Nativo	SEQ ID NO: 49



Tabla 25. Perfiles de ácidos grasos de *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) Cepa diseñada para un aumento de C10, ácido láurico, y ácidos grasos saturados totales

Construcciones de plásmidos	N°	Ácido Graso (Área%)								
		C10	C12	C14	C16	C18:0	C18:1	C18:2	C10C12	%saturados/total
pSZ1283		7.89	35,49	16,58	11,5	1.09	19,64	6.49	43,38	72,55
pSZ1283, pSZD1134	1	14,94	43,97	12,19	7.56	0,72	14.11	5.31	58,91	79,38
pSZ1283, pSZD1134	2	10,27	39,61	15,35	9.61	0,94	17,1	5.88	49,88	75,78
pSZ1283, pSZD1134	3	11,69	41,83	15,21	8.77	0,83	15.04	5.40	53,52	78,33
D1134-20	4	10,76	40,77	15,32	9.19	0,88	16,06	5,76	51,53	76,92
pSZ1283, pSZD1132	1	10,77	40,31	15,21	9.43	0,88	16,18	5.97	51,08	76,6
pSZ1283, pSZD1132	2	9.19	37,03	15,02	10,52	1.00	19,63	6.29	46,22	72,76
pSZ1283, pSZD1132	3	8,97	36,09	15.01	10,77	1.05	20,38	6.39	45,06	71,89
pSZ1283, pSZD1132	4	9.51	38,12	14,96	9,96	0,94	18,93	6.32	47,63	73,49
pSZ1283, pSZD1201	1	13.06	46,21	9,84	7.12	0,75	16,7	5.22	59,27	76,98
pSZ1283, pSZD1201	2	11.02	43,91	13.01	7.78	0,86	16,53	5,77	54,93	76,58
pSZ1283, pSZD1201	3	11,59	45,14	12,41	7.61	0,82	15,72	5,65	56,73	77,57
pSZ1283, pSZD1201	4	10,66	41,32	13,74	8.75	0,68	18,64	5.21	51,98	75,15
pSZ1283, pSZD1133	1	6,90	36,08	15,15	11.02	1.00	21,74	6.77	42,98	70,15
pSZ1283, pSZD1133	2	7.01	35,88	15.01	10,75	1.07	22,02	6,93	42,89	69,72
pSZ1283, pSZD1133	3	10,65	41,94	12,38	8.48	0,85	18,28	6.15	52,59	74,3
pSZ1283, pSZD1133	4	10,23	41,88	12,58	8.52	0,82	18,48	6.22	52,11	74,03

[0338] Los datos presentados en la Tabla 25 muestran un claro impacto de la expresión exógena de enzimas de KASI y KASIV sobre perfiles de ácidos grasos C10: 0 y C12 del organismo transformado. Los perfiles de ácidos grasos de la cepa B, que expresan *Cuphea wrightii* tioesterasa solo, comprendida aproximadamente 8% C10: 0 y aproximadamente 35,5% C12: 0, con ácidos grasos saturados representan el 72,55% de ácidos grasos totales. En contraste, los transformantes de la cepa B modificados para expresar adicionalmente *Cuphea wrightii* KASI con *P. moriformis* péptido de tránsito de desaturasa estearoil ACP se caracteriza por un perfil de ácidos grasos de aproximadamente 13% C10: 0 y aproximadamente 46% C12: 0. Los ácidos grasos saturados representaron tan alto

como 77% en los transformantes de la cepa B co-expresión de *C. wrightii* proteína de fusión KASI. Del mismo modo, los transformantes de la cepa B modificados para expresar *C. wrightii* KASI con péptido de tránsito nativo de la enzima se caracteriza por un perfil de ácidos grasos de aproximadamente 15% C10, 44% C12, y aproximadamente 79% de ácidos grasos saturados. Los perfiles de ácidos grasos o muchos transformantes de la cepa B que expresan *Cuphea pulcherrima* KASIV o *Cuphea hookeriana* KASIV también mostraron niveles C10% y C12% elevados, en comparación con el perfil de ácidos grasos de la cepa B en sí.

**[0339]** Estos datos demuestran la utilidad y eficacia de polinucleótidos que permiten la expresión de constructos de KASI y KASIV en *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) para alterar el porcentaje de ácidos grasos saturados en los microbios huésped manipulados, y en particular en el aumento de la concentración de C10: 0 y C12: 0 ácidos grasos en células microbianas.

### **EJEMPLO 38: INGENIERÍA MICROORGANISMOS PARA LA PRODUCCIÓN AUMENTADA DE ÁCIDOS GRASOS DE CADENA MEDIA A TRAVÉS DE KNOCKOUT KASI**

**[0340]** Este ejemplo describe el uso de polinucleótidos recombinantes que interrumpen diferentes alelos KASI para diseñar microorganismos en los cuales los perfiles de ácidos grasos de los microorganismos transformados han sido enriquecidos en C10: 0 y ácidos grasos de cadena media.

**[0341]** Constructos pSZ2302 y pSZ2304 se utilizaron para transformar de forma independiente Cepa B del Ejemplo 3, *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) modificado para expresar *Cuphea wrightii* tioesterasa (*cwTE2*), de acuerdo con los métodos de transformación biolística, como se describe en el documento PCT/US2009/066141, PCT/US2009/066142, PCT/US2011/038463, PCT/US2011/038464, y PCT/US2012/023696. pSZ2302 incluidas secuencias de recombinación 5' (SEQ ID NO: 50) y 3' (SEQ ID NO: 51) homólogas (de orientación que flanquean el constructo) a la región genómica KASI alelo 1 para la integración en *P. moriformis* genoma nuclear, *A. thaliana* región codificante de proteína THIC bajo el control de *C. protothecoides* promotor de la actina/5'UTR (SEQ ID NO: 22) y *C. vulgaris* nitrato reductasa 3' UTR (SEQ ID NO: 6). pSZ2304 incluidas secuencias de recombinación 5' (SEQ ID NO: 52) y 3' (SEQ ID NO: 53) homólogas (de orientación que flanquean el constructo) a la región genómica KAS1 alelo 2 para su integración en *P. moriformis* genoma nuclear, *A. thaliana* región codificante de proteína THIC bajo el control de *C. protothecoides* promotor de la actina/5'UTR (SEQ ID NO: 22) y *C. vulgaris* nitrato reductasa 3' UTR (SEQ ID NO: 6). Este casete de expresión *AfTHIC* se muestra como SEQ ID NO: 23 y sirvió como un marcador de selección. La proteína de la región de codificación de *AfTHIC* se optimiza por codones para reflejar el sesgo de codón inherente *P. moriformis* genes nucleares UTEX 1435 como se describe en el documento PCT/US2009/066141, PCT/US2009/066142, PCT/US2011/038463, PCT/US2011/038464, y PCT/US2012/023696.

**[0342]** Tras transformación independiente de pSZ2302 y pSZ2304 en la cepa B, generando de este modo Cepa Q y R, se seleccionaron los clones positivos en placas de agar que comprenden tiamina. Los transformantes individuales fueron clonalmente purificados y cultivados en sacarosa como única fuente de carbono a pH 5,0 o pH 7,0 bajo condiciones heterotróficas adecuadas para la producción de lípidos tal como se detalla en el documento PCT/US2009/066141, PCT/US2009/066142, PCT/US2011/038463, PCT/US2011/038464, y PCT/US2012/023696. Muestras de lípidos se prepararon a partir de biomasa seca de cada transformante y de perfiles de ácidos grasos de estas muestras se analizaron usando métodos de detección de ionización de ácido graso de éster metílico de cromatografía de gas de la llama (FAME GC/FID) como se describe en el Ejemplo 1. Los perfiles de ácidos grasos (expresados como Área % de ácidos grasos totales) de la cepa B y pSZ2302 positivo (Cepa Q, 1-5) y pSZ2304 (cepa R, 1-5) transformantes se presentan en las Tablas 26 y 27.

Tabla 26. Perfiles de ácidos grasos de *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) Cepas B, Q y R diseñadas para aumentar los ácidos grasos de la cadena media, cultivados a pH 5.0.

		Ácido Graso (Área%)							
Tensión	Plásmido(s) de transformaci ón	C10: 0	C12: 0	C14: 0	C16: 0	C18: 0	C18: 1	C18: 2	C10- C14
UTEX 1435	Ninguna	0,00	0,04	1,28	26,67	3,05	59,96	7,19	1,32
Cepa B	pSZ1283	0,01	0,09	1,09	21,60	2,21	65,15	7,94	1,19
Tensión Q-1	pSZ1283, pSZ2302	0,08	1,21	7,52	38,71	1,38	38,32	8,75	8,81
Tensión Q-2	pSZ1283, pSZ2302	0,15	1,36	7,51	38,23	1,33	38,27	8,94	9,02
Tensión Q-3	pSZ1283, pSZ2302	0,16	1,43	7,49	38,88	1,30	37,58	8,73	9,08
Tensión Q-4	pSZ1283, pSZ2302	0,00	1,71	7,42	37,67	1,43	37,26	10,38	9,13
Tensión Q-5	pSZ1283, pSZ2302	0,13	1,21	7,36	38,81	1,31	38,07	8,71	8,7
Tensión R-1	pSZ1283, pSZ2304	0,19	1,78	8,47	40,11	1,34	33,46	9,98	10,44
Tensión R-2	pSZ1283, pSZ2304	0,90	8,00	7,78	28,96	1,15	30,26	17,14	16,68
Tensión R-3	pSZ1283, pSZ2304	0,26	3,58	7,77	34,98	1,56	32,86	14,60	11,61
Tensión R-4	pSZ1283, pSZ2304	1,64	13,50	7,61	21,38	0,90	36,13	14,73	22,75
Tensión R-5	pSZ1283, pSZ2304	1,03	9,63	7,56	25,61	1,00	31,70	18,23	18,22

Tabla 27. Perfiles de ácidos grasos de *Prototheca moriformis* (UTEX 1435), cepas B, Q y R diseñadas para aumentar los ácidos grasos de la cadena media, cultivados a pH 7,0

5			Ácido Graso (Área%)							
	Tensión	Plásmido (s) de transformación	C10: 0	C12: 0	C14: 0	C16: 0	C18: 0	C18: 1	C18: 2	C10-C14
10	UTEX 1435	Ninguna	0,01	0,04	1,34	27,94	3,24	57,46	7,88	1,39
15	Tensión segundo	pSZ1283	4,72	29,57	15,56	12,63	1,20	27,65	7,39	49,85
	Tensión Q-1	pSZ1283, pSZ2302	16,00	50,61	9,52	5,33	0,54	11,79	5,28	76,13
20	Tensión Q-2	pSZ1283, pSZ2302	16,32	49,79	9,82	5,52	0,54	12,28	4,87	75,93
	Tensión Q-3	pSZ1283, pSZ2302	15,08	47,58	10,23	5,93	0,56	15,12	4,50	72,89
25	Tensión Q-4	pSZ1283, pSZ2302	14,27	47,30	10,44	6,17	0,56	15,50	4,59	72,01
	Tensión Q-5	pSZ1283, pSZ2302	14,75	47,28	10,32	6,04	0,59	15,50	4,65	72,35
30	Tensión R-1	pSZ1283, pSZ2304	21,25	55,42	7,97	3,65	0,00	5,46	5,66	84,64
35	Tensión R-2	pSZ1283, pSZ2304	13,00	55,05	10,88	5,78	0,28	7,90	6,29	78,93
	Tensión R-3	pSZ1283, pSZ2304	12,89	53,15	11,11	6,13	0,00	9,87	6,13	77,15
40	Tensión R-4	pSZ1283, pSZ2304	12,80	51,64	13,86	6,69	0,00	7,51	6,70	78,3
45	Tensión R-5	pSZ1283, pSZ2304	16,61	51,42	9,84	5,27	0,33	11,15	4,79	77,87

[0343] Los datos presentados en las Tablas 26 y 27 muestran un claro impacto de la interrupción de diferentes alelos KASI en los perfiles de ácidos grasos de los organismos transformados. Cuando se cultivan a un pH de 5,0, los perfiles de ácidos grasos de *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) y *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) Cepa B, que expresa *Cuphea wrightii* tioesterasa FATB2 bajo el control de un promotor regulable pH fueron muy similares. Estos perfiles se caracterizaron por aproximadamente 1% C14: 0, aproximadamente 21-26% C16: 0, alrededor del 2-3% C18: 0, aproximadamente 60-65% C18: 1, aproximadamente 7% de C18: 2, con C10-C14 ácidos grasos que comprenden de aproximadamente 1,19 a 1,3% de ácidos grasos totales. En contraste, cuando se cultiva a un pH de 5,0, Cepa B más modificada para interrumpir KASI alelo 1 (cepa Q) o KASI alelo 2 (cepa R) demostraron perfiles de ácidos grasos alterados que se caracterizan por aumento de los niveles de C12, los niveles de aumento de C14, disminución de niveles de C18, y la disminución de los niveles de C18: 1 ácidos grasos en comparación con la cepa B o UTEX 1435. Los perfiles de ácidos grasos de los aislados de cepas Q y R diferían en que aislados de cepa R (alelo 2 knockout) tenían generalmente mayores C12s y menores C16s y C18: 1s que la cepa Q (alelo 1 knockout).

[0344] Cuando se cultivaron a pH 7,0, el perfil de ácidos grasos de *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) es distinto de *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) Cepa B que expresa *Cuphea wrightii* tioesterasa FATB2 bajo el control de un promotor de pH regulable. Cuando se cultivaron a pH 7,0, Cepa B se caracteriza por un perfil de ácidos grasos elevado en ácidos grasos C10, C12, y C14 (estos compuestos sobre 50% de los ácidos grasos totales). Cuando se cultivaron a pH 7,0, cepa Q y cepa R demostraron perfiles de ácidos grasos con todavía aumenta en C10, C12, y C14 ácidos grasos y aún disminuye aún más en C18: 0 y C18: 1 ácidos grasos con respecto a la cepa B. De nuevo, se observaron

diferencias en los perfiles de ácidos grasos entre la cepa Q y R con el perfil de la cepa R comprende mayores niveles porcentuales de C12 y menores niveles de C18: 1 que la cepa P.

**[0345]** Estos datos ilustran la expresión y el uso de polinucleótidos que permiten la expresión de KASI y KASIV construcciones en éxito *Prototheca moriformis* para alterar el porcentaje de ácidos grasos saturados en los microbios huésped manipuladas, y en particular en el aumento de la concentración de C10: 0 y C12: 0 ácidos grasos y la disminución de la concentración de C18: 0 y C18: 1 ácidos grasos en las células microbianas. Además, los datos aquí indican los diferentes alelos KASI pueden romperse para dar como resultado perfiles de ácidos grasos alteradas de los organismos transformados.

### **EJEMPLO 39: INGENIERÍA DE MICROORGANISMOS PARA LA PRODUCCIÓN AUMENTADA DE ÁCIDOS GRASOS DE CADENA MEDIA A TRAVÉS DE KNOCKDOWN KASI**

**[0346]** Este ejemplo describe el uso de polinucleótidos recombinantes que codifican horquillas de ARN para atenuar una enzima KASI para diseñar un microorganismo en el que el perfil de ácidos grasos del microorganismo transformado se ha enriquecido en ácidos grasos de cadena media.

**[0347]** Una cepa mutagenizada clásicamente de *Prototheca moriformis* (UTEX 1435), cepa S, se transformó de forma independiente con cada uno de los constructos pSZ2482-pSZ2485 de acuerdo con métodos de transformación biolística, como se describe en el documento PCT/US2009/066141, PCT/US2009/066142, PCT/US2011/038463, PCT/US2011/038464 y PCT/US2012/023696. Cada uno de los constructos pSZ2482-pSZ2485 incluyó diferentes polinucleótidos que codifican ARN de horquilla dirigidos contra transcritos KASI de ARNm (UTEX 1435) para regular a la baja la expresión de acil-ACP graso tioesterasa, secuencias de recombinación 5' (SEQ ID NO: 1) y 3' (SEQ ID NO: 2) homólogas de orientación (que flanquean el constructo) a la región genómica 6S para la integración en el genoma nuclear, y *S. cerevisiae* región de codificación *suc2* invertida sacarosa (SEQ ID NO: 4) para expresar la secuencia de la proteína dada en SEQ ID NO: 3 bajo el control de *C. reinhardtii* promotor de  $\beta$ -tubulina/5'UTR (SEQ ID NO: 5) y *Chlorella vulgaris* nitrato reductasa 3' UTR (SEQ ID NO: 6). *S. cerevisiae* *suc2* casete de expresión se muestra como SEQ ID NO: 7 y sirvió como un marcador seleccionable. Identidades de lista de secuencias para los polinucleótidos correspondientes a cada horquilla KASI se enumeran en la Tabla 28. La secuencia de polinucleótido que codifica cada horquilla de ARN estaba bajo el control de *P. moriformis* promotor Amt03/5'UTR (SEQ ID NO: 8) y *C. vulgaris* nitrato reductasa 3' UTR (SEQ ID NO: 6). La región de codificación de proteína del casete de expresión *suc2* se optimizó por codones para reflejar el sesgo de codón inherente a genes nucleares *P. moriformis* UTEX 1435 como se describe en el documento PCT/US2009/066141, PCT/US2009/066142, PCT/US2011/038463, PCT/US2011/038464, y PCT/US2012/023696.

Tabla 28. Construcciones de plásmidos utilizados para transformar *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) Cepa S.

Construcción de transformación	Horquilla	SEQ ID NO:
pSZ2482	KASI horquilla B	SEQ ID NO: 54
pSZ2483	KASI horquilla C	SEQ ID NO: 55
pSZ2484	KASI horquilla D	SEQ ID NO: 56
pSZ2485	KASI horquilla E	SEQ ID NO: 57

**[0348]** Tras la transformación independiente de la cepa S con cada una de las construcciones enumeradas en la Tabla 28, se seleccionaron los clones positivos en placas de agar que contienen sacarosa como única fuente de carbono. Los transformantes individuales fueron purificados clonalmente y propagados en condiciones heterotróficas adecuadas para la producción de lípidos como los que se detallan en el documento PCT/US2009/066141, PCT/US2009/066142, PCT/US2011/038463, PCT/US2011/038464, y PCT/US2012/023696. Muestras de lípidos se preparan a partir de biomasa seca y se analizaron usando los métodos de detección de ionización de llama de cromatografía de gases de ésteres metílicos de ácidos grasos como se describe en el Ejemplo 1 (ver también PCT/US2012/023696). Los perfiles de ácidos grasos (expresados como % de área de los ácidos grasos totales) de *P. moriformis* UTEX 1435 propagado en glucosa como única fuente de carbono y cuatro aislados representativos de cada transformación de la cepa S, propagado en sacarosa como única fuente de carbono, se presentan en la Tabla 29.

Tabla 29. Perfiles de ácidos grasos de células *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) diseñadas para expresar construcciones de ARN en horquilla orientadas a gen KASI/productos génicos

Tensión	Plásmido	Nº	Ácido Graso (Área%)							
			C10: 0	C12: 0	C14: 0	C16: 0	C18: 0	C18: 1	C18: 2	C18: 3
UTEX 1435	ninguna	1	0,00	0,04	1,45	27,97	3,18	58,35	6,78	0,60
Tensión S	pSZ2482	1	0,19	0,74	8,47	38,30	2,15	36,24	9,45	1,42
		2	0,07	0,25	4,16	32,46	2,62	49,57	7,73	0,82
		3	0,03	0,10	2,68	27,48	2,65	56,40	8,14	0,55
		4	0,03	0,10	2,60	27,44	2,01	55,54	9,15	0,78
	pSZ2483	1	0,00	0,06	1,94	30,58	1,55	53,26	9,31	0,76
		2	0,20	0,05	1,76	28,01	2,31	56,61	8,70	0,60
		3	0,00	0,06	1,60	24,38	2,65	58,25	9,93	1,15
		4	0,00	0,04	1,56	26,65	2,96	60,06	6,92	0,52
	pSZ2484	1	0,72	3,71	19,15	38,03	1,68	14,22	15,00	4,21
		2	0,66	2,76	16,34	38,19	1,78	18,52	14,91	3,38
		3	0,69	2,96	16,20	37,28	1,77	19,05	15,26	3,48
		4	0,18	0,70	8,61	36,80	2,35	36,22	10,89	1,10
	pSZ2485	1	0,00	0,04	1,41	25,34	3,16	60,12	7,78	0,48
		2	0,03	0,04	1,41	23,85	2,19	61,23	8,75	0,67
		3	0,00	0,04	1,41	24,41	2,23	60,64	8,69	0,67
		4	0,00	0,04	1,41	24,51	2,16	60,85	8,91	0,66

[0349] Los datos presentados en la Tabla 29 muestran un claro impacto de la expresión de construcciones de ARN de horquilla KAS en los perfiles de ácidos grasos de los organismos transformados. Los perfiles de ácidos grasos de los transformantes de cepa S que comprenden ya sea constructo de ARN de horquilla KASI pSZ2482 o pSZ2484 demostraron un aumento en el porcentaje de ácidos grasos C10, C12, C14, y C16 con una disminución concomitante de C18: 0 y C18: 1 ácidos grasos con respecto al perfil de ácidos grasos de UTEX 1435.

[0350] Estos datos ilustran la utilidad y uso exitoso de polinucleótido de construcciones de horquilla de ARN KASI en *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) para alterar el perfil de ácidos grasos de microbios modificados, y en particular en el aumento de la concentración de ácidos grasos de cadena media y la disminución de C18: 0 y C18: 1 ácidos grasos en las células microbianas.

#### EJEMPLO 40: INGENIERÍA DE MICROORGANISMOS PARA LA PRODUCCIÓN AUMENTADA DE ÁCIDO ESTEÁRICO A TRAVÉS DE SOBREEXPRESIÓN DE ELONGASA

[0351] Este ejemplo describe el uso de polinucleótidos recombinantes que codifican elongasas para diseñar un microorganismo en el que el perfil de ácidos grasos del microorganismo transformado se ha enriquecido en ácido esteárico, ácido araquídico y ácido docosadienoico.

[0352] Una cepa mutagenizada clásicamente de *Prototheca moriformis* (UTEX 1435), Cepa J, se transformó de forma independiente con cada uno de los constructos pSZ2323, pSZ2324, o pSZ2328 de acuerdo con métodos de transformación biolística, como se describe en el documento PCT/US2009/066141, PCT/US2009/066142, PCT/US2011/038463, PCT/US2011/038464, y PCT/US2012/023696. Cada uno de los constructos incluyen una proteína de región de codificación para sobreexpresar una elongasa, secuencias de recombinación de orientación 5' (SEQ ID NO: 1) y 3' (SEQ ID NO: 2) homólogas (que flanquean el constructo) a la región genómica 6S para la integración en el genoma nuclear, y *S. cerevisiae* región de codificación *suc2* invertida para sacarosa (SEQ ID NO: 4) para

expresar la secuencia de la proteína dada en SEQ ID NO: 3 bajo el control de *C. reinhardtii* promotor  $\beta$ -tubulina/5'UTR (SEQ ID NO: 5) y *Chlorella vulgaris* nitrato reductasa 3' UTR (SEQ ID NO: 6). *S. cerevisiae* *suc2* casete de expresión se muestra como SEQ ID NO: 7 y sirvió como un marcador seleccionable. Identidades de lista de secuencias para los polinucleótidos correspondientes a cada elongasa se enumeran en la Tabla 30. La secuencia de polinucleótido que codifica cada elongasa estaba bajo el control de *P. moriformis* promotor Amt03/5'UTR (SEQ ID NO: 8) y *C. vulgaris* nitrato reductasa 3' UTR (SEQ ID NO: 6). Las regiones de codificación de proteína de las elongasas exógenas y el casete de expresión *suc2* se optimizó por codones para reflejar el sesgo de codón inherente a *P. moriformis* genes nucleares UTEX 1435 como se describe en el documento PCT/US2009/066141, PCT/US2009/066142, PCT/US2011/038463, PCT/US2011/038464, y PCT/US2012/023696.

Tabla 30. Construcciones de plásmidos utilizados para transformar *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) Cepa J.

Construcción de plásmido	Fuente de Elongasa	Nº de acceso de GenBank	SEQ ID NO:
pSZ2328	<i>Marchantia polymorpha</i>	AAP74370	58, 59
pSZ2324	<i>Trypanosoma brucei</i>	AAX70673	60, 61
pSZ2323	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	P39540	62, 63

[0353] Tras la transformación independiente de la cepa J con las construcciones enumeradas en la Tabla 30, se seleccionaron los clones positivos en placas de agar que contienen sacarosa como única fuente de carbono. Los transformantes individuales fueron purificados clonalmente y propagados en condiciones heterotróficas adecuadas para la producción de lípidos como los que se detallan en el documento PCT/US2009/066141, PCT/US2009/066142, PCT/US2011/038463, PCT/US2011/038464, y PCT/US2012/023696. Muestras de lípidos se prepararon a partir de biomasa seca y se analizaron usando los métodos de detección de ionización de llama de cromatografía de gases de ésteres metílicos de ácidos grasos como se describe en el Ejemplo 1 (ver también PCT/US2012/023696). Los perfiles de ácidos grasos (expresados como % de área de los ácidos grasos totales) de *P. moriformis* UTEX 1435 Cepa J propagado en glucosa como única fuente de carbono y tres aislados representativos de cada transformación de la cepa J, propagado en sacarosa como única fuente de carbono se presentan en la Tabla 31.

Tabla 31. Perfiles de ácidos grasos de células de la cepa J de *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) diseñadas para sobreexpresar elongasas

Construcción de plásmido	Nº	Área % de ácidos grasos								
		C14: 0	C16: 0	C16: 1	C18: 0	C18: 1	C18: 2	C18: 3 $\alpha$	C20: 0	C22: 2n6
Ninguna	1	1,39	27,42	0,77	3,33	57,46	8,05	0,61	0,30	0,03
pSZ2328	1	1,25	19,23	0,85	8,26	57,54	9,34	0,79	0,73	0,94
pSZ2328	2	1,22	17,76	0,69	7,86	60,56	9,38	0,59	0,6	0,47
pSZ2328	3	1,26	18,37	0,92	7,83	58,77	10,01	0,72	0,64	0,52
pSZ2324	1	1,51	22,97	1,09	8,71	53,01	9,63	0,65	0,68	0,55
pSZ2324	2	1,29	20,6	0,92	7,53	56,97	9,92	0,73	0,64	0,43
pSZ2324	3	1,28	20,59	0,93	7,33	57,52	9,68	0,65	0,58	0,42
pSZ2323	1	1,65	27,27	0,67	3,56	56,68	8,72	0,33	0,36	0,00
pSZ2323	2	1,56	28,44	0,74	3,36	55,22	9,07	0,46	0,39	0,03
pSZ2323	3	1,64	28,7	0,75	3,34	55,29	8,59	0,49	0,36	0,02

[0354] Los datos presentados en la Tabla 31 muestran un claro impacto de la expresión de enzimas de *Marchantia polymorpha* y *Trypanosoma brucei* sobre perfiles de ácidos grasos C14, C16, C18: 0, C20: 0 y C22: 2n6 de los organismos transformados. El perfil de ácidos grasos de la cepa J no transformada fue de aproximadamente 27,42% C16: 0, aproximadamente 3% C18: 0, aproximadamente 57,5% de C18: 1, aproximadamente 0,3% C20: 0 y aproximadamente 0,03% C22: 2n6 ácidos grasos. En contraste con la cepa J, los perfiles de ácidos grasos de la cepa J transformadas con diferentes constructos de plásmido para expresar elongasas comprendidas más bajos niveles de porcentaje de C16 y más altos niveles de porcentaje de C18: 0, C20: 0 y C22: 2n6 ácidos grasos. El resultado de la sobreexpresión de elongasa de *Marchantia polymorpha* fue de aproximadamente un aumento de 2,5 veces en los niveles porcentuales de C18: 0 ácidos grasos, un incremento de 2 veces en los niveles porcentuales de C20: 0 ácidos grasos, y alrededor de un aumento en veces de 15 a 30 en los niveles porcentuales de C22: 2N6 ácidos grasos

relativos al perfil de ácidos grasos de la cepa J.

[0355] Estos datos ilustran el uso exitoso de polinucleótidos que codifican para la expresión en elongasas *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) para alterar el perfil de ácidos grasos de microbios modificados, y en particular en el aumento de la concentración de C18: 0, C20: 0 y C22: 2n6 ácidos grasos y la disminución de C16: 0 ácidos grasos en las células microbianas recombinantes.

#### EJEMPLO 41: INGENIERÍA DE MICROORGANISMOS PARA LA PRODUCCIÓN AUMENTADA DE ÁCIDO ESTEÁRICO A TRAVÉS DE SOBREEXPRESIÓN DE TIOESTERASA DE ACIL-ACP

[0356] Este ejemplo describe el uso de polinucleótidos recombinantes que codifican diferente tioesterasa de acil-ACP que prefiere C18: 0 para diseñar microorganismos en los cuales los perfiles de ácidos grasos de los microorganismos transformados han sido enriquecidos en ácido esteárico.

[0357] Cepas clásicamente mutagenizadas de *Prototheca moriformis* (UTEX 1435), cepa J o cepa A, se transformaron de manera independiente con los constructos enumerados en la Tabla 32 de acuerdo con los métodos de transformación biolística, como se describe en el documento PCT/US2009/066141, PCT/US2009/066142, PCT/US2011/038463, PCT/US2011/038.464, y PCT/US2012/023696. Cada uno de los constructos incluyen una proteína de región de codificación para sobreexpresar una tioesterasa de acil-ACP graso con una etiqueta de epítipo FLAG® 3X C-terminal, secuencias recombinantes 5' (SEQ ID NO: 1) y 3' (SEQ ID NO: 2) homólogas (que flanquean el constructo) a la región genómica 6S para la integración en el genoma nuclear, y una *S. cerevisiae* región de codificación *suc2* invertida para sacarosa (SEQ ID NO: 4) para expresar la secuencia de la proteína dada en SEQ ID NO: 3 bajo el control de *C. reinhardtii* promotor  $\beta$ -tubulina/5'UTR (SEQ ID NO: 5) y *Chlorella vulgaris* nitrato reductasa 3' UTR (SEQ ID NO: 6). *S. cerevisiae* *suc2* casete de expresión se muestra como SEQ ID NO: 7 y sirvió como un marcador seleccionable. Identidades de lista de secuencias para los polinucleótidos correspondientes a cada tioesterasa se enumeran en la Tabla 32. La secuencia de polinucleótidos que codifican cada tioesterasa estaba bajo el control de *P. moriformis* promotor Amt03/5'UTR (SEQ ID NO: 8) y *C. vulgaris* nitrato reductasa 3' UTR (SEQ ID NO: 6). Las regiones de codificación de proteína de las tioesterasas exógenas y casete de expresión de *suc2* se optimizaron por codones para reflejar el sesgo de codón inherente a *P. moriformis* genes nucleares UTEX 1435 como se describe en el documento PCT/US2009/066141, PCT/US2009/066142, PCT/US2011/038463, PCT/US2011/038464, y PCT/US2012/023696.

Tabla 32. Construcciones de plásmidos utilizados para transformar *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) Cepa A o Cepa J.

Construcción de plásmido	Tioesterasa de Acil-ACP, N° de acceso GenBank	Fuente de tioesterasa de Acil-ACP	Fuente de péptido de tránsito	SEQ ID NO:
pSZD581	FATA, CAA52070	<i>Brassica napus</i>	nativo	64, 65
pSZD643	FATA, CAA52070	<i>Brassica napus</i>	UTEX 250 SAD	66, 67
pSZD645	FATA, AAA33019	<i>C. tinctorius</i>	UTEX 250 SAD	68, 69
pSZD644	FATA, ABS30422	<i>Ricinus communis</i>	nativo	70, 71
pSZD1323	FATA, AAB51523	<i>G. mangostana</i>	nativo	72, 73
pSZD1320	FATA	<i>Theobroma cacao</i>	nativo	74, 75

[0358] Tras la transformación independiente de la cepa A o J con las construcciones enumeradas en la Tabla 32, se seleccionaron los clones positivos en placas de agar que contienen sacarosa como única fuente de carbono. Los transformantes individuales fueron purificados clonalmente y propagados en condiciones heterotróficas adecuadas para la producción de lípidos como los que se detallan en el documento PCT/US2009/066141, PCT/US2009/066142, PCT/US2011/038463, PCT/US2011/038464, y PCT/US2012/023696. Muestras de lípidos se preparan a partir de biomasa seca y se analizaron usando los métodos de detección de ionización de llama de cromatografía de gases de ésteres metílicos de ácidos grasos como se describe en el Ejemplo 1 (ver también PCT/US2012/023696). Los perfiles de ácidos grasos (expresados como % de área de los ácidos grasos totales) de *P. moriformis* UTEX 1435 Cepa J propaga en glucosa como única fuente de carbono y cepas representativas de cada transformación de la cepa J, propagada en sacarosa como única fuente de carbono se presentan en la Tabla 33.



Tabla 33. Perfiles de ácidos grasos de *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) células de cepa J diseñadas para sobreexpresar enzimas de tioesterasa de acil-ACP exógeno

Cepa	Construcción de plásmido	Nº	Área % de ácidos grasos					
			C14: 0	C16: 0	C18: 0	C18: 1	C18: 2	C18: 3 $\alpha$
A	Ninguna	1	1,08	25,48	3,23	59,70	8,25	0,70
J	Ninguna	1	1,41	27,33	3,38	57,07	8,15	0,64
A	pSZD581	1	1,02	26,60	14,47	44,80	10,05	0,65
		2	1,08	28,24	13,57	43,89	10,07	0,68
		3	0,97	24,70	9,13	50,85	11,27	0,82
A	pSZD643	1	1,39	26,97	16,21	44,10	8,43	0,83
		2	1,37	27,91	11,15	48,31	8,40	0,78
A	pSZD645	1	0,90	23,39	8,35	50,69	13,34	0,96
A	pSZD644	1	1,67	19,70	4,40	59,15	12,32	1,01
J	pSZD1323	1	1,33	23,26	9,28	53,42	10,35	0,69
		2	1,47	26,84	7,36	52,78	9,29	0,64
		3	1,43	26,31	6,05	54,45	9,37	0,66
J	pSZD1320	1	1,30	24,76	3,84	60,90	6,96	0,55
		2	1,36	26,30	3,27	58,19	8,66	0,48
		3	1,39	25,51	3,18	58,78	8,85	0,45

[0359] Los datos presentados en la Tabla 33 muestran un claro impacto de la expresión de enzimas acil-ACP exógenos en los perfiles de ácidos grasos de los microorganismos transformados. Los perfiles de ácidos grasos de la cepa no transformada A y J fueron aproximadamente 25% de C16: 0, aproximadamente 3,3% de C18: 0, aproximadamente 57 a 60% de C18: 1. Por el contrario, los perfiles de ácidos grasos de la cepa A transformados con diferentes constructos plásmidos para expresar las enzimas acil-ACP comprendían mayores niveles porcentuales de C18: 0 y menores niveles porcentuales de C18: 1 ácidos grasos que la de la cepa A. Expresión de enzimas *FATA* de *B. napus*, *C. tinctorius*, *R. communis* y *G. mangostana* en la cepa A o J permitieron la acumulación de los niveles de estearato en los organismos transformados. El resultado de la sobreexpresión de *Brassica napus* tioestearasa acil-ACP era un aumento de aproximadamente 2 a 5 veces en los niveles porcentuales de C18: 0 ácidos grasos del perfil de ácidos grasos de los organismos transformados en relación con el perfil de ácidos grasos de los perfiles de ácidos grasos de cepa A. de células manipuladas para sobreexpresar *G. mangostana* tioesterasa de acil-ACP *FATA* con *C. protothecoides* péptido de tránsito SAD1 se caracteriza por un aumento de aproximadamente 2 a 3 veces en los niveles porcentuales de C18: 0 ácidos grasos del perfil de ácidos grasos del organismo transformado en relación con el perfil de ácidos grasos de la cepa J.

[0360] Estos datos ilustran la utilidad y uso efectivo de polinucleótidos que codifican tioesterasas de acil-ACP graso para la expresión en *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) para alterar el perfil de ácidos grasos de microbios modificados, y en particular en el aumento de la concentración de C18: 0 y la disminución de C18: 1 ácidos grasos en células microbianas recombinantes.

#### EJEMPLO 42: INGENIERÍA DE MICROORGANISMOS PARA LA PRODUCCIÓN AUMENTADA DE ÁCIDO ERÚCICO A TRAVÉS DE ELONGASA O SOBREEXPRESIÓN DE SINTASA DE BETA-CETOACIL-COA

[0361] En un ejemplo de la presente descripción, un vector de transformación de polinucleótido recombinante operable

para expresar una elongasa exógena o sintasa de beta-cetoacil-CoA en un microbio oleaginoso opcionalmente plastídico está construido y utilizado para transformar *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) de acuerdo con los métodos de transformación biolística, como se describe en el documento PCT/US2009/066141, PCT/US2009/066142, PCT/US2011/038463, PCT/US2011/038464, y PCT/US2012/023696 para obtener una célula aumentada para la producción de ácido erúico. El vector de transformación incluye una región de codificación de proteína para sobreexpresar una elongasa o sintasa de beta-cetoacil-CoA tales como los enumerados en la Tabla 5, el promotor y secuencias de control 3'UTR para regular la expresión del gen exógeno, secuencias de orientación recombinantes 5' y 3' homólogas orientadas a los polinucleótidos recombinantes para la integración en *P. moriformis* (UTEX 1435) del genoma nuclear, y los nucleótidos operables para expresar un marcador seleccionable. Las secuencias codificantes de proteínas del vector de transformación se optimizan por codones para la expresión *P. moriformis* (UTEX 1435) como se describe en el documento PCT/US2009/066141, PCT/US2009/066142, PCT/US2011/038463, PCT/US2011/038464, y PCT/US2012/023696. Polinucleótidos recombinantes que codifican promotores, 3' UTRs, y marcadores seleccionables operables para la expresión en *P. moriformis* (UTEX 1435) se dan a conocer en el presente documento y en el documento PCT/US2009/066141, PCT/US2009/066142, PCT/US2011/038463, PCT/US2011/038464, y PCT/US2012/023696.

**[0362]** Tras la transformación del vector de transformación en *P. moriformis* (UTEX 1435) o una cepa clásica mutagenizada de *P. moriformis* (UTEX 1435), los clones positivos se seleccionan sobre placas de agar. Los transformantes individuales son clonalmente purificados y cultivados bajo condiciones heterotróficas adecuadas para la producción de lípidos tal como se detalla en el documento PCT/US2009/066141, PCT/US2009/066142, PCT/US2011/038463, PCT/US2011/038464, y PCT/US2012/023696. Muestras de lípidos se preparan a partir de biomasa seca de cada transformante y de perfiles de ácidos grasos de estas muestras se analizan usando métodos de detección de ionización de ácido graso de éster metílico de cromatografía de gas de la llama (FAME GC/FID) como se describe en el Ejemplo 1. Como resultado de estas manipulaciones, la célula puede exhibir un aumento en ácido erúico de al menos 5, 10, 15, o 20 veces.

#### **EJEMPLO 43: GENERACIÓN DE ACEITES RICOS EN ÁCIDO CÁPRICO, LÁURICO Y MIRÍSTICO EN CEPA UTEX1435 POR LA EXPRESIÓN DE CUPHEA PSR23 LPAATS**

**[0363]** Hemos ensayado el efecto de la expresión de dos aciltransferasas 1-acil-sn-glicerol-3-fosfato (LPAATs) en una cepa transgénica descrita previamente *P. moriformis* (UTEX 1435), expresando la tioesterasa acil ACP (FATB2) a partir de *Cuphea wrightii*. Los genes LPAAT2 y LPAAT3 de *Cuphea* PSR23 (CuPSR23) se identificaron por análisis de una combinación de secuencias genómicas CuPSR23 y secuencias transcriptómicas derivadas de ARN de semillas. Los dos LPAATs no se han descrito previamente. Los genes se optimizaron por codones para reflejar uso de codones UTEX 1435. Transformaciones, cultivo celular, producción de lípidos y análisis de ácidos grasos fueron llevados a cabo como se describió previamente.

**[0364] La acumulación de ácido cáprico, láurico y mirístico en la cepa B por la expresión de las aciltransferasas *Cuphea* PSR23 1-acil-sn-glicerol-3-fosfato (LPAAT2 y LPAAT3) [pSZ2299 y pSZ2300, respectivamente]:** En este ejemplo, las cepas transgénicas se generan a través de transformación de la cepa B con las construcciones pSZ2299 o pSZ2300, la codificación CuPSR23 LPAAT2 y LPAAT3, respectivamente. Se seleccionaron las cepas transgénicas para la resistencia al antibiótico G418. El constructo pSZ2299 se puede escribir como pLOOP5': :CrTUB2:NeoR:CvNR::PmAMT3:CuPSR23LPAAT2-1: CvNR: :pLOOP3'. El constructo pSZ2300 se puede escribir como pLOOP5': :CrTUB2:NeoR:CvNR::PmAMT3:CuPSR23LPAAT3-1:CvNR::pLOOP3'. La secuencia del ADN transformante (pSZ2299 y pSZ2300) se proporciona a continuación. Los sitios de restricción relevantes en el constructo de 5'-3', BspQI, KpnI, XbaI, MfeI, BamHI, EcoRI, SpeI, XhoI, SacI, BspQI, respectivamente, se indican en minúsculas, negrita y subrayado. Los sitios BspQI delimitan los extremos 5' y 3' del ADN transformante, secuencias minúsculas en negrita en los extremos 5' y 3' de la construcción representan ADN genómico de UTEX 1435 que se dirigen a la integración al locus pLoop mediante recombinación homóloga. Procediendo en la dirección 5' a 3', el casete de selección tiene *C. reinhardtii* promotor de  $\beta$ -tubulina conduciendo a la expresión gen *NeoR* (confiriendo resistencia a G418) y *Chlorella vulgaris* *nitrate reductase* (NR) de genes 3' UTR. El promotor se indica mediante texto en minúsculas, en caja. El iniciador ATG y el terminador TGA para *NeoR* se indican mediante cursiva y en mayúsculas, mientras que la región de codificación está indicada con minúsculas en letra cursiva. 3' UTR se indica mediante texto en minúsculas subrayadas. La región espaciadora entre los dos casetes se indica mediante texto en mayúsculas. El segundo casete que contiene el gen LPAAT2 optimizado por codón (pSZ2299) o gen LPAAT3 (pSZ2300) a partir de *Cuphea* PSR23 es impulsado por *Prototheca moriformis* promotor AMT3 endógeno, y tiene *Chlorella vulgaris* *nitrate reductase* (NR) de genes 3' UTR. En este casete, el promotor AMT3 se indica por letras minúsculas, texto en caja. El iniciador ATG y el terminador TGA para genes CuPSR23 LPAAT2 y LPAAT3 se indican en cursiva y en mayúsculas, mientras que las regiones de codificación se indican mediante minúsculas en cursiva. 3' UTR se indica mediante texto en minúsculas subrayadas. Las construcciones finales se secuenciaron para asegurar marcos de lectura correctos y secuencias de direccionamiento.

Constructo transformante pSZ2299

5 **gctcttcgctaacggagggtctgtcaccaaatggaccccgctattgegggaaccacggcgatggcacgtttcaaaacttgat**  
**gaaatacaatattcagtatgtcgccggcgaggcgacggcgaggagtgatgtcgcgctgggtattgcttaatcgccagcttcgcc**  
**cccgctcttggcgcgaggcggtgaacaagccgacgatgtgcacgagcaaatcctgacactagaagggtgactcgcccgga**  
**cggctgaattacacaggcttgcaaaaataccagaatttgacgcaccgctattcgcggtattttgttgacagtgaatagcgatg**  
 10 **cggcaatggcttgtggcggttagaagggtgcgacgaagggtgggccaccactgtgccagccagtcctggcggtcccaggggccc**  
**cgatcaagagccaggacatccaaactacccacagcatcaacgccccggcctatactegaacccccacttgcaactctgcaatggt**  
**atgggaaccacggggcagttcttgtgtgggtcgccctatcgcggtcggggaagaccgggaaggtacc****ctttcttcgctatgac**  
 15 **acttcagcaaaaggtagggcggtgcgagacggcttcccggcgctgcatgcaacaccgatgatgcttcgacccccgaagctcc**  
**ttcggggctgcatggcgctccgatgccgctccaggcgagcgctgtttaaatagccaggccccgattgcaaagacattatagcga**  
**gctaccaaagccatattcaaacacctagatcactaccacttctacacaggccactcgagcttgtgatcgcaactccgctaagggggcg**  
 20 **ctcttctcttcgttcagtcacaaccgcaaactctaga****atatcaATGatcgagcaggacggcctccacgccggtccccgccg**  
**cctgggtggagcgctgttcggctacgactgggcccagcagaccatcggtgctccgacgcccgctgttcgctgtccgcca**  
 25 **gggcccgcctgtgttcgtgaagaccgacctgtccggcgccctgaacgagctgcaggacgagggcccgcctgtctggt**  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50  
 55  
 60  
 65

ggccaccaccggcgtgccctgcgcccgctgctggacgtggtgaccgaggccggccgcgactggctgctgctgggcgaggtgc  
ccggccaggacctgctgtctctccacctggccccgcgagaagggtgccatcatggccgacgccatgcgccgctgcacaccc  
tggaccccgccacctgccccctgaccaccagggcaagcaccgcacgcagcgccccgcacccgcacatggaggccggcctggg  
gaccaggacgacctggacgaggagcaccaggcctggccccgcgagctgttcgcccgcctgaaggccgcacatgccgcag  
gcgaggacctgggtggtgacccacggcgacgcctgctgcccaacatcatggtggagaacggcgccttctcggcttcacgactg  
cggccgctgggctggccgaccgctaccaggacatgccttggccacccgcgacatgcggaggagctgggcggcgagtggtg  
ggcaccgcttctggtgctgtacggcagtcggccccgactccagcgatgccttctaccgcctgtggacgagttctcTG  
Acaattggcagcagcagctcggatagatcgcacacatctggacgctggctgctgtgatggactgttccgccacacttgccttga  
cctgtgaataccctgccgctttatcaaacagcctcagtgctgttgcattgtgtacgcgcttttgcgagttgctagctccttgcattt  
ggcaataccacccccagcacccttccctcgtttcatatcgcttgcaccccaaccgcaacttatctacgctgctcctgctacccctcagcg  
ctgctcctgctcctgctcactgccccctgcacagccttgggttgggctccgctgattctcctggactgcaacctglaaacagcactg  
caatgctgatgcacgggaagtagtggtggaacacaaatggaggatccCGCGTCTCGAACAGAGCGCGCA  
GAGGAACGCTGAAGGTCTCGCCTCTGTCGCACCTCAGCGCGGCATACACCACAA  
TAACCACCTGACGAATGCGCTTGGTTCTTCGTCCATTAGCGAAGCGTCCGGTTCA  
CACACGTGCCACGTTGGCGAGGTGGCAGGTGACAATGATCGGTGGAGCTGATGG  
TCGAAACGTTACAGCCTAGGGATATCgaattcggccgacaggacgcgcgcaaaaggctgctggtcgtg  
atgccctggccggcaggctgctgctgctgctggttagtgattccgaacccctgattttggcgcttattttggcggtggcaaacgcctggc  
ggccgcgagccggcgccggcgatgcggtgccccacggctgcgggaatccaaaggaggcaagagcgcggcggtcagttga  
agggtttacgcgaaggtaacagccgctcctgaaggtgcggtggaattggacgtgcaggctcctgctgaagtctccaccg  
cctcaccagcggacaaagcaccgggtgatcaggctcgtcatccactctaaagagctcgactacgacctactgatggccctaga  
ttcttcataaaaaacgcctgagacacttggccaggattgaaactccctgaaggggaccaccagggggcctgagttgttcctcccc  
cgtggcgagctgccagccaggctgtacctgtgatcaggctggcgggaaaataggcttcgtgtcaggtcatgggaggtgca  
ggacagctcatgaaacgccaacaatgcacaattcatgtcaagctaatcagctatttctcttcacgagctgtaattgtcccaaat  
ctggtctaccgggggtgatccttctgtacggggccttccctcaacccctaggtatgcgcgcatgcggctgcgcgcaactgcgc  
gagggccgaggggttgggacgggcccgcgaaatgcagttgcacccggatgcgtggcacctttttgcgataatttatgcaatgg  
actgctctgcaaaattctggctgtgcgcaacccctaggatcagcggcgtaggatttcgtaateattcgtctgatgggagctacc  
gactaccctaataatcagccgactgcctgacgccagcgtccacttttgcacacattccattcgtgcccgaagacatttcattgtgt  
ggaagcgteccagttacgtcaccgtttcccgacctcttactgttctgtcgacagagcggggccacaggccggctgcagcca  
ctagtATGcgatcgccggcgggcggtgatcttctgttcggcctgatcttcttcgctccggcctgatcatcaacctgttccagg  
cgctgtgcttctgctgatccgccccctgtccaagaacgcctaccgccgcacaaacgcgtgttcgaggagctgctgctgtccgagc  
tgtgtgctgttcgactggtggggggcggaagctgaagctgttaccgaccccgagacgttccgctgatgggaaggagca  
cgccctgggtcatcatcaaccacatgaccgagctggaactggatgggtgggtggtggtggccagcacttcggctgctgggtcc  
atcatctccgtgccaaagaagtcacgaagttcctgcccgtgctgggctgggtccatgtggttctccgagtacctgtacctggagcgt

cctgggccaaggacaagtccaccctgaagtcccacatcgagegcctgatcgactacccctgcccttctggctggatcttctgctg  
 agggcacccgcttcacgcgcacgaagctgctggcgccagcagtagcggtctctcggcctgcccgctccccgcaacgtcc  
 5 tgatccccgcacgaagggtctctctcgtgtcccacatgcgtccttctgccccgggtgtacgacgtcacggtggcgttccc  
 caagacgtccccccccccacgtgctgaacctgttcgagggccagtcacatcatgctgcacgtgcacatcaagcgccacgccatg  
 10 aaggacctgcccagtcgacgacgccgtgcggagtggtgccgcacaagttcgtcgagaaggacgccctgctggacaagc  
 acaacgcggaggacacgttctcggccaggaggtgtccactccggctcccgccagctgaagtcctgctggctgctatctctg  
 ggtcgtggtgacgacgttcggcgccctgaagttcctgcagtggtcctcctggaagggaagcggttctccgccatcggcctgggca  
 15 tctcacctgctgatgcacgtgctgacgtcctcctccaggccgagcgctccaaccccgccgaggtggccaggccaagctgaa  
 gaccggcctgtccatctccaagaaggtgacggacaaggagaaacTGAttaattaactcgaggcagcagcagctcggatagtac  
 20 gacacactctggacgctggtcgtgtaggactgttccgccacacttgctgccttgacctgtgaatatccctgccgcttttatcaaag  
 cctcagtggtttgatcttgtgtgtagcgcttttgcgagttgctagctgcttgtgctatttgcgaataccacccccagcatccccctccctcg  
 ttcatatcgcttgcatcccaaccgcaacttatctacgctgtcctgctatccctcagcgctgctcctgctcctgctcactgccccctgcaca  
 25 gccttgggttgggctccgctgtattctcctggtagtcaacctgtaaacagcactgcaatgctgatgcacgggaagtagtgggatgg  
 gaacacaaatggaaagcttgagctcagcggcgacggctcctgctaccgtacgacgttgggcacgcccatgaaagttgtataccg  
 30 agcttgttgagcgaactgcaagcgcggtcaaggatactgaactcctggattgatatcggtccaataatggatggaaaatcc  
 gaacctcgtgcaagaactgagcaaacctcgttacatggatgcacagtcgccagtcacaatgaacattgaagtgagcgaactgtt  
 cgttcggtggcagtagtactactcaagaatgagctgctgttaaaaatgcactctcgttctcgaagtgagtgagcagatgagtgctc  
 35 acgcttgcaacttcgtgccccgtgcatgcctgcgccccaaaatttgaaaaaagggatgagattattgggcaatggacgacgt  
 cgtcgtcgggagtcaggaccggcgaaaataagaggcaacacactcgcgttcttagctcttcg (SEQ ID NO:90)

Constructo transformante pSZ2300

5 **gctcttcgctaacggagggtctgtcaccaaatggaccccgctctattgcgggaaaccacggcgatggcacgtttcaaaacttgat**  
**gaaatacaatattcagtatgtcgcgggcgggcgacggcggggagctgatgtcgcgctgggtattgettaatcgccagettcgcc**  
**cccgctcttggcgcgaggcggtgaacaagccgacgatgtgcacgagcaaatcctgacactagaagggctgactcgcccgga**  
 10 **cggtgaattacacaggettgcaaaaataccagaatttgcacgcacgctattcgcggtattttgttgacagtgaatagcgatg**  
**cggcaatggcttgtggcgtagaaggtgcgacgaaggtggtgccaccactgtgccagccagtctggcggtcccaggggccc**  
**cgatcaagagccaggacatccaaactacccacagcatcaacgccccggcctatactegaacccccacttgcacttgcaatggt**  
 15 **atgggaaccaeggggcagtcttgtgtgggtcgcgccctatcgcggtcgggcgaagacgggaaggtacc****ctttcttcgctatgac**  
**acttcagcaaaaggtagggcgggctgcgagacggcttcccggcgctgcatgcaacaccgatgatgcttcgacccccgaagctcc**  
 20 **ttcggggctgcatggcgctccgatgccgctccaggcgagcgctgtttaatagccaggcccccgattgcaaagacattatagcga**  
**gctaccaaagccatattcaaacacctagatcactaccacttctacacaggccactcgagcttgtgatcgactccgctaagggggcg**  
 25 **ctcttctcttcgtttcagtcacaacccgcaaac****tctaga****atatca***ATGatcgagcaggacggcctccacgccggtccccgccg*  
*cctgggtggagcgctgttcggctacgactgggcccagcagaccatcggtgctccgacgcgcgctgttccgcctgtccgcca*  
*gggcccggcgctgttcgtgaagaccgacctgtccggcgccctgaacgagctgcaggacgagggccggccgctgtcctggct*  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50  
 55  
 60  
 65

gggcaccaccggcgtgcccgtgcgcggccgtgctggacgtggtagccgagggccggccgcgactggctgctgctgggaggtgc  
 ccggccaggacctgctgctctcccacctggccccccgcgagaagggtgccaatcatggccgacgccaatgcgccgctgcacccc  
 5 tggaccccgccacctgcccccttgaccaccaggccaagcaccgcacgcagcgccccgcacccgcacggaggccggcctggg  
 gaccaggacgacctggacgaggagcaccaggcctggccccccgcgagctgttcgcccgcctgaaggccccgcacgcccgcg  
 gcgaggacctgggtggtagccacggcgacgcctgectgcccacacatcatggtggagaacggccgcttctccggcttcacgactg  
 10 cggccgctggggcgtggccgaccgctaccaggacatgccttggccaccccgacacgcgcgaggagctggcgccgagtggtg  
 gccgaccgcttctggtgctgtacggcagtcggccccccgactcccgagcgcacgccttctaccgctgctggacgagttctcTG  
 Acaattggcagcagcagctcggaatagatcgcacacatctggacgctggctgctgtgatggactgttgcgccacacttgccttga  
 15 cctgtgaatatccctgccgcttttatcaaacagcctcagtggtgttgcctgtgtgtacgcgcttttgcgagtgctagctgctgtgctattt  
 gccaataccacccccagcacccttccctcgtttcatatgccttgcaccccaaccgcaacttatctacgctgctctgctatccctcagcg  
 20 ctgctcctgctcctgctcactgccccctgcacagccttgggttgggctccgctgtatttctctggtactgcaacctgtaaacagcactg  
 caatgctgatgcacgggaagtagtggtggatgggaacacaaatggaggatccCGCGTCTCGAACAGAGCGCGCA  
 GAGGAACGCTGAAGGTCTCGCCTCTGTCGCACCTCAGCGCGGCATACACCACAA  
 25 TAACCACCTGACGAATGCGCTTGGTTCTTCGTCCATTAGCGAAGCGTCCGGTTCA  
 CACACGTGCCACGTTGGCGAGGTGGCAGGTGACAATGATCGGTGGAGCTGATGG  
 30 TCGAAACGTTACAGCCTAGGGATATCgaattcggccgacaggacgcgcgtcaaaagggtgctggctgctgt  
 atgccccggccggcaggctgctgctgctgctggttagtgattccgcaacccctgattttggcgcttattttggcgtaggcaaacgctggc  
 35 gcccgcgagccggggccggcgatgcgggtgccccacggctgccggaatcaaggaggcaagagcggcgggcagttga  
 agggctttacgcgcaagggtacagcgcctcctgcaaggctgcgtggtggaattggacgtgcaggtcctgctgaagttcctccaccg  
 cctcaccagcggacaaagcaccgggtgatcagggtcgtgcatccactctaaagagctcgactacgacctactgatggccctaga  
 40 ttcttcatcaaaaacgctgagacacttgcacaggattgaaactccctgaagggaaccaccaggggcccctgagttgttcttcccc  
 cgtggcgagctgccagccaggctgtacctgtgacgaggctggcggggaaaataggcttcgtgtgctcaggtcatgggaggtgca  
 ggacagctcatgaaacgccaacaatgcacaattcatgtcaagetaatcagctatttcttcttcacgagctgtaattgtcccaaaat  
 45 tctggctacccgggggtgatccttctgtgacggggcccttccctcaacccctaggtatgcgcgcatgcggctgccgcgcaactcgcgc  
 gagggccgaggggttgggacggggcgtcccgaaatgcagttgcacccggatgcgtggcacctttttgcgataatttatgcaatgg  
 50 actgctctgcaaaattctggctgtgctgccaacccctaggtacagcggcgtaggatttcgtaatcattcgtcctgatggggagctacc  
 gactaccctaataatcagcccgaactgectgacgcagcgtccacttttgcacacattccattcgtgcccgaagacatttcattgtgtg  
 55 gcgaagegtccccagttacgctcactgtttcccgaccttctactgttctgtcgacagagcggggccacaggccggctgcagcc  
 etagtATGgccatcgccggcgcccggggtgacgtgccccctgtccctgctgttcttctgtgctccggcctgatcgtcaacctgggtgcag  
 gccgtgcttctgctgatccgccccctgtccaagaacacgtaccgccgcacacccgcgtggctgcggagctgctgtggttggg  
 60 gctggtgtggctgatcactggtggggcggtggaagatcaaggtcttcacggaccacgagacgttccacctgatgggcaaggga  
 gcacgccctggctcatetgcaaccacaagtccgacatcactggctgggtgggtggtgctgggcccagcgtccggctgctgggc  
 65 tccacctggcggtcatgaagaagtcccaagttctgccccctggtggtggtccatgtggttctccagtaacctgttctggagc

5 *gctcctgggccaaggacgagatcacgctgaagtcggcctgaaccgctgaaggactacccctgcccttctggctggcgctgtt*  
*cgtggaggggcacgcgttcacccgcggaagctgctggcggcgcagcagtagccgcgtcctccggcctgccgtgccccgca*  
*acgtgctgatccccgcacgaagggttcgtgtctccgtgtccacatgcgctcctcgtgcccgcatctacgacgtcacctgg*  
 10 *ccatccccaagacgtccccccccccacgtgatccgcatttcaagggccagtcctccgtgtgcacgtgcacctgaagcgcca*  
*cctgatgaaggacctgccgagtcgcagcgcgctgcgcagtggtgccgcgacatcttcgtggagaaggacgcgctgtgg*  
*acaagcacaacgcgaggacaccttctccggccaggagctgcaggagaccggccgccccatcaagtcctgctggctgctcatct*  
 15 *cctgggcccgtcctggagggtgttcggcgccgtcaagttcctgcagtggtcctccctgctgtcctcctggaagggcctggcgcttccgg*  
*catcgccctggcgctgatcacctgtgatgcacatctgacgtgttctccagtcgcgagcgtccacccccgcaaggtggccc*  
 20 *ccgcgaagcccaagaacgagggcgagtcctccaagaccgagatggagaaggagaagTGAttaattaactcgaggcagcag*  
*cagctcggatagtatcgacacactctggacgctggctgtgtgatggactgttgccgccacacttgctgccttgacctgtgaatatccctg*  
*ccgcttttatcaaacagcctcagtggtttgatcttgtgtgtacgcgcttttgcgagttgctagctgcttgtgctatttgcgaataccaccccc*  
 25 *agcatcccttccctcgtttcatatcgcttgcacccaaccgcaacttatctacgctgtcctgctatccctcagcgctgctcctgctcctgct*  
*cactgcccctcgcacagccttggtttgggctccgctgtatttctcctggtactgcaacctgtaaacccagcactgcaatgctgatgcacgg*  
 30 *gaagtagtgggatgggaacacaaatggaaagcttgagctcagcggcgacggctcctgctaccgtacgacgttgggcacgccccatg*  
*aaagtttgataaccgagcttgttgagcgaactgcaagcgcggtcaaggatacttgaactcctggattgatateggtccaataa*  
*tggatggaaaaatccgaacctcgtgcaagaactgagcaaacctcggttacatggatgcacagtcgccagtcgaatgaacattga*  
 35 *agtgagcgaactgttctgcttgggtggcagtgactactcaagaatgagctgctgttaaaaatgcactctcgttctctcaagtgagt*  
*ggcagatgagtgtcagccttgcaacttcgctgcccggtgcatgccctgcgccccaaaattgaaaaaagggatgagattattg*  
 40 *ggcaatggacgacgtcgtcgtcgggagtcaggaccggcggaataagaggcaacacactcgcgttcttagctcttcg*

(SEQ ID NO:91)

45 **[0365]** Para determinar el impacto de genes *CuPSR23 LPAAT2* y *LPAAT3* sobre la acumulación de ácido graso de cadena media, los constructos anteriores que contienen genes optimizados por codón *CuPSR23 LPAAT2* o *LPAAT3* conducidos por promotor UTEX 1453 *AMT3* se transformaron en la cepa B.

50 **[0366]** Los transformantes primarios fueron purificados clonalmente y cultivados bajo condiciones de producción de lípidos estándar a pH 7,0 (todas las cepas requieren crecimiento a un pH de 7,0 para permitir la expresión máxima de gen *CuPSR23 LPAAT2* o *LPAAT3* impulsado por el promotor *AMT3* regulado por pH). Los perfiles resultantes de un conjunto de clones representativos que surgen de estas transformaciones se muestran en la Tabla 34, a continuación. D1520 representa clones de la cepa B con *CuPSR23 LPAAT2* y D1521 representa clones de la cepa B con *CuPSR23 LPAAT3*.

55

60

65



Tabla 34. Perfiles de ácidos grasos de la cepa B y líneas transgénicas representativas transformadas con ADN pSZ2299 y pSZ2300.

Muestra ID	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
Cepa B	4,83	28,54	15,64	12,64	1,3	27,99	7,75
Muestra ID	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
D1520-A	8,59	35,09	16,55	11,96	1,69	19,49	5,59
D1520-B	8,13	33,93	16,46	12,44	1,57	20,66	5,96
D1520-C	7,6	33,1	16,21	12,65	1,5	21,41	6,48
D1520-D	7,35	32,54	16,03	12,79	1,67	22,16	6,41
D1520-E	7,28	32,21	16,2	12,99	1,73	22,39	6,28
Muestra ID	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
D1521-A	6,14	31,5	15,98	12,96	1,96	22,52	8
D1521-B	6,17	31,38	15,98	12,87	2,08	22,54	7,92
D1521-C	5,99	31,31	15,75	12,79	2,23	22,45	8,36
D1521-D	5,95	31,05	15,71	12,84	2,48	22,69	8,32
D1521-E	5,91	30,58	15,85	13,22	1,97	23,55	7,84

[0367] Las cepas transgénicas *CuPSR23 LPAAT2* (D1520A-E) muestran un incremento significativo en la acumulación de C10: 0, C12: 0 y C14: 0 ácidos grasos con una disminución concomitante en C18: 1 y C18: 2. Las cepas transgénicas *CuPSR23 LPAAT3* (D1521A-E) muestran un incremento significativo en la acumulación de C10: 0, C12: 0 y C14: 0 ácidos grasos con una disminución concomitante en C18: 1. La expresión de *CuPSR23 LPAAT* en estas líneas transgénicas que parece ser directamente responsable de la mayor acumulación de ácidos grasos de cadena media en general, y especialmente lauratos. Mientras que las líneas transgénicas muestran un cambio a partir de ácidos grasos de cadena más larga (C16: 0 y superiores) a los ácidos grasos de cadena media, el cambio está dirigido predominantemente a C10: 0 y C12: 0 ácidos grasos con un ligero efecto sobre C14: 0 ácidos grasos. Los datos presentados muestran también que la co-expresión de genes *LPAAT2* y *LPAAT3* de *Cuphea* PSR23 y *FATB2* desde *C. wrightii* (Expresado en la cepa Cepa B) tienen un efecto aditivo sobre la acumulación de C12: 0 ácidos grasos.

[0368] Nuestros resultados sugieren que las enzimas LPAAT de *Cuphea* PSR23 están activas en las cepas de algas derivadas de UTEX 1435. Estos resultados también demuestran que la enzima funciona en conjunción con la enzima de tioesterasa de acil-ACP FatB2 heteróloga expresada en la cepa B, que se deriva de *Cuphea wrightii*.

#### EJEMPLO 44: ALTERACIÓN DE LOS NIVELES DE ÁCIDOS GRASOS EN CEPA UTEX1435 POR LA EXPRESIÓN DE *CUPHEA* PSR23 LPAATX EN COMBINACIÓN CON *CUPHEA* WRIGHTII FATB2

[0369] Aquí se demuestra el efecto de la expresión de una aciltransferasa 1-acil-sn-glicerol-3-fosfato (*LPAAT*) en una cepa transgénica descrita previamente *P. moriformis* (UTEX 1435), Cepa B. Como se describe anteriormente, la cepa B es una cepa transgénica que expresa la tioesterasa acil ACP (*FATB2*) desde *Cuphea wrightii*, que se acumula C12: 0 ácidos grasos entre el 40 al 49%. Además del Ejemplo 43, un tercer *CuPSR23 LPAAT*, *LPAATx*, fue identificado por análisis de una combinación de secuencias genómicas *CuPSR23* y secuencias transcriptómicas derivadas de ARN de semillas. La expresión de un LPAAT específico de cadena media debe por lo tanto aumentar el porcentaje de las TAG que tienen un ácido cáprico (C10: 0 ácido graso), ácido láurico (C12: 0 de ácidos grasos), o ácido mirisítico (C14: 0 de ácidos grasos) en la posición *sn-2*, y por consiguiente deben elevar los niveles globales de estos ácidos grasos. En el Ejemplo 43, se demostró que *LPAAT2* y *LPAAT3* aumentaban caprato, laurato, miristato y la acumulación en la cepa B. *LPAATx* se introdujo en la cepa B para determinar su efecto sobre los niveles de ácidos grasos en esta cepa. El gen *LPAATx* se optimizó por codones para reflejar uso de codones UTEX 1435. Transformaciones, cultivo celular, producción de lípidos y análisis de ácidos grasos fueron llevados a cabo como se describió previamente.

[0370] La acumulación disminuida de caprato, laurato y miristato y aumento de la acumulación de palmitato y estearato en la cepa Cepa B por la expresión de *Cuphea* PSR23 1-acil-sn-aciltransferasa de glicerol-3-fosfato (*LPAATx*) [PSZ2575]: En este ejemplo, las cepas transgénicas se generan a través de transformación de la cepa B con el constructo que codifica pSZ2575 *CuPSR23 LPAATx*. Se seleccionaron las cepas transgénicas para la resistencia al antibiótico G418. Constructo pSZ2575 se puede escribir como pLOOP5':CrTUB2:NeoR:CvNR::PmAMT3:CvPSR23LPAATx:CvNR::pLOOP3'. La secuencia del ADN transformante se proporciona a continuación (pSZ2575). Los sitios de restricción relevantes en el constructo de 5'-3', BspQ1, KpnI, XbaI, MfeI, BamHI, EcoRI, SpeI, XhoI, SacI, BspQ1, respectivamente, se indican en minúsculas, negrita y subrayados. sitios BspQ1 delimitan el 5' y 3' del ADN transformante, secuencias de minúsculas en negrita en los extremos 5' y 3' de la construcción representan ADN genómico de UTEX 1435 que se dirigen a la integración al locus pLoop mediante

recombinación homóloga. Procediendo en la dirección 5' a 3', el casete de selección tiene *C. reinhardtii*  $\beta$ -tubulina promotor de la expresión del gen de conducción *NeoR* (que confiere resistencia a G418) y *Chlorella vulgaris* nitrato reductasa (*NR*) de genes 3' UTR. El promotor se indica mediante texto en minúsculas, en caja. El iniciador ATG y el terminador TGA para *NeoR* se indican mediante cursiva y en mayúsculas, mientras que la región de codificación está indicada con minúsculas en letra cursiva. La 3' UTR se indica mediante texto en minúsculas subrayadas. La región espaciadora entre las dos casetes se indica mediante texto en mayúsculas. El segundo casete que contiene el gen *LPAATx* optimizado por codón (pSZ2575) a partir de *Cuphea* PSR23 es impulsado por *Prototheca moriformis* promotor endógeno *AMT3*, y tiene *Chlorella vulgaris* nitrato reductasa (*NR*) de genes 3' UTR. En este casete, el promotor *AMT3* se indica mediante texto en minúsculas, en caja. El iniciador ATG y el terminador TGA para genes *CuPSR23 LPAATx* se indican en cursiva y en mayúsculas, mientras que la región de codificación está indicada en minúsculas en cursiva. 3' UTR se indica mediante texto en minúsculas subrayadas. La construcción final se secuenció para asegurar marco de lectura correcto y secuencias de direccionamiento.

[0371] Constructo transformante pSZ2575

gctcttcgctaacggaggtctgtcaccaatggaccccgctctattgcgggaaaccacggcgatggcacgtttcaaaacttgat  
gaaatacaaatattcagtatgtcggggcgggacggcggggagctgatgtcgcgctgggtattgettaategccagettegcc  
5 cccgtcttggcgcgaggcggtgaacaagccgacccgatgtgcacgagcaaatcctgacactagaaggggtgactcgccccgca  
eggctgaattacaggettgaaaaaataccagaatttgcacgcaccgtattcgcggtattttgttgacagtgaatagcgatg  
10 eggcaatggcttgtggcgtagaaggtgcgacgaaggtggtgccaccactgtgccagccagtcctggcggtcccaggggccc  
cgatcaagagccaggacatccaaactacccacagcatcaacgccccggcctatactgaaaccccaacttgcactctgcaatggt  
atgggaaccacggggcagtccttgtgtgggtcgcgccctatcgcggtcggggaagaccgggaaggtaccctttcttcgctatgac  
15 acttcagcaaaaggtagggcgggctgcgagacggcttcccggcgctgcatgcaacaccgatgatgcttcgacccccgaagctcc  
ttcggggctgcatggcgctccgatgccgctccaggcgagcgctgtttaaatagccaggccccgattgcaaagacattatagcga  
20 gctaccaaagccatattcaaacacctagatcactaccactctacacaggccactcgagcttgcactccgctaagggggcg  
ctcttctcttcgtttcagtcacaacccgcaaactctagaatatcaATGatcgagcaggacggcctccacggcgctccccggcg  
25 cctgggtggagcgctgttcggctacgactgggcccagcagaccatcggtgctccgacggcgctgttcgcctgtccgccc  
ggcgccccgtgctgttcgtgaagaccgacctgtccggcgccctgaacgagctgcaggacgaggccccgcctgtcctggct  
ggccaccaccggcgctgcctgcggcgctgtggacgtggtgaccgagggcgccgcgactggctgctgtggcgaggtgc  
30 ccggccaggacctgtgtctccacctggcccccgcgagaaggtgtccatcatggccgacgccatgcgcccgtgcacaccc  
tggaccccgcacctgccccctcgaccaccaggccaagcaccgcategagcgccccgaccccgatggaggccggcctggtg  
gaccaggacgacctggacgaggagcaccaggcgctggccccgcgagctgttcgcccgctgaaggccccgatgcccgacg  
35 gcgaggacctggtggtgacccacggcgacgcctgcctgcccacatcatggtggagaacggcgcttctcggcttcacgactg  
cggcgcgctggcggtggcgaccgctaccaggacategccctggccacccgcgacatcgccgaggagctggggcgagtggtg  
40 gccgaccgcttctggtgctgtacggcatcgccgccccgactcccagcgcatcgcttctaccgctgctggacgagttcttcTG  
Acaattggcagcagcagctcgatagtatcgacacactctggacgctggtgctgtgatggactgttgcggccacacttgccttga  
45 cctgtgaatatccctgcgcgttttatcaaacagcctcagtggtttgatcttgtgtacgcgcttttgcgagttgctagctgcttgtctattt  
gcgaataaccacccccagcatcccttccctcgtttcatatcgcttgcacccaaccgcaacttatctacgctgtcctgctatccctcagcg  
ctgctcctgctcctgctcactgcccctgcacagccttggttgggctcgcgctgtattctcctggtactgcaacctgtaaacgcactg  
50 caatgctgatgcacgggaagtagtgggatgggaacacaaatggaggatccCGCGTCTCGAACAGAGCGCGCA  
GAGGAACGCTGAAGGTCTCGCCTCTGTGCGACCTCAGCGCGGCATACACCACAA  
55 TAACCACCTGACGAATGCGCTTGGTTCTTCGTCCATTAGCGAAGCGTCCGGTTCA  
CACACGTGCCACGTTGGCGAGGTGGCAGGTGACAATGATCGGTGGAGCTGATGG  
TCGAAACGTTACAGCCTAGGGATATCgaattcggccgacaggacgcgctcaaaaggtgctggctgctgt  
60 atgccttggcgcgaggtcggtgctgctggttagtgattccgaacccctgattttggcgcttattttggcggtggcaaacgctggc

5 gcccgcgagccgggcccggcgatgcggtgccccacggctgccggaatccaagggaggcaagagcgccgggtcagttga  
agggctttacgcgcaaggtacagccgctctgcaaggctgcgtgggtggaattggacgtgcaggctctgctgaagttcctccaccg  
cctcaccagcggacaagcaccgggtgtatcaggctcgtgtcaccactctaaagagctcgactacgacctactgatggccctaga  
ttctcatcaaaaacgcctgagacactgcccaggattgaaactcctgaagggaaccaccaggggcccctgagttgttcttcccc  
 10 cgtggcgagctgccagccaggctgtacctgtgatcagggtgcccgggaaaataggcttcgtgtcctcaggctcatgggagggtga  
ggacagctcatgaaacgccaacaatcgcaaatcatgtcaagctaactcagctatttcttctcagagctgtaattgtcccaaat  
tctggtctaccgggggtgactcttctgtgtacgggccccttctcaaccctaggtatgcgcgcgtgcggtgcgcgcgaactcgcgc  
 15 gagggccgaggggttgggacgggcccgtcccgaatgcagttgcaccggatgcgtggcacctttttgcgataatttatgcaatgg  
actgctctgcaaaattctggtctgtgcgaaccctaggatcagcggcgtaggatttcgtaatcattcgtctgatgggagctacc  
 20 gactaccctaataatcagccgactgctgtacgcgcagcgtccacttttgtgcacacattccattcgtgcccgaagacatttattgtgt  
gcgaagcgtcccagttacgtcacctgttcccgaacctcttactgttctgtgcacagagcgggcccacaggccggtcgcagcca  
 25 ctagtATGgagatccccccactgctgtgtccccctccccgcgccctcccagctgtactacaagaagaagaagcacgcc  
atctgcagaccagacccccctaccgctaccgcgtgtccccacctgtctgccccccccgcctgcgaagcagcaccctacc  
 30 ccctgcccgtgtgtgtacctccaagctgtgtgcattctcccagccccgctaccacctgggtgcgtcccacctggccgaggccggc  
gtggcctaccgccccggctacgagctgtgtggcaagatccggcggtgtgttctacgccgtgaccgcccgtggccctgtgtct  
gttcagtgcatgtgtgtgtgcaacccctcgtgtgtgtgttgacccctccccgcgaaggeccaccacaccatcgccaagctgtg  
 35 gtccatctgtccgtgtccctgttctacaagatccacatcaagggtctggagaacctgccccccccactccccgcgtgtacgt  
gtccaaccaccagtccttctggaatctacacctgtgacctggggccgcaccttcagttcatctccaagaccgagatcttctg  
taccccatcagtggtgggcatgtacatgtgggcacctccccctgaagegcctggactcccgtcccagctggacacctga  
 40 agegctgcagacctgatcaagaagggecctcgtgttcttcttcccaggggcaccgctccaaggacggcaagctgggcg  
cctcaagaaggggccttctccatcgccgccaagtccaagggtgcccgtgggtgccatcacctgatcggaaccggcaagatcat  
 45 gcccccggtccgagctgaccgtgaacccccggcacctgtcagggtgatccacaagcccatcgagggctccgacgccgagg  
ccatgtgcaacgaggeccgcgccacctctcccactccctggacgacTGAttaattaactcagaggcagcagcagctcggatagt  
atcgacacactctggacgtgctgtgtgatggactgttgcggcacacttgccttgacctgtgaatatccctgccgctttatcaa  
 50 cagcctcagtggtttgatcttgtgtgtacgcgcttttgcgagttgctagctgcttgtgtctatttgcgaataaccaccccagcaccctcc  
ctcgtttcatatcgttgcacccaaccgcaacttatctacgctgtcctgtatccctcagcgtgctcctgctcctgctcactgcccctgc  
 55 acagccttggtttgggtcgcctgtattctcgtgtactgcaacctgtaaaccagcactgcaatgctgatgcacgggaagtatgggat  
gggaacacaaatggaaagcttgagctcagcggcgacggctcctgtacctgacgacgttgggcacgcccattgaaagttgtatac  
 60 cagcttgttgagcgaactgaagegggctcaaggatactgaaactcctggattgatatcggtccaataatggatggaaaat  
ccgaacctcgtgaagaactgagcaaacctcgttacatggatgcacagtcgccagtcgaatgaacattgaagtgagcgaact  
 65 gttcgttcggtggcagtactactcaagaatgagctgtgttaaaaatgcactctcgttctcgaagtgagtggcagatgagtg  
ctcagccttgcaettegctgcccgtgtcatgcctgcgccccaaaattgaaaaaagggatgagattattgggcaatggacga

**cgtcgctcgctccgggagtcaggaccggcggaataagaggcaacacactccgcttcttagctttcg** (SEQ ID NO:92)

**[0372]** Para determinar el impacto del gen *CuPSR23 LPAATx* sobre la acumulación de ácido graso, el constructo anteriormente que contiene el gen optimizado por codón *CuPSR23 LPAATx* impulsado por el promotor UTEX 1453 *AMT3* se transformó en la cepa B.

**[0373]** Los transformantes primarios fueron purificados clonalmente y cultivados bajo condiciones bajas de nitrógeno a pH 7,0; las cepas requieren crecimiento a un pH de 7,0 para permitir la expresión máxima de genes *CuPSR23 LPAATx* y *CwFATB2* impulsados por el promotor *AMT3* regulado por pH. Los perfiles resultantes de un conjunto de clones representativos que surgen de estas transformaciones se muestran en la Tabla 35, a continuación. D1542 representa clones de la cepa B con *CuPSR23 LPAATx*.

Tabla 35. Perfiles de ácidos grasos de Cepa B y líneas transgénicas representativas transformadas con pSZ2575.

Muestra ID	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
Cepa B	4.77	28.63	15.48	12.65	1.28	28.20	7.57
Muestra ID	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
D1542-A	1.19	13.25	10.48	21.34	4.49	32.07	14.78
D1542-B	1.15	14.01	10.62	20.61	3.99	32.12	15.24
D1542-C	1.21	13.69	10.83	20.40	3.59	33.54	15.05
D1542-D	1.56	16.83	11.51	18.44	2.94	33.97	12.74
D1542-E	2.15	18.58	11.94	18.22	3.17	32.63	11.62

**[0374]** Las cepas transgénicas *CuPSR23 LPAATx* (D1542A-E) muestran una disminución significativa en la acumulación de C10: 0, C12: 0 y C14: 0 ácidos grasos con respecto a la matriz, Cepa B, con un aumento concomitante en C16: 0, C18: 0, C18: 1 y C18: 2. La expresión de gen *CuPSR23 LPAATx* en estas líneas transgénicas parece ser directamente responsable de la acumulación reducida de ácidos grasos de cadena media (C10-C14) y el aumento de la acumulación de C16: 0 y C18 ácidos grasos, con el aumento más pronunciado observado en palmitatos (C16: 0). Los datos presentados muestran también que a pesar de la expresión específica de *FATB2* de cadena media desde *C. wrightii* (presente en la cepa B), la expresión de *CuPSR23 LPAATx* parece favorecer la incorporación de ácidos grasos de cadena más larga en las TAG.

**[0375]** Nuestros resultados sugieren que la enzima *LPAATx* a partir de *Cuphea* PSR23 está activa en las cepas de algas derivadas de UTEX 1435. Contrariamente a *Cuphea* PSR23 *LPAAT2* y *LPAAT3*, que aumentan los niveles de ácidos grasos de cadena media, *CuPSR23 LPAATx* conduce a un aumento de niveles C16: 0 y C18: 0. Estos resultados demuestran que los diferentes LPAATs se derivan de *CuPSR23(LPAAT2, LPAAT3, y LPAATx)* Presentan diferentes especificidades de ácidos grasos en la cepa B como se juzga por sus efectos sobre los niveles de ácidos grasos en general.

#### EJEMPLO 45: REDUCCIÓN DE LONGITUD DE CADENA DE PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS COMO RESULTADO DE SOBREENPRESIÓN DE TIOESTERASA DE ACIL-ACP FATA DE MICROALGAS ENDÓGENA

**[0376]** Aquí, se demuestra que la sobreexpresión de las tioesterasas endógenas FATA1 *Prototheca moriformis* en UTEX1435 resulta en una clara disminución de triglicéridos celulares C18: 0 y C18: 1 cadenas de acilo con un aumento en C16: 0, C14: 0.

**[0377]** Construcciones utilizadas para la sobre expresión del gen FATA1 *P. moriformis* (pSZ2422, pSZ2421):

Para sobreexpresar la PmFATA1 en *P. moriformis* CEPA J, un gen PmFATA1 de codones optimizados se ha transformado en cepa J con el gen de la invertasa. El gen de invertasa *Saccharomyces cerevisiae* fue utilizado como el marcador seleccionable para conferir la capacidad de crecer en medios de sacarosa. El constructo pSZ2422 que se ha expresado en la cepa J puede escribirse como: 6SA::CrTUB2-ScSUC2-CvNR3':PmAMT3-Pm FATA1 (opt) - CvNR3':6SB, y constructo pSZ2421 se puede escribir como 6SA::CrTUB2-ScSUC2-CvNR3':PmAMT3-S106SAD TP-Pm FATA1 (opt)-CvNR3':6SB.

**[0378]** La secuencia del ADN transformante se proporciona a continuación. Sitios de restricción relevantes en el constructo pSZ2422 se indican en minúsculas, en negrita y subrayado y son 5'-3' BspQ 1, Kpn I, Xba I, MfeI I, BamH I, EcoR I, Spe I, Asc I, Cla I, Sac I, BspQ I, respectivamente. sitios BspQI delimitan el 5' y 3' del ADN transformante, secuencias minúsculas en negrita representan ADN genómico de CEPA J que permiten integración dirigida en el locus 6s a través de recombinación homóloga. Procediendo en la dirección 5' a 3', la *C. reinhardtii* promotor  $\beta$ -tubulina de conducir la expresión del gen de levadura de sacarosa invertasa (que confiere la capacidad de la cepa J para metabolizar la sacarosa) se indica mediante texto en caja. El iniciador ATG y el terminador TGA para la invertasa se indican con mayúsculas, negrita y cursiva, mientras que la región de codificación está indicada en minúsculas en cursiva. El nitrato reductasa *Chlorella vulgaris* 3' UTR se indica mediante texto subrayado de letras minúsculas seguido por un promotor amt03 endógeno de *P. moriformis*, indicado por texto cursiva en caja. Los codones de ATG iniciador y terminador TGA de la PmFATA1 se indican con mayúsculas, negrita y cursiva, mientras que el resto del gen se indica mediante negrita y cursiva. El *C. vulgaris* nitrato reductasa 3' UTR se indica de nuevo por texto subrayado en minúsculas seguido por la región genómica de cepa J 6S indicada mediante texto en negrita en minúsculas.

**[0379]** Sitios de restricción relevantes en el constructo pSZ2421 son los mismos que pSZ2422. En pSZ2421, la PmFATA1 se fusiona al péptido de tránsito de desaturasa S106 estearoil-ACP *Chlorella protothecoides* y el péptido de tránsito está situado entre el iniciador ATG de PmFATA1 y el sitio Asc I.

**[0380]** Secuencia de nucleótidos del ADN transformante contenida en pSZ2422

gctcttcgcegcgcgaactcctgctcgagcgcgcccgcgctgcegcgcgcagegccttggccttttcgcegcgctcgtgcgcgtc  
 gctgatgtccatcaccagggtccatgaggtctgccttgcgcggctgagccactgcttcgcccggcgccaagaggagcatga  
 5 gggaggactcctggccagggtcctgaagtggcgcgctctgggagcgggccagcatcatctggtctgcgcaccgagge  
 cgctccaactggctctccagcagcgcgagtcgcegcgcgacctggcagaggaagacaggtgaggggggtatgaattgtaca  
 10 gaacaaccacgagccttgtctaggcagaatccctaccagtcattggtttacctggatgacggcctgcgaacagctgtccagcg  
 accctcgtgcgcgcgttctccgcacgcttcttcagcaccgtgatggcgcgagccagcgcgacgctggcgctgcgctt  
 cgccgatctgaggacagtcgggggaactctgatcagttaaacccttgcgcgttagtgttgcacatcctttgcagaccggtgag  
 15 agecgaacttgttgcgcacccccacaccactctcccagaccaattctgtacactttttggcgaaggcatcgccctcgcc  
 tgcagagaggacagcagtgcccagcgctgggggttggcggatgcacgctcaggtacccttcttgcgctatgacactccagca  
 20 aaaggtagggcgggctgcgagacggcttcccgcgctgcatgcaacaccgatgatgcttcgacccccgaagctccttcggggctg  
 catggcgctccgatgcgctccaggcgagcgctgtttaaatagcaggcccccgattgcaagacattatagcgagctaccaaaag  
 ccatattcaaacacctagatcactaccacttctacacaggccactcgagcttgtgatcgactccgctaagggggcgctcttctcttc  
 25 gtttcagtcacaaccgcaaactctagaatatca**ATG**ctgctgcaggccttctgttctgctggccggttcgcccgaagatcag  
 cgctccatgacgaacgagacgtccgaccgccccctgggtgcacttcacccccaaagggctggatgaacgacccccaacggcc  
 30 tgtgtacgacgagaaggacgccaagtggcacctgtacttccagtacaacccgaacgacaccgtctgggggacgcccctgttctg  
 gggccacgcccagtcgacgacctgaccaactgggaggaccagcccatcgccatcgccccgaagegcaacgactccggcgc  
 35 ctctccggctccatggtggtggactacaacaacacctccggttcttcaacgacacccatcgacccgcgcagcgctgctggcca  
 tctggacctacaacacccccggagtccgaggagcagtacatctctacagcctggacggcggtacaccttaccgagtaccaga  
 agaaccccgctgctggccgccaactccaccagttccgcgacccgaaggtcttctgtgtacgagccctcccagaagtggatcatgac  
 40 cgcgccgaagtcccaggactacaagatcgagatctactctccgacgacctgaagtctggaagctggagtccgcgttcgcaa  
 cgagggcttctcggtaccagtacgagtgcgccggcctgatcgaggtccccaccgagcaggacccccageaagtcctactgggt  
 45 gatgtcatctccatcaaccccggcgccccggcgggctccttcaaccagtacttctgcgcagcttcaacggcaccacttcg  
 aggccttcgacaaccagtcgccggtgggacttcggcaaggactactacgccctgcagaccttcttcaacacggacccgacct  
 cgggagcgccctgggcatcgctggcctccaactgggagtactccgcttctgcccaccaacccctggcgctctccatgtccc  
 50 tctgctgcgaagttctccctcaacaccgagtaccaggccaacccggagacggagctgatcaacctgaaggccgagccgatcctg

55

60

65

[illegible]



ctectctgggtgatgatcaacatccgcacccgcccctgcccagctggtgcgctgaagtccgcttcttgcgc  
 5 gcgagccccccgctggccctgcccccgccgtgacccgcgccaagtgcaccaacatgccacccccgccccctgcgcggc  
 caccgccaggtggcccgccgcacccgacatggacatgaacggccacgtgaacaacgtggcctacctggcctggtgcctggaggc  
 cgtgcccagacacgtgttctccgactaccacctgtaccagatggagatcgacttcaaggccgagtgccacgcccggcgacgtgac  
 10 tectcccaggccgagcagatccccccaggaggccctgacccacaacggcgccggccgaacccctctgcttctgtcactec  
 atctgcgcgcccagaccgagctggtgcgcgcccgcaccacctggtccgccccatcgacgccccgcccgaagccccca  
 ggctcccacatggactacaaggaccacgacggcgactacaaggaccacgacatcgactacaaggacgacgacgacaagT  
 15 GAatcgatagatctcttaaggcagcagcagctcgatagatcgacacactctggacgctggtcgtgtgatggactgttgcgcccac  
 acttgctgccttgacctgtgaatatccctgcccgttttatcaaacagccctcagtgtgtttgatcttgtgtgtacgcgcttttgcgagttgtag  
 20 ctgcttgtgctatttgcgaataaccacccccagcatcccttccctcgtttcatatcgcttgcacccaaccgcaacttatctacgctgtcctg  
 ctatccctcagcgtgctcctgctcctgctcactgcccctgcacagccctggttgggctccgctgtattctcctggtactgcaacctgt  
 25 aaaccagcactgcaatgctgatgcacgggaagttagtgggatgggaacacaaatggaaagcttaattaagagactcttgtttccagaa  
 ggagttgtccttgagcctttcattctcagcctcgataacctccaaagccgctctaattgtggagggggttcgaatttaaaagctt  
 ggaatgttgggtcgtgcttggaaacaagcccagacttgttgcactgggaaaaggaccatcagctccaaaaaacttgcgc  
 30 tcaaaccgctacctctgcttgcgcaatctgcctgttgaaatcgccaccacattcatattgtgacgcttgagcagctgtgaat  
 tgctcagaatgtggaatcatctgccccctgtgcgagccatgccaggcatgtcggggcgaggacacccgccactcgtacag  
 35 cagaccattatgtacctcacaatagttcataacagtgacatatttctcgaagctcccaacgagcacctccatgctctgagtg  
 gccacccccggccctggtgcttgcggagggcaggtcaaccggcatggggctaccgaaatccccgacccgatcccaccacc  
 ccgcatgggaagaatctctccccgggatgtgggcccaccaccagcacaacctgtgcccaggcgagcgtcaaacataacc  
 40 acacaaatatccttggcatcgccctgaattcttctgccgctctgtacccggtgcttctgtccgaagcaggggttgcaggga  
 tgcctccgagtcgcgaacccctgtgcgctggcggggcttgcgagcttgaagagc (SEQ ID NO:93)

45 **[0381]** Para determinar el impacto sobre los perfiles de ácidos grasos cuando el gen endógeno FATA1 ha sido  
 sobreexpresado en la cepa J, tanto el P. moriformis FATA1 con péptido de tránsito nativo y PmFATA1 fusionado a un  
 péptido de tránsito SAD Chlorella protothecoides fueron dirigidos por el promotor amt03 y los resultantes plásmidos  
 se transformaron independientemente en la cepa J.

50 **[0382]** Los transformantes primarios fueron purificados clonalmente y cultivados bajo condiciones de producción de  
 lípidos de baja atmósfera de nitrógeno a pH 7,0 (todos los plásmidos requieren crecimiento a un pH de 7,0 para permitir  
 la expresión de genes de PmFATA1 máxima dirigida por el promotor amt03 pH regulado). Los perfiles resultantes de  
 clones representativos derivados de transformaciones con pSZ2422 y pSZ2421 en la cepa J se muestran en las tablas  
 55 siguientes.

60 **[0383]** En la Tabla 36, a continuación, el impacto de sobreexpresar PmFATA1 nativa es una clara disminución de C18:  
 1 longitudes de cadena con un aumento en C16: 0, C14: 0, y posiblemente en C18: 0. Teniendo en cuenta la  
 localización de la proteína de procesamiento, también ensayamos la PmFATA1 fusionada a un péptido de tránsito de  
 desaturasa de estearoil-ACP Chlorella protothecoides. Similarmente a los resultados que observamos en el constructo  
 PmFATA1 amt03-natal, los niveles C16: 0 y C14: 0 son significativamente más altos que la cepa parental CEPa J.

Tabla 36. perfiles de ácidos grasos en la Cepa J y líneas transgénicas derivadas transformadas con ADN pSZ2422.

	Muestra ID	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
5	pH 7; Cepa J; T374; D1377-7 96pocillo	7,69	55,0	4,92	24,94	5,19
	pH 7; Cepa J; T374; D1377-13 96pocillo	6,39	54,11	5,85	25,91	5,76
	pH 7; Cepa J; T374; D1377-14 96pocillo	6,57	53,55	4,68	27,18	5,74
	pH 7; Cepa J; T374; D1377-16 96pocillo	5,29	49,93	4,24	30,76	7,27
10	pH 7; Cepa J; T374; D1377-9 96pocillo	4,76	49,10	4,75	32,36	6,77
	pH 7; Cepa J; T374; D1377-19 96pocillo	4,28	46,06	5,14	35,87	6,69
	Ctrl-pH7; Cepa J	1,42	27,63	3,31	57,20	8,00

Tabla 37. perfiles de ácidos grasos en la CEPA J y líneas transgénicas derivadas transformadas con ADN pSZ2421.

	Muestra ID	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
20	pH 7; CEPA J; T374; D1376-21 96pocillo	6,76	57,06	4,12	23,66	6,07
	pH 7; CEPA J; T374; D1376-22 96pocillo	6,56	54,62	5,44	25,69	5,64
	pH 7; CEPA J; T374; D1376-23 96pocillo	4,54	48,38	4,27	33,23	7,24
	pH 7; CEPA J; T374; D1376-19 96pocillo	4,48	47,66	4,60	34,28	6,91
	pH 7; CEPA J; T374; D1376-20 96pocillo	4,53	47,30	4,67	34,51	6,80
25	pH 7; CEPA J; T374; D1376-17 96pocillo	3,56	42,70	4,03	39,85	7,52
	Ctrl-pH7; CEPA J	1,42	27,63	3,31	57,20	8,00

[0384] Por lo tanto, concluimos que niveles de ácido mirístico y láurico en el perfil de ácidos grasos de una célula de microalgas se pueden incrementar por la sobreexpresión de una tioesterasa acil-ACP que prefiere C18.

#### EJEMPLO 46: ACEITES NATURALES ADECUADOS PARA USO COMO ACORTAMIENTOS DE ENTRADA

[0385] Las propiedades nutricionales y funcionales de grasas comestibles han sido tradicionalmente asociadas con las composiciones químicas específicas y las condiciones de cristalización. Cambiar de una fuente de aceite a otra suele ser una tarea difícil, ya que tanto el comportamiento de fusión y la estructura de los cambios en la grasa de forma espectacular, dando lugar a cambios adversos en la funcionalidad. En la historia reciente, podemos recordar el periodo de dolor cuando las grasas parcialmente hidrogenadas fueron sustituidas por fracciones de aceite de palma y aceite de palma. Examinamos cómo la tensión de fluencia, módulo de elasticidad, el polimorfismo, microestructura y perfil de fusión de dos grasas con muy diferentes composiciones químicas pueden ser emparejadas. Aceite A fue producido a partir de células que expresan *Prototheca moriformis* de invertasa exógena y *Ulmus americana* de tioesterasa de acil-ACP con una secuencia *Chlorella protothecoides* plástido. Aceite B se produce a partir de células que expresan *Prototheca moriformis* de invertasa exógena y *Cuphea hookeriana* de tioesterasa de acil-ACP. Aceite A contenía mayor que 62% (p/p) ácidos grasos de cadena media, o MCT (C8: 0-C14: 0), 23% (C16: 0 + C18: 0) y 9% de C18: 1, mientras que el aceite B contenía menos de 2% C8: 0-C14: 0, 54% (C16: 0 + C18: 0) y 29% de C18: 1. Aceite A era una grasa rica en triglicéridos de cadena media, mientras que el aceite B parecía aceite de palma. Ambos aceites tenían un contenido de grasa sólida de ~45% a 20°C, y SFC muy similar frente a los perfiles de temperatura. Perfiles de fusión DSC (calorimetría de barrido dinámico) mostraron dos picos principales centrados alrededor r~12-13°C y ~28-35°C. Tanto las grasas estaban en la forma polimórfica forma beta-prima (como se determina por difracción de rayos X) y se muestra la morfología de los cristallitos asimétricos, alargados con rasgos característicos. Las tensiones y módulos de almacenamiento de rendimiento (G') de aceite A y B de aceite eran 520-550 Pa, y 7x106Pa-1,8x107Pa, respectivamente. Una tensión de fluencia en esta región sugiere una plasticidad satisfactoria, combinándose con un alto módulo de almacenamiento para un acortamiento ideal de entrada. Así, es posible alterar la composición química de un aceite de alimentos mientras que conserva su funcionalidad de laminación.

[0386] Otras enzimas adecuadas para su uso con las células y los métodos de cualquiera de las realizaciones anteriores de la invención incluyen las que tienen una identidad de aminoácidos de al menos 70% con una de las proteínas enumeradas en la descripción anterior y que presentan la correspondiente actividad enzimática deseada. En realizaciones adicionales, la actividad enzimática está presente en una secuencia que tiene al menos aproximadamente 75%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, o identidad de al menos aproximadamente 99% con una de las secuencias de ácido nucleico descritas anteriormente.

#### EJEMPLO 47: FRACCIONAMIENTO PARA ELIMINAR TRISATURADOS A PARTIR DE UN ACEITE MICROBIANO QUE ES UNA MANTECA DE CACAO MIMÉTICA

[0387] Un aceite blanqueado y desodorizado refinado se obtuvo de Cepa K4 (véase el Ejemplo 35). El aceite se calentó a 70°C y se enfrió a 0,5°C por minuto a 36°C y se mantuvo a 36°C durante 1 hora. a continuación, una muestra de aproximadamente 2,5 ml se centrifugó a 36°C durante 1 hora a 4300. Un sobrenadante líquido se recuperó y se analizó utilizando lipasa y espectrometría de masas. Se encontró que la muestra fue empobrecida en triestearina (SSS), SSP, y PPS. Se encontró que los triacilglicérols de la muestra eran muy similares a los de la manteca de cacao y el sobrenadante líquido fue incluso más cercano al de la manteca de cacao en términos de bajas cantidades de trisaturados.

**Tabla 38. Perfil TAG de aceite de la cepa K4 antes y después de la fraccionación en comparación con manteca de cacao.**

TAG	Aceite K4	Fraccionación de capa superior	
		(líquido)	Manteca de cacao
OOL (+?)	0.12	0.12	0.00
POL	0.23	0.31	0.33
PLP	2.41	3.38	1.58
MOP	0.93	1.25	0.00
PPM (+			
MMS)	0.42	0.29	0.00
OOO	0.23	0.34	0.00
SOL	0.36	0.47	0.32
OOP	0.95	1.42	2.44
PLS	5.66	7.90	2.90
POP (+			
MSO)	11.80	15.20	17.93
PPP + MPS	2.22	1.07	0.36
OOS	1.19	1.68	3.02
SLS (+ PLA)	3.96	5.11	1.77
POS	27.22	32.80	40.25
PPS (+ SSM)	6.47	1.52	0.49
MaOO	0.00	0.00	0.36
SLA	0.31	0.34	0.00
SOS (+ POA)	17.84	22.50	24.93
SSP (+ PPA)	9.24	0.96	0.63
SOA (+ POB)	1.39	1.68	1.51
SSS (+ PSA)	5.25	0.23	0.33
SOB + LgOP	0.38	0.44	0.27
SSA	0.41	0.00	0.00
SOLg	0.41	0.00	0.00
PSLg + ASB	0.26	0.00	0.00
SOHx	0.12	0.51	0.00
SSLg	0.21	0.14	0.15
Área SUM %	100.00	99.67	99.57

**EJEMPLO 48: PRODUCCIÓN DE ACEITE DE TRIGLICÉRIDO DE ALTO ESTEARATO EN UNA CÉLULA OLEAGINOSA POR LA SOBREEXPRESIÓN DE KASII, KNOCKOUT DE UN ALELO SAD Y LA REPRESIÓN DE UN SEGUNDO ALELO SAD**

**[0388]** La alga oleaginosa, no fotosintética, *Protetheca moriformis*, almacena grandes cantidades de aceite de triacilglicérido bajo condiciones donde el suministro de carbono nutricional está en exceso, pero la división celular se inhibe debido a la limitación de otros nutrientes esenciales. Biosíntesis a granel de ácidos grasos con longitudes de cadena de carbono de hasta C18 se produce en los plástidos; ácidos grasos se exportan al retículo endoplásmico donde se cree que la elongación pasado C18 y la incorporación en triacilglicéridos (etiquetas) que se produzca. Los lípidos se almacenan en grandes orgánulos citoplasmáticos llamados cuerpos de lípidos hasta que las condiciones ambientales cambian para favorecer el crecimiento, después de lo cual se movilizan rápidamente para proporcionar moléculas de energía y carbono para el metabolismo anabólico. Lípidos *P. moriformis* de tipo salvaje de almacenamiento se compone principalmente de ácidos ~60% oleico (C18: 1), ~25-30% palmítico (C16: 0), y ~5-8% linoleico (C18: 2), con cantidades menores de ácidos esteárico (C18: 0), mirístico (C14: 0),  $\alpha$ -linolénico (C18: 3 a), y palmitoleico (C16: 1). Este perfil de ácidos grasos resulta de las actividades relativas y afinidades de sustrato de las enzimas de la ruta biosintética del ácido graso endógeno. *P. moriformis* es susceptible de manipulación de ácidos grasos y biosíntesis de lípidos utilizando herramientas de genética molecular, permitiendo la producción de aceites con perfiles de ácidos grasos que son muy diferentes a la composición de tipo salvaje. Aquí se describe cepas donde hemos modificado la expresión de *ACP desaturasa estearoil (SAD)* y genes de  $\beta$ -cetoacil-ACP sintasa II (*KASII*) con el fin de generar cepas con hasta 57% de estearato y tan poco como 7% de palmitato. Identificamos cepas adicionales con hasta un 55% de estearato y tan poco como 2,4% linoleato cuando realizamos modificaciones similares en conjunto con la regulación negativa de la expresión de la *FATA* tioesterasa y la genes *FAD2* de desaturasa de ácidos grasos.

**[0389]** SADs solubles son localizados por plastidio, enzimas di-hierro que catalizan la desaturación de proteína portadora de acilo estearato unido a (ACP) de oleato (C18: 1 cis- $\Delta^9$ ). Anteriormente, hemos establecido que las construcciones de horquilla dirigidas a las transcripciones *SAD1* o *SAD2* activan la maquinaria celular interferencia de ARN (iARN), actividad SAD de regulación a la baja y que resulta en niveles elevados de C18: 0 en el lípido de almacenamiento. Actividad SAD también se reduce en las cepas en las que interrumpen uno de los dos alelos de *SAD2*, que codifica los principales SADs que se expresan durante la biosíntesis de lípidos de almacenamiento. El gen de *desaturasa 2* de ácido graso (*FAD2*) codifica una desaturasa asociada a la membrana del retículo endoplásmico que convierte oleato a linoleato (C18: 2 cis- $\Delta^9$ , cis- $\Delta^{12}$ ). Construcciones de horquilla de iARN diana *FAD2* reducen los niveles de linoleato a 1-2%. *KASII* es un ácido graso sintasa que cataliza específicamente la condensación de malonil-ACP con palmitoilo (C16: 0)-ACP para formar  $\beta$ -ceto-estearoil-ACP. Hemos demostrado que la sobreexpresión de *KASII* en *P. moriformis* provoca niveles C16: 0 para disminuir con un incremento concomitante en abundancia C18: 1. En los ejemplos siguientes se demuestra que la regulación a la baja de la expresión génica *SAD* utilizando iARN, interrumpiendo un alelo del gen *SAD2*, y la sobreexpresión del ácido graso sintasa *KASII*, se generan cepas capaces de acumular estearato en exceso de 50% de los ácidos grasos totales, y con SOS como las principales especies de TAG. Niveles SOS aumentan hasta un 47% en las cepas que combinan regulación a la baja *SAD2* y *FAD2* con sobreexpresión de *KASII*.

**[0390] Construcciones utilizadas para *SAD2* knockout/iARN en S1920:** Una construcción de ADN, pSZ2282, se hizo para interrumpir simultáneamente el alelo *SAD2-1* y expresar una construcción en horquilla *SAD2* en S1920. Una versión del gen *SUC2* *Saccharomyces cerevisiae*, que codifica para la invertasa de sacarosa, que fue codones optimizados para la expresión en *P. moriformis*, se utilizó como un marcador seleccionable para la transformación. La secuencia del ADN transformante se proporciona inmediatamente debajo. Sitios de restricción relevantes se indican en minúsculas, negrita, y son de 5'-3' BspQI, KpnI, Ascl, MfeI, BamHI, AvrII, EcoRV, EcoRI, SpeI, BamHI, HindIII, y SacI, respectivamente. Sitios BspQI delimitan el 5' y 3' del ADN transformante. Secuencias subrayadas en los extremos 5' y 3' flancos de la construcción representan ADN genómico de *P. moriformis* que permiten la integración dirigida del ADN de transformación a través de recombinación homóloga en el lugar *SAD2-1*. Procediendo en la dirección 5' a 3', el *Chlamydomonas reinhardtii* promotor *tub2* que dirige la expresión de *Saccharomyces cerevisiae* *suc2* gen (que codifica actividad de hidrólisis de la sacarosa, permitiendo de este modo que la cepa se cultive en sacarosa) se indica mediante letras minúsculas, texto en caja. El iniciador ATG y el terminador TGA para *SUC2* se indican mediante cursiva y en mayúsculas, mientras que la región de codificación está indicada con letra cursiva en minúsculas. UTR 3' de gen *Chlorella vulgaris* *nitrato reductasa (NR)* se indica por pequeñas mayúsculas, seguido por una región espaciadora indicada por texto en minúsculas. Una segunda secuencia promotora *tub2* *C. reinhardtii*, indicada por texto en caja en minúsculas, conduce la expresión de *SAD2* secuencia de horquilla *C. Las cadenas con sentido y antisentido se indican con mayúsculas, negrita y cursiva, y están separadas por *P. moriformis*  $\Delta^{12}$  desaturasa de ácido graso (*FAD2*) Intrón y las primeras 10 bases de *FAD2* segundo exón (cursiva y en mayúsculas). Un segundo *C. vulgaris* NR 3' UTR se indica por pequeñas mayúsculas.*

**[0391]** Secuencia de nucleótidos del ADN transformante de pSZ2282:

**gctcttc**gggtcgccgcgctgcctcgctcccctggtggtgcgcgcggtgccagcgaggccccgctgggcgttccgccctcggtgca  
 5 gcgccccctccccgtggtctactccaagctggacaagcagcaccgcctgacgcccagcgctggagctggtgcagagcatggggc  
agtttcggaggagaggggtgctgcccgtgctgcaccccgtggacaagctgtggcagccgcaggacttttgcggaccccgagtcgc  
ccgacttcgaggatcaggtggcggagctgcgcgcgcgcgccaaggacctgcccgacgagtactttgtggtgctggtgggggacatg  
 10 atcacggaggaggcgctgccgacctacatggccatgctcaacacgctggacggcgtgcgcgacgacacgggcgcggccgaccacc  
cgtagggcgctggacgcggcagtggtggccgaggagaaccggcacggcgacctgctgaacaagtactgctggctgacggggc  
 15 gcgtcaacatgcgggcccgtggaggtgacctcaacaacctgatcaagagcggcatgaacccgcagacggacaacaaccttattt  
ggggttcgtctacacctccttcaggagcgcgccaccaagtaggtaccctttcttgcgctatgacacttcagcaaaaggtagggcg  
ggctgcgagacggcttcccggcgctgcatgcaacaccgatgatgcttcgacccccgaagctccttcggggctgcatgggcgctccg  
 20 atgccgctccagggcgagcgctgtttaaatagcaggcccccgattgcaaagacattatagcgagctaccaaagccatattcaaac  
acctagatcactaccattctacacaggccactcgagcttgtgatcgactccgctaagggggcgcttctctcttctgttcagtcac  
 25 aaccgcgaaac**ggcgcgcc***ATGctgctgcaggccttctgttctgctggccggcttcgccgccaagatcagcgctccatgac*

30

35

40

45

50

55

60

65

gaacgagacgtccgaccgccccctggtgcacttcacccccacaagggctggatgaacgaccccaacggcctgtggtacgac  
 gagaaggacgccaagtggcacctgtacttcagtacaacccgaacgacacccgtctgggggacgcccctgttctggggccacg  
 5 ccacgtccgacgacctgaccaactgggaggaccagcccacgcgcacccgaagcgcaacgactccggcgcccttctccggc  
 tccatggtggtggactacaacaacacctccggcttcttaacgacaccatcgacccgcgagcgctgctggccatctggacc  
 10 tacaacaccccgagtcgaggagcagtagatctctacagcctggacggcggtacaccttcaccgagtagcagaagaacc  
 ccgtgctggccgccaactccacccagttccgcgacccgaaggtcttctggtacgagccctccagaagtggatcatgaccgcg  
 ccaagtcccaggactacaagatcgagatctactcctccgacgacctgaagtcttgaagctggagtccgcgttcgccaacgag  
 15 ggcttctcggctaccagtacgagtccccggcctgatcgaggtccccaccgagcaggacccagcaagtctactgggtgat  
 gttcatctccatcaacccggcgccccggcgggcctcttaaccagtagttcgtcggcagcttaacggcaccacacttcgag  
 gccttcgacaaccagtcgagcgtggtggacttcggcaaggactactacgcccgcagaccttcttaacacccgacccgacctac  
 20 gggagcgccctgggcatcgctgggctccaactgggagtagtccgccttcgtgccaccaacccctggcgctcctccatgtccc  
 tcgtgcgaagttctcctcaacacccgagtagcaggccaacccggagacggagctgatcaacctgaaggccgagccgatcct  
 25 gaacatcagcaacgcgggccccctggagccgggtcgccaccaacaccacggtgacgaaggccaacagctacaacgtcgacctg  
 tccaacagacccggcacccctggagttcgagctggtgtacgcccgaacacccaccagacgatctccaagtccgtgttcgcgga  
 cctctccctctggttaagggcctggaggaccccgaggagtacctccgcatgggcttcgaggtgtccgcgtcctccttctctgg  
 30 accgcggaacagcaaggtgaagttcgtgaaggagaacccctacttcaccaaccgcatgagcgtgaacaaccagccctca  
 agagcgagaacgacctgtcctactacaaggtgtacggcttgcggaccagaacatcctggagctgtacttcaacgacggcga  
 35 cgtcgtgtccaccaacacactacttcatgaccacgggaacgccttgggctccgtgaacatgacgacgggggtggacaacctgt  
 tctacatcgacaagttccaggtgcgcgaggtcaag**TGAcaattg**GCAGCAGCAGCTCGGATAGTATCGACACACTCTGGAC  
 40 GCTGGTCGTGTGATGGACTGTTGCCGCCACACTTGCTGCCTTGACCTGTGAATATCCCTGCCGCTTTTATCAAACAGCCTCA  
 GTGTGTTTGATCTTGTGTGTACGCGCTTTTGCAGATTGCTAGCTGCTTGTGCTATTTGCGAATACCACCCCAAGCATCCCCT  
 TCCCTCGTTTCATATCGCTTGATCCCAACCGCAACTTATCTACGCTGCTCCTGCTATCCCTCAGCGCTGCTCCTGCTCCTGCT  
 45 CACTGCCCCCTCGACAGCCTTGGTTGGGCTCCGCTGTATTCTCCTGGTACTGCAACCTGTAAACCAGCACTGCAATGCT  
 GATGCACGGGAAGTAGTGCGATGGGAACACAAATGGA**agatccc**gcgtctcgaacagagcgcgcagaggaacgctgaaggt  
 ctgcctctgtgcacctcagcgggcatacaccacaataaccacctgacgaatgcgcttggttcttcgtccattagcgaagcgtccg  
 50 gttcacacacgtgccacgttggcgaggtggcaggtgacaatgatcggtagctgatggtcgaacggttcacag**cctagggatatc**  
**gaattc**ctttcttcgctatgacacttcagcaaaaggtagggcggtgcgagacggcttccggcgctgcatgcaacaccgatga  
 55 tgcttcgacccccgaagctccttcggggctgcatggcgctccgatccgctccagggcgagcgtgtttaaatagccaggccccc  
 gattgcaaagacattatagcgagctaccaaagccatattcaaacacctagatcactaccacttctacacaggccactcgagcttgtg  
 atcgactccgctaagggggcgctcttctcttctgcttctcagtcacaacccgcaaa**actag****TGCGCTGGACGCGGCAGTG**  
 60 **GGTGGCCGAGGAGAACCGGCACGGCGACCTGCTGAACAAGTACTGTTGGCTGACGGGGCGCGTC**  
**AACATGCGGGCCGTGGAGGTGACCATCAACAACCTGATCAAGAGCGGCATGAACCCGACAGCG**  
 65

**ACAACAACCTTACTTGGGCTTCGTCTACACCTCCTTCCAGGAGCGCGCGACCAAGTACAGCCACGG**  
**CAACACCGCGCGCCTTGCGGCCGAGCA**GTGTGTTTGAGGGTTTTGGTTGCCGTATCGAGGTCCTGG  
 TGGCGCGCATGGGGGAGAAGGCGCCTGTCCCGCTGACCCCCCGGCTACCCTCCCGGCACCTTCCAG  
 GCGCGTACG**ggatccTGCTCGGCCGCAAGGCGCGCGGTGTTGCCGTGGCTGTACTTGGTGCGCGCGC**  
**TCCTGGAAGGAGGTGTAGACGAAGCCCAAGTAAGGGTTGTTGTCCGTCTGCGGGTTCATGCCGCT**  
**CTTGATCAGGTTGTTGATGGTCACCTCCACGGCCCGCATGTTGACGCGCCCCGTAGCCAACAGTAC**  
**TTGTTACAGAGGTGCGCGTGCCGGTCTCCTCGGCCACCCACTGCGCGTCCAGCGC****Caagctt**GCAGCAG  
 CAGCTCGGATAGTATCGACACACTCTGGACGCTGGTCGTGTGATGGACTGTTGCCGCCACACTTGCTGCCTTGACCTGTGA  
 ATATCCCTGCCGCTTTTATCAAACAGCCTCAGTGTGTTGATCTGTGTGTACGCGCTTTGCGAGTTGCTAGCTGCTGTG  
 CTATTTGCGAATACCACCCCGCATCCCCTTCCCTCGTTTCATATCGCTTGCATCCCAACCGCAACTTATCTACGCTGTCT  
 GCTATCCCTCAGCGCTGCTCCTGCTCCTGCTCACTGCCCTCGCACAGCCTTGTTTGGGCTCCGCTGTATTCTCCTGGTA  
 CTGCAACCTGTAAACCAGCACTGCAATGCTGATGCACGGGAAGTAGTGGGATGGGAACACAAATGGAAAGCTG**gagctc**  
cagccacggcaacaccgcgccttgccggccgagcacggcgacaagaacctgagcaagatctgcccggctgatcgccagcgacga  
ggccggcgacgagatgcctacacgcgccttgccggccgagcacggcgacaagaacctgagcaagatctgcccggctgatcgccagcgacga  
tgatgcgcaagcagatcaccatgcccgcgcacctcatggacgacatggccacggcgaggccaacccgggcccgaacctcttcgc  
cgacttctccggtcgccgagaagatcgacgtctacgacccgaggactactgcccgcctctggagcacctcaacgcgcgtgga  
aggtggacgagcgccaggtcagcgccagggccgcccggaccaggagtagctctgggctgcccagcgcttccggaaactcgc  
cgagaagaccgcccgaagcgcaagcgctcgcgccagggccgcttctctggatctccgggcgcgagatcatggtctagg  
gagcgacgagtgctgctgccccgctggcgggagtgaggacgcctcctcgtcctctctgttctgaacggaacaatcgccacccccg  
cgctacgcccacgcatcgagcaacgaagaaaacccccgatgataggttgccgtggctgcccggatagatccggccgacat  
caaaggccccctccgcccagagaagaagctccttcccagcagactcctgaagagc (SEQ ID NO: 94)

**[0392] Identificación y análisis de SAD2 knockout/cepas desmontables:** Constructo D1283, derivado de pSZ2282, se transformó en S1920 como se describió anteriormente. Los transformantes primarios fueron purificados clonalmente y cultivados bajo condiciones de producción de lípidos estándar a pH 5. Los perfiles de ácidos grasos resultantes de clones representativos derivados de la transformación con pSZ2282 en S1920 se resumen en la Tabla 39, a continuación. Transformantes D1283 acumularon hasta ~42% de C18: 0 a expensas de C18: 1, indicando que la actividad SAD se redujo significativamente en estas cepas.

Tabla 39. Perfiles de ácidos grasos de transformantes primarios D1283 [pSZ2282], en comparación con la cepa parental de tipo silvestre, S1920.

Cepa		S1920	D1283-4	D1283-7	D1283-19	D1283-27	D1283-40	D1283-24
Área % ácido graso	C12:0	0.04	0.05	0.06	0.07	0.06	0.04	0.05
	C14:0	1.31	0.92	1.07	1.01	1.08	1.03	0.96
	C16:0	26.68	28.23	29.21	27.24	27.67	27.02	27.07
	C16:1	0.78	0.05	0.06	0.08	0.33	0.14	0.12
	C17:0	0.11	0.12	0.15	0.10	0.10	0.12	0.13
	C18:0	3.15	41.98	40.94	34.20	26.26	23.18	22.82
	C18:1	59.30	19.37	18.17	26.87	34.77	38.74	39.38
	C18:2	7.47	6.22	7.43	7.42	7.31	7.25	7.38
	C18:3 $\alpha$	0.57	0.93	1.03	0.75	0.71	0.72	0.51
	C20:0	0.32	1.81	1.67	1.75	1.35	1.36	1.23
	C20:1	0.00	0.10	0.00	0.12	0.00	0.12	0.11
	C22:0	0.05	0.17	0.13	0.20	0.16	0.16	0.15
C24:0	0.00	0.00	0.00	0.10	0.00	0.00	0.00	
Suma C18		70.49	68.5	67.57	69.24	69.05	69.89	70.09
Saturados		31.66	73.28	73.23	64.67	56.68	52.91	52.41
Insaturados		68.12	26.67	26.69	35.24	43.12	46.97	47.50

[0393] En la Tabla 39, niveles de estearato (C18: 0) mayores que el nivel de tipo salvaje se destacan con negrita.

[0394] Los perfiles de ácidos grasos de los transformantes D1283-4 y -7 se determinaron que eran estables después de más de 30 generaciones de crecimiento en ausencia de selección (crecimiento en sacarosa). A continuación, se evaluó el comportamiento de las cepas seleccionadas en ensayos en matraz de agitación, y los perfiles de ácidos grasos y los títulos de lípidos se presentan en la Tabla 40, a continuación. S4495 tenía el más alto nivel de C18: 0 (~44%) y el mejor título de lípidos (~26%) en relación con el padre S1920, y así fue seleccionado para un mayor desarrollo de la fermentación.

Tabla 40. Perfiles de ácido graso y títulos lipídicos de cepas knockout/knockdown SAD2 derivadas de transformantes primarios D1283, en comparación con la cepa parental de tipo silvestre, S1920.

Primario		T342:D1283-4				T342:D1283-7		
Cepa		S1920	S4490	S4491	S4492	S4493	S4494	S4495
Área % ácido graso	C14:0	1.59	1.61	1.58	1.55	1.81	1.84	1.34
	C16:0	30.47	29.41	28.58	29.24	28.77	29.09	28.47
	C16:1	0.82	0.05	0.07	0.05	0.07	0.05	0.06
	C17:0	0.10	0.30	0.29	0.28	0.46	0.37	0.19
	C18:0	3.58	42.85	41.86	43.38	39.99	41.41	44.42
	C18:1	56.96	13.52	15.55	13.49	13.57	12.98	15.64
	C18:2	5.50	8.01	7.85	7.65	10.37	9.47	5.72
	C18:3 $\alpha$	0.37	0.78	0.73	0.82	0.95	0.91	0.64
	C20:0	0.22	2.06	2.11	2.11	1.98	1.98	2.32
	C22:0	0.05	0.32	0.34	0.33	0.33	0.32	0.35
	C24:0	0.03	0.43	0.42	0.44	0.49	0.49	0.37
titulación lipídica (% padre)		100	12.3	12.6	13.6	6.2	8.2	25.9

[0395] En la Tabla 40, niveles de estearato (C18: 0) mayores que el nivel de tipo salvaje se destacan con negrita.

[0396] Hemos optimizado el rendimiento de S4495 en 7-L fermentaciones, y encontramos que podíamos coincidir con el nivel ~44% C18: 0 obtenido en matraces de agitación, con productividades de lípidos que estaban ~45% de la matriz de tipo salvaje. Los perfiles de ácidos grasos y los títulos de lípidos de fermentaciones representativas S4495 se



resumen en la Tabla 41, a continuación. Fermentación de S4495 en condiciones óptimas produjo casi el 44% de C18: 0, que era similar al nivel de estearato que se acumuló en ensayos en matraz oscilante. S4495 produjo altos niveles C18: 0 en escala tanto matraz como 7-L y tenía la productividad de lípidos aceptable en 7-L fermentaciones; por consiguiente esta cepa fue seleccionada como una cepa base para modificaciones adicionales destinadas a aumentar la acumulación C18: 0.

Tabla 41. Perfiles de ácido grasos y títulos lipídicos de S4495, en comparación con la cepa transgénica de control, S2074.

Cepa	S2074	S4495	S4495	S4495
Fermentación	110088F14	120489F5	120531F8	120580F1
Area % ácido graso	C14:0	1.47	1.18	1.15
	C16:0	25.66	28.68	28.38
	C16:1	0.71	0.11	0.09
	C18:0	3.16	41.63	42.40
	C18:1	62.24	20.78	19.38
	C18:2	5.90	5.06	5.38
	C18:3 $\alpha$	0.16	0.24	0.25
	C20:0	0.24	1.36	1.99
	C22:0	0.05	0.19	0.28
	C24:0	0.05	0.34	0.29
	Suma C18	71.46	67.71	67.41
Saturados		30.63	73.38	74.49
Insaturados		69.01	26.19	25.10
Lípido total (g/L)		930	383	539
				475

[0397] En la Tabla 41, niveles de estearato (C18: 0) mayores que los de control se resaltan con texto en negrita. S2074 contiene *S. cerevisiae* SUC2, la codificación de la invertasa de sacarosa, integrado en el locus 6S, y tiene un perfil de ácidos grasos que es indistinguible del de tipo salvaje padre S1920.

[0398] **Construcciones utilizadas para sobreexpresión de KASII en S4495:** Constructo de ADN pSZ2734 se hizo para sobreexpresar un codón optimizado *P. moriformis* gen *KASII* en S4495. El gen *neoR* de transposón *Tn5*, que confiere resistencia a los antibióticos aminoglucósidos, se utilizó como un marcador seleccionable para la transformación. La secuencia del ADN transformante se proporciona inmediatamente debajo. Sitios de restricción relevantes se indican en minúsculas, negrita, y son de 5'-3' BspQI, KpnI, XbaI, MfeI, BamHI, AvrII, EcoRV, SpeI, AscI, ClaI, BglII, AflII, HindIII y SacI, respectivamente. Sitios BspQI delimitan el 5' y 3' del ADN transformante. Secuencias subrayadas en los extremos 5' y 3' flancos de la construcción representan ADN genómico de *P. moriformis* que permiten la integración dirigida del ADN de transformación a través de recombinación homóloga en el lugar 6S. Procediendo en la dirección 5' a 3', *C. reinhardtii* promotor *tub2* que dirige la expresión de *neoR* (que codifica la actividad de la fosfotransferasa de aminoglucósido, permitiendo de este modo la cepa para crecer en G418) está indicado por letras minúsculas, texto en caja. El iniciador ATG y el terminador TGA para *neoR* se indican mediante cursiva y en mayúsculas, mientras que la región de codificación está indicada con letra cursiva en minúsculas. UTR 3' de *C. vulgaris* gen *NR* se indica por pequeñas mayúsculas, seguido por una región espaciadora indicada por texto en minúsculas. La secuencia promotora *SAD2-2P. moriformis*, indicada por texto en caja, conduce a la expresión del gen *KASII* optimizado por codón *P. moriformis*. La región que codifica la secuencia de direccionamiento de plástido *KASII* se indica mediante cursiva y en mayúsculas. La secuencia que codifica el polipéptido *KASII* maduro *P. moriformis* se indica con subrayado, cursiva, mayúsculas y en negrita, mientras que una secuencia de epítipo de codificación 3xFLAG está en negrita y cursiva. Un segundo *NR* 3' UTR *C. vulgaris* se indica por pequeñas mayúsculas.

[0399] Secuencia de nucleótidos del ADN transformante de pSZ2734:

**gctcttc**gccgcccactcctgctcgagcgccccgcgctgcccgcagcgcttggccttttcgcccgcctcgtgcgcgtcgct  
 gatgtccatcaccaggtccatgaggtctgccttgcgcccgcctgagccactgcttcgtccggcgcccaagaggagcatgagggagg  
 5 actcctggccagggctcctgacgtggtcgcggtctgggagcgggccagcatcatctggctctgccgcaccgaggccgctccaact  
 ggtcctccagcagccgagtcgcccgcgacctggcagaggaagacaggtgaggggtgtatgaattgtacagaacaaccacgagc  
 10 cttgtctaggcagaatccctaccagtcattggctttacctggatgacggcctgcgaacagctgtccagcgacctcgctgcgcccgtt  
 ctccgcacgcttctttccagcaccgtgatggcgcgagccagcgccgcacgtggcgctgcgcttcgccgatctgaggacagtcggg  
 gaactctgatcagtcataaacccttgcgcttagtggtgccatcctttgcagaccggtagagagccgacttggtgtgcgccacccccca  
 15 caccacctctccagaccaattctgtcaccttttggcgaaggcatcgccctcgccctgcagagaggacagcagtgcccagccgct  
 gggggttgccggtgcacgctc**aggtacc**cttcttgcgctatgacacttcagcaaaaggtaggcgggctgcgagacggcttccc  
 20 ggcgctgcatgaacaccgatgatgcttcgacccccgaagctccttcggggctgcatggcgctccgatgccgctccagggcgag  
 cgctgtttaatagccaggccccgattgcaaagacattatagcgagctaccaaagccatattcaaacacntagatcactaccatt  
 ctacacaggccactcgagcttgatgcactccgctaagggggcgcttctcctcttcgtttcagtcacaacccgcaaa**cttagaa**  
 25 tatcaATGatcgagcaggacggcctccacgcccgtccccgcgctgggtggagcgctgttcggctacgactgggcccag  
 cagaccatcggtgctccgacgcccgtgttcgctgtcccagggcgccccgtgctgttcgtgaagaccgacctgtccg  
 30 gcgacctgaacgagctgcaggacgaggccgcccgtgtcctggtggccaccacggcgctgcctgcgcccgtgtcggac  
 gtggtgaccgaggccgcccgcgactggctgctgctgggagaggtgccggccaggacctgctgtcctccacctggccccgc  
 cgagaaggtgtccatcatggccgacgcatgcccgcctgcacacctggaccccgccacctgcccctcgaccaccaggcca  
 35 agcaccgcatcgagcgccccgacccgcatggaggccgacctggtggaccaggacgacctggagcaggagcaccagggc  
 ctggccccgcccagctgttcgcccgtgaaggccgcatgcccgcgagggacctggtggtgacctacggcgagcgacctg  
 40 cctgcccacatcatggtggagaacggccgttctccggttcacgactgcggccgctgggctggccgacctgaccagg  
 acatcgccctggccaccgacatcgccgaggagctgggcccgcagtgggccgaccttctggtgctgtacggcatcgcc  
 gccccgactcccagcgcatcgcttctaccgctgtggacgagttcttc**TGAcaattg**GCAGCAGCAGCTCGGATAG  
 45 TATCGACACACTCTGGACGCTGGTCGTGTGATGGACTGTTGCCGCCACACTTGCTGCCTTGACCTGT  
 GAATATCCCTGCCGCTTTTATCAAACAGCCTCAGTGTGTTTATCTTGTGTGTACGCGCTTTTTCGAG  
 50 TTGCTAGCTGCTTGTGCTATTTGCGAATACCAACCCCGCATCCCCTTCCCTCGTTTCATATCGCTTGC  
 ATCCCAACCGCAACTTATCTACGCTGTCTGCTATCCCTCAGCGCTGCTCCTGCTCCTGCTCACTGCCC

CTCGCACAGCCTTGGTTTGGGCTCCGCCTGTATTCTCCTGGTACTGCAACCTGTAAACCAGCACTGCA  
 5 ATGCTGATGCACGGGAAGTAGTGGGATGGGAACACAAATGG**Aggatccc**gctctcgaacagagcgcgcaga  
 ggaacgctgaaggctctgcctctgtcgacctcagcgcgccatacaccacaataaccacctgacgaatgcgcttgggtctctgtccat  
 tagcgaagcgctccggttcacacacgtgccacgttggcgaggtggcaggtgacaatgatcggtggagctgatggtcgaaacggtcac  
 10 **agcctagggatatc**CTGAAGAATGGGAGGCAGGTGTTGTTGATTATGAGTGTGTAAAGAAAGGGGTA  
 GAGAGCCGTCCTCAGATCCGACTACTATGCAGGTAGCCGCTCGCCCATGCCCGCCTGGCTGAATATT  
 15 GATGCATGCCCATCAAGGCAGGCAGGCATTCTGTGCACGCACCAAGCCCACAATCTTCCACAACAC  
 ACAGCATGTACCAACGCACGCGTAAAGTTGGGGTGCTGCCAGTGCGTCATGCCAGGCATGATGTG  
 CTCCTGCACATCCGCCATGATCTCCTCCATCGTCTCGGGTGTTCCGGCGCCTGGTCCGGGAGCCGTT  
 20 CCGCCAGATACCCAGACGCCACCTCCGACCTCACGGGGTACTTTTCGAGCGTCTGCCGGTAGTCGAC  
 GATCGCGTCCACCATGGAGTAGCCGAGGCGCCGGAAGTGGCGTGACGGAGGGAGGAGAGGGAGG  
 25 AGAGAGAGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGATGATTACACGCCAGTCTCACAACGCATGCAAGACCCGT  
 TTGATTATGAGTACAATCATGCACTACTAGATGGATGAGCGCCAGGCATAAGGCACACCGACGTTG  
 30 ATGGCATGAGCAACTCCCGCATCATATTCCTATTGTCTCACGCCAAGCCGGTCACCATCCGCATGC  
 TCATATTACAGCGCACGCACCGCTTCGTGATCCACCGGTGAACGTAGTCCTCGACGGAAACATCTG  
 GCTCGGGCCTCGTGCTGGCACTCCCTCCCATGCCGACAACCTTTCTGCTGTACCACGACCCACGATG  
 35 CAACGCGACACGACCCGGTGGGACTGATCGGTTCACTGCACCTGCATGCAATTGTCACAAGCGCAT  
 ACTCCAATCGTATCCGTTTGATTTCTGTGAAAACCTCGCTCGACCGCCCGCTCCCGCAGGCAGCGAT  
 40 GACGTGTGCGTGACCTGGGTGTTTCGTGAAAGGCCAGCAACCCCAAATCGCAGGCGATCCGGAGA  
 TTGGGATCTGATCCGAGCTTGACCAGATCCCCACGATGCGGCACGGGAACTGCATCGACTCGGC  
 45 GCGGAACCCAGCTTTCGTAAATGCCAGATTGGTGTCCGATACCTTGATTGCCATCAGCGAAACAAG  
 ACTTCAGCAGCGAGCGTATTTGGCGGGCGTGCTACCAGGGTTGCATACATTGCCATTTCTGTCTGG  
 ACCGCTTTACCGGCGCAGAGGGTGAGTTGATGGGGTTGGCAGGCATCGAAACGCGCGTGATGGT  
 50 GTGTGTGTCTGTTTTCGGCTGCACAATTTCAATAGTCGGATGGGCGACGGTAGAATTGGGTGTTGC  
 GCTCGCGTGATGCCTCGCCCCGTCGGGTGTCATGACCGGGACTGGAATCCCCCTCGCGACCCTCC  
 55 TGCTAACGCTCCCGACTCTCCCGCCCGCGCGCAGGATAGACTCTAGTTCAACCAATCGACA**actagta**T  
 GCAGACCGCCACCAGCGCCCCCCCCACCGAGGGCCACTGCTTCGGCGCCCGCCTGCCACCGCCTCCC  
 60 GCCGCGCCGTGCGCCGCGCCTGGTCCCGCATCGCCCGCG**ggcgcgccGCCGCCGCCGCCGACGCCAAC**  
**CCCCCCCCGCCGAGCGCCGCGTGGTGATCACCGGCCAGGGCGTGGTGACCTCCCTGGGCCAGACC**  
**ATCGAGCAGTTCTACTCCTCCCTGCTGGAGGGCGTGTCGGGCATCTCCAGATCCAGAAGTTCGACA**  
 65

CCACCGGCTACACCACCACCATCGCCGGCGAGATCAAGTCCCTGCAGCTGGACCCCTACGTGCCCAA  
 GCGCTGGGCCAAGCGCGTGGACGACGTGATCAAGTACGTGTACATCGCCGGCAAGCAGGCCCTGG  
 5 AGTCCGCCGGCCTGCCATCGAGGCCGCCGGCCTGGCCGGCGCCGGCCTGGACCCCGCCCTGTGCG  
 GCGTGCTGATCGGCACCGCCATGGCCGGCATGACCTCCTTCGCCGCCGGCGTGGAGGCCCTGACCC  
 10 GCGGGCGCGTGCGCAAGATGAACCCCTTCTGCATCCCCTTCTCCATCTCCAACATGGGCGGCGCCAT  
 GCTGGCCATGGACATCGGCTTCATGGGCCCCAACTACTCCATCTCCACCGCTGCGCCACCGGCAAC  
 TACTGCATCCTGGGCGCCGCCGACCACATCCGCCGCGGCGACGCCAACGTGATGCTGGCCGGCGGC  
 15 GCCGACGCCGCCATCATCCCCTCCGGCATCGGCGGCTTCATCGCCTGCAAGGCCCTGTCCAAGCGCA  
 ACGACGAGCCCGAGCGCGCCTCCCGCCCCTGGGACGCCGACCGCGACGGCTTCGTGATGGGCGAG  
 GCGCGCCGGCGTGCTGGTGGTGGAGGAGCTGGAGCAGCCAAGCGCCGCGGCGCCACCATCTGGC  
 20 CGAGCTGGTGGGCGGCGCCGACCTCCGACGCCACCACATGACCGAGCCCGACCCCAAGGCCCG  
 CGGCGTGCGCCTGTGCCTGGAGCGCGCCCTGGAGCGCGCCCGCCTGGCCCCCGAGCGCGTGGGCTA  
 25 CGTGAACGCCACGGCACCTCCACCCCGCCGGCGACGTGGCCGAGTACCGCGCCATCCGCGCCGT  
 GATCCCCCAGGACTCCCTGCGCATCAACTCCACCAAGTCCATGATCGGCCACCTGCTGGGCGGCGCC  
 GCGCGCGTGGAGGCCGTGGCCGCCATCCAGGCCCTGCGCACCGGCTGGCTGCACCCCAACCTGAAC  
 30 CTGGAGAACCCCGCCCCCGGCGTGGACCCCGTGGTGGTGGGCCCCGCAAGGAGCGCGCCGA  
 GGACCTGGACGTGGTGGTGTCCAACCTCCTTCGGCTTCGGCGGCCACAACCTCTGCGTGATCTTCCGC  
 35 AAGTACGACGAGATGGACTACAAGGACCACGACGGCGACTACAAGGACCACGACATCGACTACA  
AGGACGACGACGACAAGTGAAatc gatagatctcttaagGCAGCAGCAGCTCGGATAGTATCGACACTC  
 40 TGGACGCTGGTGTGTGATGGACTGTTGCCGCCACACTTGCTGCCTTGACCTGTGAATATCCCTGCC  
 GCTTTTATCAACAGCCTCAGTGTGTTTGATCTTGTGTGTACGCGCTTTTGCAGTTGCTAGCTGCTT  
 GTGCTATTTGCGAATACCACCCCGAGCATCCCCTTCCCTCGTTTCATATCGCTTGCATCCCAACCGCAA  
 45 CTTATCTACGCTGTCTGCTATCCCTCAGCGCTGCTCCTGCTCCTGCTCACTGCCCCCTGCACAGCCTT  
 GGTTGGGCTCCGCTGTATTCTCCTGGTACTGCAACCTGTAAACCAGCACTGCAATGCTGATGCAC  
 50 GGGAAGTAGTGGGATGGGAACACAAATGGAaagcttaattaagagctcttgttttccagaaggagttgctccttgag  
cctttcattctcagcctcgataacctccaaagccgctctaattgtggagggggttcgaatttaaaagcttggaatgttggttcgtgcgt  
ctggaacaagcccagacttgttgctcactgggaaaaggaccatcagctccaaaaaacttgccgctcaaaccgctacacctgctttc  
 55 gcgcaatctgccctgttgaaatcgccaccacattcatattgtgacgcttgagcagctctgtaattgcctcagaatgtggaatcatctgcc  
ccctgtgcgagcccatgccaggcatgtcgggcgaggacacccgccactcgtacagcagaccattatgtacctcacaatagttca  
taacagtgaccatatttctgaagctcccaacgagcacctccatgctctgagtgccacccccggccctggtgcttgcggagggc  
 60 aggtcaaccggcatggggtaccgaaatccccgaccggatccaccacccccgcatgggaagaatctctccccgggatgtggggc  
caccaccagcacaacctgtggcccaggcgagcgtcaaaccataccacacaaatatccttggcatcgccctgaattccttctgccg  
 65

ctctgctacccgggtgcttctgtccgaagcaggggttgctagggatcgctccgagtcgcaaaccttgtcgctggcggggcttgttc  
gagcttgaagagc (SEQ ID NO:95)

**[0400]** La sobreexpresión de *KASII* en la cepa X: Constructo D1643 derivado de pSZ2734 se transformó en S4495 como se describió anteriormente. Los transformantes primarios fueron purificados clonalmente y cultivados bajo condiciones de producción de lípidos estándar a pH 5. Los perfiles de ácidos grasos resultantes de clones representativos derivados de transformación de S4495 con D1643 se resumen en la Tabla 42, a continuación. La sobreexpresión de *KASII* en el *SAD2* knockout/knockdown fondo S4495 resultó en múltiples cepas acumulando más de 50% de C18: 0 y con niveles sustancialmente reducidos de C16: 0. También observamos que *KASII* que sobreexpresan líneas tenían relaciones globales más bajas de saturados a los ácidos grasos insaturados en comparación con S4495.

Tabla 42. Perfiles de ácido graso de transformantes primarios D1653 [pSZ2734], en comparación con la cepa base S4495 y la cepa padre de tipo silvestre, S1920.

Cepa	S1920	S4495	D1653- 89	D1653- 10A	D1653- 2B	D1653- 3B	D1653- 7A	D1653- 7S	D1653- 9G	D1653- 9B	D1653- 72	D1653- 6B	D1653- 82	D1653- 6B
<b>C12:0</b>	0.04	0.06	0.27	0.13	0.20	0.19	0.24	0.13	0.12	0.27	0.16	0.18	0.25	0.21
<b>C14:0</b>	1.44	1.06	1.55	1.65	1.79	1.67	1.70	1.53	1.50	1.74	1.57	1.64	1.48	1.56
<b>C16:0</b>	29.23	29.83	<b>8.16</b>	<b>11.45</b>	<b>10.68</b>	<b>10.11</b>	<b>9.27</b>	<b>11.14</b>	<b>11.98</b>	<b>9.40</b>	<b>9.78</b>	<b>9.95</b>	<b>8.12</b>	<b>8.63</b>
<b>C16:1</b>	0.88	0.10	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	0.04	0.00	0.04	0.00	0.05	0.06
<b>C18:0</b>	2.77	40.17	54.25	53.87	53.61	53.46	53.32	53.32	53.15	52.43	52.20	51.23	50.52	50.62
<b>C18:1</b>	58.07	20.15	23.52	22.12	22.29	23.48	24.02	22.73	23.45	23.94	23.21	26.07	28.00	28.29
<b>C18:2</b>	6.25	5.25	6.75	6.05	6.42	6.25	6.56	6.19	5.96	6.88	6.28	6.31	6.59	6.31
<b>C18:3<math>\alpha</math></b>	0.50	0.88	0.79	0.88	0.78	0.79	0.79	0.85	0.82	0.88	0.78	0.78	0.78	0.83
<b>C20:0</b>	0.21	1.86	3.11	2.81	3.01	2.91	3.02	2.86	2.77	3.21	2.74	2.80	2.87	2.80
<b>C20:1</b>	0.02	0.07	0.19	0.21	0.34	0.27	0.28	0.12	0.11	0.41	0.14	0.39	0.28	0.26
<b>C22:0</b>	0.05	0.26	0.41	0.34	0.40	0.37	0.37	0.36	0.35	0.42	0.36	0.37	0.36	0.37
<b>C24:0</b>	0.04	0.27	0.49	0.39	0.42	0.41	0.45	0.38	0.36	0.46	0.39	0.37	0.41	0.41
<b>Suma C18</b>	67.76	66.24	85.31	82.92	83.01	83.98	84.60	83.09	83.38	84.11	84.47	84.30	85.89	85.45
<b>Saturados</b>	33.07	73.92	68.34	70.63	70.11	69.12	68.37	69.72	69.33	67.93	67.30	<b>66.54</b>	<b>64.01</b>	<b>64.03</b>
<b>Insaturado</b>	65.71	26.23	<b>31.29</b>	<b>29.26</b>	<b>29.74</b>	<b>30.79</b>	<b>31.65</b>	<b>29.93</b>	<b>30.38</b>	<b>32.09</b>	<b>32.45</b>	<b>33.46</b>	<b>35.70</b>	<b>35.75</b>

**[0401]** En la Tabla 42, niveles de estearato (C18: 0) mayores que el nivel de tipo salvaje se destacan con negrita. Niveles de palmitato (C16: 0) más bajos que S4495 o S1920 se destacan con negrita. Para tres cepas la proporción de saturados a los ácidos grasos insaturados es  $\leq 2: 1$ ; éstos se resaltan con texto en cursiva negrita.

**[0402]** Líneas estables se aislaron de los transformantes primarios que se muestran en la Tabla 42. Los perfiles de ácidos grasos y los títulos de lípidos de cultivos en matraces de agitación se presentan en la Tabla 43, a continuación. Las cepas acumularon hasta un 55% de C18: 0, con un precio tan bajo como 7% de C16: 0, con títulos de lípidos comparables al padre S4495. Las relaciones saturados:insaturados se redujeron sustancialmente en comparación con S4495. Las cepas S5665 y S5675 se seleccionaron para evaluación en fermentaciones de alta densidad 3-L.

Tabla 43. Ensayos de frasco de agitación de cepas derivadas de D1653, expresando KASII, impulsadas por el promotor PmSAD2-2, orientadas al locus 6S.

Primario		D1653-68				D1653-98		D1653-10A		D1653-72		D1653-99		
Cepa		S1920	S4495	S5664	S5665	S5669	S5670	S5671	S5672	S5673	S5674	S5675	S5677	
Área % de ácido graso	C10:0	0.02	0.04	0.03	0.09	0.12	0.06	0.06	0.08	0.09	0.12	0.12	0.12	
	C12:0	0.04	0.09	0.28	0.29	0.35	0.20	0.20	0.23	0.26	0.32	0.32	0.33	
	C14:0	1.42	1.12	1.81	1.66	1.73	1.75	1.72	1.90	1.61	1.98	1.43	1.98	
	C16:0	25.59	28.56	9.39	8.61	8.44	9.98	10.11	8.25	8.95	6.81	7.21	6.63	
	C16:1	1.05	0.10	0.06	0.05	0.06	0.06	0.06	0.04	0.04	0.03	0.03	0.03	
	C18:0	2.60	48.13	47.60	52.47	55.12	50.25	49.73	54.56	54.01	52.96	53.68	52.12	
	C18:1	62.08	29.74	27.78	23.93	21.31	25.37	25.70	22.86	22.87	24.37	23.99	25.17	
	C18:2	6.16	5.83	7.98	7.52	7.72	7.55	7.64	7.20	7.24	8.11	7.83	8.04	
	C18:3α	0.40	0.89	1.21	1.22	1.49	1.17	1.07	1.20	1.29	1.28	1.24	1.31	
	C20:0	0.18	1.82	2.62	2.93	2.75	2.65	2.66	2.97	2.72	3.43	3.10	3.59	
	C20:1	0.04	0.13	0.37	0.36	0.35	0.34	0.34	0.35	0.34	0.48	0.41	0.47	
	C20:1	0.07	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09	
	C20:1	0.15	0.08	0.11	0.09	0.11	0.16	0.10	0.09	0.10	0.12	0.10	0.12	
	C22:0	0.02	0.20	0.28	0.30	0.24	0.29	0.28	0.30	0.27	0.32	0.29	0.35	
	C24:0	0.00	0.03	0.16	0.29	0.00	0.03	0.16	0.16	0.02	0.05	0.04	0.07	
Suma C18	71.29	67.58	84.57	85.13	85.63	84.34	84.13	85.81	85.40	86.71	86.73	86.63		
Saturados	29.86	71.97	62.22	66.63	68.74	65.20	64.90	68.06	67.90	65.37	66.17	64.57		
Insaturado	69.91	27.76	37.90	33.15	31.07	34.57	34.89	31.75	31.87	34.37	33.59	35.13		
% título lipídica padre		100.0	56.2	43.4	42.8	27.5	44.1	47.4	59.0	47.6	43.2	48.4	44.4	

[0403] En la Tabla 43, S4495 es la cepa parental; S1920 es la cepa de base de tipo salvaje. Estearato de (C18: 0) los niveles de al menos dos veces mayor que en la cepa de tipo salvaje se destacan en negrita. Niveles de palmitato que son menos que en S1920 y S4495 se resaltan en negrita. Negrita y cursiva indican que la relación saturados:insaturados es  $\leq 2$ : 1.

[0404] Los perfiles de ácidos grasos y las métricas de rendimiento de las cepas de S5665 y S5675 se detallan en la Tabla 44, a continuación. El perfil de ácidos grasos de la cepa madre S4495, que se cultiva en las mismas condiciones de fermentación, se presenta para comparación. Las cepas que sobreexpresan KASII se acumulan alrededor del 11% más de C18: 0 de la matriz S4495. C16: 0 se reduce a 7-9%, y los niveles de ácidos grasos insaturados aumentan en 4-5%. Los títulos de lípidos de S5665 y S5675 eran comparables a S4495, indicando que sobre-expresión de KASII no tenían efectos nocivos sobre la producción de lípidos.

**[0508]** Tabla 44. Perfiles de ácido graso de punto final de biomasa de fermentaciones S4495, S5665 y S5775.

Cepa	S4495	S5665	S5675
Fermentación	120580F1	130097F3	130098F4
pH	5	5	5
temp (°C)	32	32	32
[N] (mM)	300	300	300
N/P	1.4	1.4	1.4
DO%	30	30	30
Azucar	570	570	570
Fe (µM)	557.5	557.5	557.5
C14:0	1.27	1.50	1.35
C16:0	28.35	8.88	7.33
C16:1	0.06	0.02	0.03
C18:0	43.67	56.88	57.24
C18:1	17.63	21.57	21.66
C18:2	5.58	6.06	6.94
C18:3α	0.25	0.29	0.22
C20:0	2.11	3.28	3.46
C22:0	0.31	0.40	0.40
C24:0	0.31	0.37	0.40
Suma C18	67.13	84.80	86.06
Saturados	76.02	71.31	70.18
Insaturado	23.52	27.94	28.85
Lípido total (g/L)	475	529	418

**[0405]** Las fermentaciones se cultivaron durante 6 días utilizando un proceso de alimentación por lotes. El perfil de ácidos grasos S4495 de la fermentación 120580F1 se presenta en la Tabla 41, y se muestra de nuevo en la Tabla 44 para la comparación con S5665 y S5675. Todas las fermentaciones se realizaron a 32°C, pH 5, con un nitrógeno/fósforo (N/P) de 1,4, 30% de oxígeno disuelto (OD), nitrógeno 300 mM [N], y 557,5 µM hierro. La fuente de azúcar era de 70% de sacarosa (S70). Niveles de estearato de (C18: 0) más altos que en la cepa de tipo salvaje se indican con negrita. Niveles de palmitato (C16: 0) que son menos que en el de tipo salvaje se destacan en negrita.

**[0406]** Aceites de escala de laboratorio se prepararon a partir de biomasa derivada de los matraces de agitación y fermentaciones descritas anteriormente. Las composiciones de TAG de estos aceites se determinaron por LC/MS. SOS son las principales especies de TAG en tanto S5665 como S5675, que van desde 33-35% en la biomasa a partir de matraces de agitación, y alcanzando el 37% en la biomasa de fermentación de alta densidad. Los principales TAG que contiene palmitato se reducen sustancialmente, y los niveles de trisaturado son menos de la mitad de los observados en los aceites S4495. Estos resultados demuestran que sobre-expresión KASII en un fondo de alto estearato mejora significativamente la acumulación de SOS, y reduce la acumulación de TAG trisaturadas.

**[0407] Construcciones utilizadas para ruptura *FATA-1*, sobre-expresión *KASII* y *FAD2* iARN en S1920:** Una construcción de ADN, pSZ2419, se hizo para interrumpir simultáneamente alelo *FATA-1*, sobre-expresan *P. moriformis* *KASII* y expresan una construcción en horquilla *FAD2* en S1920. Una versión de *S. cerevisiae* gen *suc2*, que codifica para la invertasa de sacarosa, que fue codones optimizados para la expresión en *P. moriformis*, se utilizó como un marcador seleccionable para la transformación. La secuencia del ADN transformante se proporciona inmediatamente debajo. Sitios de restricción relevantes se indican en minúsculas, negrita, y son de 5'-3' BspQI, KpnI, AscI, MfeI, BamHI, AvrII, EcoRV, EcoRI, SpeI, AscI, ClaI, BglII, AflIII, HindIII, SacI, SpeI, y XhoI, respectivamente. Sitios BspQI delimitan el ADN transformante 5' y 3'. Secuencias subrayadas en los extremos 5' y 3' flancos de la construcción representan ADN genómico de *P. moriformis* que permiten la integración dirigida del ADN de transformación a través de recombinación homóloga en el *FATA-1* lugar. Procediendo en la dirección 5' a 3', *C. reinhardtii* promotor *tub2* que dirige la expresión de *S. cerevisiae* gen *suc2* (que codifica actividad de hidrólisis de la sacarosa, permitiendo de este modo que la cepa crezca en sacarosa) se indica mediante letras minúsculas, texto en caja. El iniciador ATG y el terminador TGA para *suc2* se indican mediante cursiva y en mayúsculas, mientras que la región de codificación está indicada con letra cursiva en minúsculas. El gen de nitrato reductasa UTR 3' de *C. vulgaris* (NR) se indica por pequeñas

mayúsculas, seguido por una región espaciadora indicada por texto en minúsculas. *P. moriformis* *AMT3* promotor, indicado por texto en caja en minúsculas, conduce la expresión del gen *P. moriformis* *KASII*. La región que codifica el péptido dirigido a plastidios de *Chlorella protothecoides* *SAD1* se indica mediante cursiva y en mayúsculas. La secuencia que codifica el polipéptido *KASII* maduro *P. moriformis* se indica con subrayado, cursiva, mayúscula y en negrita, mientras que una secuencia de epítipo de codificación 3xFLAG está en negrita y cursiva. Un segundo *NR 3'* UTR *C. vulgaris* se indica por pequeñas mayúsculas. Una segunda secuencia promotora de *tub2* *C. reinhardtii*, indicada por texto en caja en minúsculas, conduce la expresión de una secuencia de horquilla *FAD2* *P. moriformis*. Las cadenas con sentido y antisentido se indican con mayúsculas, negrita y cursiva, y están separadas por *FAD2* intrón y las primeras 10 bases del segundo exón *FAD2* (cursiva y en mayúsculas). Un tercero *NR 3'* UTR *C. vulgaris* se indica por pequeñas mayúsculas, seguido de una segunda región espaciadora que se indica mediante texto en minúsculas.

**[0408]** Secuencia de nucleótidos del ADN transformante de pSZ2419:

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



**gctcttc**ggagtgactgtgccactgagttcgactggtagctgaatggagtcgctgctccactaaacgaattgtcagcaccgccagcc  
 ggcggaggacccgagtcatagcgagggtagtagcgcgccatggcaccgaccagcctgcttgccagtactggcgtctcttcgcttct  
 5 ctgtggtcctctgcgcgtccagcgcgctgttccggtggatcatgcggtccgtggcgacccgcagcgccgctgccatgcagc  
 gccgctgcttccgaacagtggcggtcagggccgcacccgcggtagccgtccgtccggaacccgcccaagagtttgggagcagctt  
 10 gagccctgcaagatggcggaggacaagcgcatcttctggaggagcaccgggtgcgtggaggtccggggctgaccggccgtcgcat  
 tcaacgtaataatcgcatgatgatcagaggacacgaagtcttgggtggcggtggccagaaactgtccattgcaaggcataggg  
 atgcttctctcacctctcatttctcatttctgaatccctccctgctcactcttctcctccttcccgttcacgcagcattcggggtacc  
 15 ttttcttgcgctatgacacttccagcaaaaggtagggcggtgcgagacggcttccggcgctgcatgcaacaccgatgatgcttc  
 gacccccgaagctccttcggggctgcatggcgctccgatgcgctccagggcgagcgctgttaaatagccaggccccgattgc  
 20 aaagacattatagcgagctaccaaagccatattcaaacacctagatcactaccacttctacacaggccactcgagcttgtgatcgca  
 ctccgctaagggggcgcttctcctcttctgttcagtcacaacccgcaaac**ggcgcgcc**ATGctgtgcaggccttctgttctgtct  
 25 ggccggcttcgccccaagatcagcgctccatgacgaacgagacgtccgaccccccctggtgcacttcaccccaacaagg  
 gctggatgaacgaccccaacggcctgtgtgtagcagagaaggacgccaagtggcacctgtacttccagtacaacccgaacg  
 acaccgtctgggggacgcccttgttctggggccacgccacgtccgacgacctgaccaactgggaggaccagcccatcgccatc  
 30 gccccgaagcgcaacgactccggcgcttctccggtccatggtggtggactacaacaacacctccggcttctcaacgacacc  
 atcgaccgcgacgctgcgtggccatctggacctacaacaccccgagtcaggaggagcagtagatctctacagcctgga  
 cggcggtacaccttcaccgagtagcagaagaaccccgctgtggcgccaactccaccagttccgcgacccgaaggcttctg  
 35 gtacgagccctccagaagtggatcatgaccgcgccaagtccaggactacaagatcgagatctactcctccgacgacctga  
 agtcttgaagctggagtcgcgttcgccaacgagggttctcggtaccagtagagtgccccggcctgatcgaggcccc  
 40 accgagcaggacccagcaagtctactgggtgatgttcctccatcaaccccgcgccccggcgccggtccttcaaccag  
 tacttctgctggcagcttcaacggcaccacttcgaggccttcgacaaccagtcgccgctgggtggacttcggcaaggactactac  
 45 gccctgcagaccttctcaacaccgacccgacctacgggagcgccctgggcatcgctgggctccaactgggagtactccgcc  
 ttcgtgcccacaacccctggcgctcctccatgtccctcgtgcgcaagtctccctcaacaccgagtagcaggccaacccggaga  
 cggagctgatcaacctgaaggccgagccgatcctgaacatcagcaacgcccgtggagccggttcgccaccaacaccac  
 50 gttgacgaaggccaacagctacaacgtcgacctgtccaacagcaccggcacctggagttcgagctggtgtacgccgtcaac  
 accaccagacgatctccaagtcgtgttcgcgacctctcctctggttaagggcctggaggacccgaggagtacctccgc  
 55 atgggcttcgaggtgtccgctcctcttctctggaccgcggaacagcaaggtgaagttcgtgaaggagaacccctacttc  
 accaaccgatgagcgtgaacaaccagcccttaagagcgagaacgacctgtctactacaaggtgtacggcttctgtggacc  
 agaacatcctggagctgtacttaacgacggcgacgtcgtgtccaccaacacctacttcatgaccacgggaacgcctgggc  
 60 tccgtgaacatgacgacgggggtggacaacctgttctacatcgacaagttccaggtgcgcgaggtcaag**TGAcaattg**GCA  
 GCAGCAGCTCGGATAGTATCGACACACTCTGGACGCTGGTCGTGTGATGGACTGTTGCCGCCACACT  
 65

TGCTGCCTTGACCTGTGAATATCCCTGCCGCTTTTATCAAACAGCCTCAGTGTGTTTGATCTTGTGTGT  
 5 ACGCGCTTTTGCAGAGTTGCTAGCTGCTTGTGCTATTTGCGAATACCACCCCCAGCATCCCCTTCCCTC  
 GTTTCATATCGCTTGCATCCCAACCGCAACTTATCTACGCTGTCCTGCTATCCCTCAGCGCTGCTCCTG  
 CTCCTGCTCACTGCCCCCTCGCACAGCCTTGTTTGGGCTCCGCCTGTATTCTCCTGGTACTGCAACCT  
 10 GTAAACCAGCACTGCAATGCTGATGCACGGGAAGTAGTGGGATGGGAACACAAATGG**Aggatcccgc**  
 gtctcgaacagagcgcgcagaggaacgctgaaggctcgcctctgtcgacctcagcgcggcatacaccacaataaccacctgacg  
 15 aatgcgcttggttcttctgctcattagcgaagcgtccggttcacacacgtgccacgttggcgaggtggcaggtgacaatgatcggtgg  
 agctgatggtcgaaacgttcacag**cctagggatatcgaattc**ggccgacaggacgcgcgtcaaaggtgctggtcgtgatgccctg  
 gccggcaggtcgttctgctgctggttagtgattccgaacctgattttggcgtcttattttggcgtggcaaacgctggcgccgcga  
 20 gccggggccggcggcgatgcggtgccccacggctgccggaatccaagggaggcaagagcgcccggtcagttgaagggctttacgc  
 gcaaggtacagccgctcctgcaaggctgcgtggtggaattggacgtgcaggtcctgctgaagttctccaccgcctcaccagcgga  
 25 caaagcaccggtgtatcaggtccgtgtcatccactctaagaactcgactacgacctactgatggcctagattcttcatcaaaaac  
 gcctgagacacttggccaggattgaaactccctgaagggaccaccaggggcccctgagttgttcttccccctggcgagctgccag  
 ccaggctgtacctgtgatcgaggctggcgggaaaataggcttcgtgtgctcaggtcatgggaggtgcaggacagctcatgaaacgc  
 30 caacaatcgacaattcatgtcaagctaatacagctatttcttccacgagctgtaattgtccaaaattctggtctaccgggggtgat  
 ccttctgttacgggcccttcctcaaccctaggtatgcgcgcatgcggtgcgcgcaactcgcgcgagggccgaggggttgggacg  
 35 ggccgtcccgaatgcagttgcaccgggatgcgtggcacctttttgcgataatttatgcaatggactgctctgcaaaattctggctct  
 gtcgccaaccctaggtacagcggtcgtaggatttcgtaatcattcgtcctgatggggagctaccgactaccctaataatcagcccgact  
 40 gcctgacgccagcgtccacttttgtgcacacattccattcgtgcccaagacatttcattgtggtgcgaagcgtccccagttacgtcad  
 ctgtttcccgacctccttactgttctgtcgacagagcgggcccacaggccggtcgcagcc**actagt**ATGGCCACCGCATCCAC  
 45 TTTCTCGGCGTTCAATGCCCCGCTGCGGCGACCTGCGTCGCTCGGCGGGCTCCGGGCCCCGGCGCCCA  
 GCGAGGCCCTCCCCGTGCGCG**ggcgcgccGCCGCCGCCGCCGACGCCAACCCCGCCCCGCCCGAGCG**  
**CCGCGTGGTGATACCGGCCAGGGCGTGGTGACCTCCCTGGGCCAGACCATCGAGCAGTTCTACTC**  
 50 **CTCCCTGCTGGAGGGCGTGTCCGGCATCTCCAGATCCAGAAGTTCGACACCACCGGCTACACCACC**  
**ACCATCGCCGGCGAGATCAAGTCCCTGCAGCTGGACCCCTACGTGCCAAGCGCTGGGCCAAGCGC**  
 55 **GTGGACGACGTGATCAAGTACGTGTACATCGCCGGCAAGCAGGCCCTGGAGTCCGCCGGCCTGCC**  
**CATCGAGGCCGCCGGCCTGGCCGGCGCCGGCCTGGACCCGCCCTGTGCGGCGTGCTGATCGGCAC**  
**CGCCATGGCCGGCATGACCTCCTTCGCCGCCGGCGTGGAGGCCCTGACCCGCGGCGGCGTGCGCAA**  
 60 **GATGAACCCCTTCTGCATCCCCTTCTCCATCTCCAACATGGGCGGCGCCATGCTGGCCATGGACATC**  
**GGCTTCATGGGCCCCAACTACTCCATCTCCACCGCCTGCGCCACCGGCAACTACTGCATCCTGGGCG**  
 65 **CCGCCGACCACATCCGCCGCGGCGACGCCAACGTGATGCTGGCCGGCGGCGCCGACGCCGCCATCA**

TCCCCTCCGGCATCGGCGGCTTCATCGCCTGCAAGGCCCTGTCCAAGCGCAACGACGAGCCCCGAGC  
 5 GCGCCTCCCGCCCCCTGGGACGCCGACCGCGACGGCTTCGTGATGGGCGAGGGCGCCGGCGTGCTG  
 GTGCTGGAGGAGCTGGAGCACGCCAAGCGCCGCGGCCACCATCCTGGCCGAGCTGGTGGGCG  
 10 GCGCCGCCACCTCCGACGCCCACCACATGACCGAGCCCCAGCCCCAGGGCCGCGGCGTGCGCCTGT  
 GCCTGGAGCGCGCCCTGGAGCGCGCCCGCCTGGCCCCGAGCGCGTGGGCTACGTGAACGCCCAC  
 GGCACCTCCACCCCCGCGGCGACGTGGCCGAGTACCGCGCCATCCGCGCCGTGATCCCCAGGACT  
 15 CCCTGCGCATCAACTCCACCAAGTCCATGATCGGCCACCTGCTGGGCGGGCGCCGGCGCCGTGGAGG  
 CCGTGGCCGCCATCCAGGCCCTGCGCACCGGTGGTGCACCCCAACCTGAACCTGGAGAACCCCG  
 CCCCCGGCGTGGAACCCGTGGTGTGGTGGGCCCCCGCAAGGAGCGCGCCGAGGACCTGGACGTG  
 20 GTGCTGTCCAACCTCCTTCGGCTTCGGCGGCCACAACCTCCTGCGTGATCTTCGCAAGTACGACGAGA  
 TGGACTACAAGGACCACGACGGCGACTACAAGGACCACGACATCGACTACAAGGACGACGACGAC  
 25 AAGTGAatcgatagatctcttaagGCAGCAGCAGCTCGGATAGTATCGACACACTCTGGACGCTGGTCTGT  
 GTGATGGACTGTTGCCGCCACACTTGCTGCCTTGACCTGTGAATATCCCTGCCGCTTTTATCAAACAG  
 CCTCAGTGTGTTTGATCTTGTGTGTACGCGCTTTTGCGAGTTGCTAGCTGCTTGTGCTATTTGCGAAT  
 30 ACCACCCCCAGCATCCCCTTCCCTCGTTTCATATCGCTTGCATCCCAACCGCAACTTATCTACGCTGTC  
 CTGCTATCCCTCAGCGCTGCTCCTGCTCCTGCTCACTGCCCCTCGCACAGCCTTGTTTGGGCTCCGC  
 CTGTATTCTCCTGGTACTGCAACCTGTAAACCAGCACTGCAATGCTGATGCACGGGAAGTAGTGGGA  
 35 TGGGAACACAAATGGAaagcttaattaagagctccttcttgcgctatgacactccagcaaaaggtagggcgggctgcga  
 gagcgcttccggcgctgcatgcaacaccgatgatgcttcgacccccgaagctccttcggggctgcatgggcgctccgatgccgt  
 40 ccagggcgagcgctgtttaaatagccaggccccgattgcaaagacattatagcgagctaccaaagccatattcaaacacctagat  
 cactaccacttctacacaggccactcgagcttgtgatcgactccgctaagggggcgcccttctccttctgttcagtcaaacccgc  
 45 aaacactagtATGGCTATCAAGACGAACAGGCAGCCTGTGGAGAAGCCTCCGTTACGATCGGGACG  
 CTGCGCAAGGCCATCCCCGCGCACTGTTTCGAGCGCTCGGCGCTTCGTAGCAGCATGTACCTGGCCT  
 50 TTGACATCGCGGTATGTCCCTGCTCTACGTCGCGTCGACGTACATCGACCTGCACCGGTGCCTAC  
 GTGGGTCAAGTACGGCATCATGTGGCCGCTCTACTGGTCTTCCAGGTGTGTTTGAGGGTTTTGGTT  
 GCCCGTATTGAGGTCCTGGTGGCGCGCATGGAGGAGAAGGCGCCTGTCCCGCTGACCCCCCGGCT  
 55 ACCCTCCCGGCACCTTCCAGGGCGCGTACGGGAAGAACCAGTAGAGCGGCCACATGATGCCGTACT  
 TGACCCACGTAGGCACCGGTGCAGGGTCGATGTACGTCGACGCGACGTAGAGCAGGGACATGACC  
 60 GCGATGTCAAAGGCCAGGTACATGCTGCTACGAAGCGCCGAGCGCTCGAAACAGTGCGCGGGGA  
 TGGCCTTGCGCAGCGTCCCGATCGTGAACGGAGGCTTCTCCACAGGCTGCCTGTTGCTTGTATAGC  
 65 CATctcgagGCAGCAGCAGCTCGGATAGTATCGACACACTCTGGACGCTGGTCTGTGATGGACTGTT

GCCGCCACACTTGCTGCCTTGACCTGTGAATATCCCTGCCGCTTTTATCAAACAGCCTCAGTGTGTTT  
 GATCTTGTGTGTACGCGCTTTTTCGAGTTGCTAGCTGCTTGTGCTATTTGCGAATACCACCCCCAGCA  
 TCCCCTTCCTCGTTTCATATCGCTTGCATCCCAACCGCAACTTATCTACGCTGTCCTGCTATCCCTCAG  
 CGCTGCTCCTGCTCCTGCTCACTGCCCCTCGCACAGCCTTGGTTTGGGCTCCGCCTGTATTCTCCTGGT  
 ACTGCAACCTGTAAACCAGCACTGCAATGCTGATGCACGGGAAGTAGTGGGATGGGAACACAAATG  
 GAaagtgattgtttccagaaggagttgtccttgagccttcattctcagcctcgataacctccaaagcgctctaattgtggagg  
 gggttcgaagacagggtggttgctggatggggaacgctggtcgcgggattcgatcctgctgcttatctcctggaagcacac  
 ccacgactctgaagaagaaaacgtgcacacacacaaccaaccggccgaatatttgcttcctatcccgggtccaagagagactgc  
 gatgccccctcaatcagcatcctcctcctgccgcttcaatcttccctgcttgctgcgcccgcggtgcgccgtgccccccagtc  
 agtcactcctgcacaggcccttgctgcgagtgctcctgtacccttaccgctccttcattctgcgaggccccctattgaatgtattcg  
 ttgctgtgtggccaagcgggctgctggcgccgcccgtcgggcagtgctcggcgacttggcggaagccgattgttcttctgtaag  
 ccacgcgcttgctgcttgggaagagaaggggggggtactgaatggatgaggaggagaaggaggggtattggtattatctgagtt  
 gggtgaagagc (SEQ ID NO:96)

**[0409] Identificación y análisis de knockout *FATA-1*, sobre-expresión de *KASII* y cepas iARN *FAD2*:** Constructo D1358, derivado de pSZ2419, se transformó en S1920 como se describió anteriormente. Los transformantes primarios fueron purificados clonalmente y cultivados bajo condiciones de producción de lípidos estándar a pH 5. Los perfiles de ácidos grasos resultantes de clones representativos derivados de transformación de S1920 con D1358 se resumen en la Tabla 45, a continuación. *P. moriformis* AMT3 promotor está reprimido a pH 5 por lo que los fenotipos observados no reflejan la sobre expresión de *P. moriformis* *KASII*. Sin embargo, se observó que múltiples cepas habían reducido sustancialmente los niveles de C16: 0 y 10-15% de aumento en C18: 1, lo que sugiere que la construcción había interrumpido el gen diana *FATA-1*, aumentando la cantidad de palmitoil-ACP disponible para la extensión por *KASII* endógeno. Una línea, D1358-13, se seleccionó para su posterior análisis. D1358-13 acumulada ~17% de C16: 0, ~75% de C18: 1 y menos del 2% de C18: 2, lo que indica que habíamos integrado con éxito en *FATA-1* y la actividad regulada a la baja de la *FAD2*  $\Delta^{12}$ -desaturasa en esta cepa.

Tabla 45. Perfiles de ácido graso de transformantes primarios D1358 [pSZ2419], en comparación con la cepa parental de tipo silvestre, S1920.

Cepa	S1920	D1358-13	D1358-19	D1358-11	D1358-9	D1358-30	D1358-28	D1358-6	D1358-8	D1358-10	D1358-3
Área % de ácido graso	C12:0	0.05	0.08	0.06	0.08	0.06	0.07	0.07	0.09	0.07	0.10
	C14:0	1.32	0.79	0.93	0.85	0.87	0.84	0.91	0.86	0.89	0.60
	C16:0	26.66	17.41	18.84	20.03	16.27	18.4	19.1	18.18	15.6	11.24
	C16:1	0.84	0.74	0.79	0.97	0.50	0.77	1.17	0.75	0.56	0.97
	C18:0	3.10	2.67	2.97	2.36	3.20	2.67	2.10	2.82	3.22	2.30
	C18:1	59.07	74.78	69.54	68.78	71.48	69.55	69.02	68.93	70.44	69.54
	C18:2	7.39	1.97	5.47	5.61	6.22	6.31	6.42	6.8	7.68	8.51
	C18:3a	0.55	0.23	0.59	0.51	0.26	0.39	0.46	0.38	0.24	0.24
	C20:0	0.24	0.22	0.20	0.13	0.32	0.20	0.03	0.20	0.33	0.22
	C20:1	0.11	0.40	0.29	0.37	0.23	0.33	0.33	0.39	0.36	0.27
	C22:0	0.11	0.09	0.08	0.07	0.09	0.08	0.08	0.08	0.09	0.11
Suma C18		79.11	79.85	78.57	77.26	81.16	78.92	78.00	78.93	81.58	86.32
Saturados		31.48	21.48	22.98	23.52	20.81	22.26	22.39	22.23	20.20	21.93
Insaturado		67.96	78.12	76.68	76.24	78.79	77.35	77.4	77.25	79.28	84.99

[0410] En la Tabla 45, niveles de oleato (C18: 1) mayores que el nivel de tipo salvaje se destacan con negrita. Niveles de palmitato (C16: 0) menores que los de tipo salvaje se destacan con negrita. Los niveles de linoleato (C18: 2) reducidos en 1% o más en comparación con el padre S1920 se destacan con negrita.

[0411] Los perfiles de ácidos grasos de cepas derivadas de D1358-13 transformante fueron determinados a ser estables después de más de 60 generaciones de crecimiento en ausencia de selección (crecimiento en sacarosa). A continuación, se evaluó el comportamiento de las cepas seleccionadas en ensayos en matraz de agitación, y los perfiles de ácidos grasos y los títulos de lípidos se presentan en la Tabla 46, a continuación. experimentos en matraces se llevaron a cabo a pH 7, lo que permite la activación del promotor de expresión *PmAMT3* del transgén KASII. La combinación de sobre-expresión *KASII* y knockout *FATA-1* conduce a reducciones adicionales en los niveles de palmitato y oleato de acumulación reforzada en comparación con los fenotipos observados a pH 5 (Tabla 45). Con más de 82% de C18: 1, menos de 11% de C16: 0, a menos de 2% de C18: 2 y ~83% de la titulación de los lípidos de tipo salvaje, S5003 se determinó que era la cepa más adecuada de este conjunto para servir como una cepa huésped para las modificaciones posteriores para elevar los niveles de estearato. El análisis de transferencia de ADN mostró que S5003 tiene una simple inserción de constructo D1358 [pSZ2419] en el locus *FATA-1*.

Tabla 46. Perfiles de ácido graso y títulos lipídicos de knockout *FATA-1*, sobreexpresión de *KASII*, líneas de iARN *FAD2* derivadas de transformantes primarios D1358-13, en comparación a la cepa padre de tipo silvestre, S1920.

Primario		T389-D1358-13													
Cepa		S1920	S5003	S5004	S5005	S5006	S5007	S5008	S5009	S5010	S5011	S5012	S5013	S5101	S5102
Área % de ácido graso	C12:0	0.05	0.06	0.09	0.11	0.19	0.11	0.14	0.10	0.12	0.08	0.11	0.09	0.20	0.20
	C14:0	1.34	0.96	0.98	1.03	1.04	0.96	1.02	0.98	1.03	0.98	1.01	1.00	1.03	1.02
	C16:0	29.69	10.72	10.47	8.90	6.99	9.53	9.27	10.13	8.99	10.76	9.58	10.00	6.64	6.38
	C16:1	0.88	0.42	0.39	0.51	0.29	0.39	0.37	0.41	0.52	0.40	0.35	0.35	0.27	0.27
	C18:0	2.78	2.92	3.00	3.16	3.71	2.88	2.85	2.91	3.21	3.08	3.10	3.20	1.77	2.71
	C18:1	58.45	82.08	82.24	83.66	85.49	83.28	83.38	82.57	83.51	82.12	83.10	82.63	85.88	86.13
	C18:2	5.23	1.89	1.88	1.80	2.01	1.88	1.89	1.89	1.77	1.73	1.75	1.76	1.94	1.96
	C18:3a	0.42	0.23	0.23	0.25	0.35	0.27	0.29	0.27	0.25	0.22	0.24	0.23	0.34	0.36
	C20:0	0.17	0.15	0.16	0.17	0.15	0.15	0.16	0.16	0.17	0.14	0.16	0.16	0.15	0.15
	C20:1	0.05	0.23	0.24	0.27	0.36	0.28	0.29	0.26	0.27	0.21	0.25	0.24	0.38	0.39
Suma C18		67.48	87.12	87.35	88.87	90.56	88.26	88.41	87.64	88.74	87.10	88.19	87.82	90.93	91.16
Saturados		34.03	14.83	14.70	13.37	11.08	13.63	13.44	14.28	13.52	14.99	13.96	14.45	10.78	10.40
Insaturado		65.63	84.85	84.98	85.29	88.50	86.05	86.22	85.40	86.12	84.68	85.89	85.21	88.81	89.11
% título lipídica padre		100.0	82.8	81.1	72.8	54.4	68.3	63.7	70.6	72.2	106.9	76.5	77.5	56.7	54.6

[0412] En la Tabla 46, niveles de estearato (C18: 1) mayores que el nivel de tipo salvaje se destacan con negrita. Niveles de palmitato (C16: 0) inferiores a los de tipo salvaje se destacan con negrita. Niveles de linoleato (C18: 2) que son inferiores a los de tipo salvaje se indican con el texto en negrita.

[0413] Construcciones utilizadas para knockout *SAD2*/iARN en S5003: Dos construcciones de ADN, pSZ2283 y pSZ2697, se hicieron para interrumpir simultáneamente el alelo *SAD2-1* y expresar una construcción en horquilla *SAD2* en S5003. En cada construcción, gen *neoR* de transposón *Tn5*, que confiere resistencia a los antibióticos aminoglucósidos, se utilizó como un marcador seleccionable para la transformación. La secuencia del ADN transformante derivado de pSZ2283 se proporciona inmediatamente debajo. Sitios de restricción relevantes se indican en minúsculas, negrita, y son de 5'-3' BspQI, KpnI, XbaI, MfeI, BamHI, AvrII, EcoRV, EcoRI, SpeI, BamHI, HindIII, y SacI, respectivamente. sitios BspQI delimitan 5' y 3' del ADN transformante. Secuencias subrayadas en los extremos 5' y 3' flancos de la construcción representan ADN genómico de *P. moriformis* permiten la integración dirigida del ADN de transformación a través de recombinación homóloga en el locus *SAD2-1*. Procediendo en la dirección 5' a 3', *Chlamydomonas reinhardtii* *tub2* promotor que dirige la expresión de *neoR* (que codifica la actividad de la fosfotransferasa de aminoglucósido, permitiendo de este modo que la cepa se cultive en G418) está indicado por letras minúsculas, texto en caja. El iniciador ATG y el terminador TGA para *neoR* se indican mediante cursiva y en mayúsculas, mientras que la región de codificación está indicado con letra cursiva en minúsculas. La 3' UTR del gen NR de *C. vulgaris* está indicada por pequeñas mayúsculas, seguido por una región espaciadora indicada por texto en minúsculas. Una segunda secuencia promotora *tub2 C. reinhardtii*, indicada por texto en caja en minúsculas, conduce la expresión de la secuencia de horquilla C *SAD2*. Las cadenas con sentido y antisentido se indican con mayúsculas, negrita y cursiva, y están separadas por *P. moriformis* *FAD2* intrón y las primeras 10 bases del segundo exón *FAD2* (cursiva y en mayúsculas). Un segundo NR 3' UTR *C. vulgaris* se indica por pequeñas mayúsculas.

[0414] Secuencia de nucleótidos del ADN transformante de pSZ2283:

**gctcttc**gggtcgccgctgcctcgctccctggtggtgcgcggtcgccagcgaggccccgctgggcttcgccctcggtgca  
 5 ggcgccctccccggtggtctactccaagctggacaagcagcaccgctgacgcccagcgctggagctggtgcagagcatggggc  
 agtttgcggaggagaggggtgctgccgtgctgcacccgctggacaagctgtggcagccgaggacttttgcgcgaccccgagtcgc  
 ccgacttcgaggatcaggtggcggagctgcgcgcgccgaaggacctgcccagcagtagtactttgtggtgctggtgggggacatg  
 10 atcacggaggagggcgctgccgacctacatggccatgctcaacacgctggacggcgctgcgcgacgacacgggcgcgccgaccacc  
 cgtgggcgctggtgacgcccagtggtggcgaggagaaccggcacggcgacctgctgaacaagtactgctggctgacggggc  
 15 gctcaacatgcgggcccgtggaggtgacctcaacaacctgatcaagagcgccatgaacccgcagacggacaacaaccttattt  
 ggggttcgtctacacctcttcaggagcgccaccaagt**aggtacc**cttcttgcgctatgacacttcagcaaaaggtaggggc  
 ggctgcgagacggcttcccggcgctgcatgcaacaccgatgatgcttcgacccccgaagctccttcggggctgcatggcgctccg  
 20 atgccgctccaggcgagcgctgttaaataagccaggccccgattgcaaagacattatagcgagctaccaagccatattcaaac  
 acctagatcactaccattctacacaggccactcgagcttgtgatgcactccgctaagggggcgcttctctcttctgttcagtcac  
 25 aaccgcaaac**cttaga**atatcaATGatcgagcaggacggcctccacgcccgtccccgcgctgggtggagcgctgttc  
 ggctacgactgggcccagcagaccatcggtgctccgacgcccgtgttcgctgtccgcccaggcgcccgtgctgttc  
 30 gtgaagaccgacctgtccggcgccctgaacgagctgcaggacgaggccgcccgtgtcctgggtggccaccacggcgctgc  
 cctgcgcccgtgctggacgtggtgaccgagggccgcccgcgactggctgctgctgggcgaggtgcccggccaggacctgct  
 gtctcccacctggccccgcgagaaggtgtccatcatggccgacgcatgcgcgctgcacacctggaccccgccacctg  
 35 ccccttcgaccaccaggccaagcaccgcatcgagcgccccgcacccgcatggaggccggcctggtggaccaggacgacctg  
 gacgaggagcaccaggggcctggccccgcgagctgttcgcccgcctgaaggcccgcatgcccgacggcgaggacctggtg  
 40 gtgaccacggcgacgctgctgcccacatcatggtggagaacggccgcttctccggcttcacgactgcggccgctgggc  
 gtggccgaccgctaccaggacatcgccctggccacccgcgacatgcggaggagctgggcggcgagtgggcccagccgttcc  
 tgggtgctgtacggcatcgccgccccgactcccagcgcatgccttctaccgctgctggacgagttcttcTG**Acaattg**GCAG  
 45 CAGCAGCTCGGATAGTATCGACAACTCTGGACGCTGGTCGTGTGATGGACTGTTGCCGCCAACTT  
 GCTGCCTTGACCTGTGAATATCCCTGCCGCTTTTATCAAACAGCCTCAGTGTGTTTGATCTTGTGTGT  
 50 ACGCGCTTTTGCAGTTGCTAGCTGCTTGTGCTATTTGCGAATACCACCCCCAGCATCCCCCTTCCCTC  
 GTTTCATATCGCTTGCATCCCAACCGCAACTTATCTACGCTGTCTGCTATCCCTCAGCGCTGCTCCTG  
 CTCCTGCTCACTGCCCCCTGCACAGCCTTGGTTTGGGCTCCGCCTGTATTCTCCTGGTACTGCAACCT  
 55 GTAAACCAGCACTGCAATGCTGATGCACGGGAAGTAGTGGGATGGGAACACAAATGG**Aggatcccgc**  
 gtctgaacagagcgcgagaggaacgctgaaggtctgcctctgtgcacctcagcgcgccatacaccacaataaccacctgacg  
 60  
 65

aatgcgcttggttcttctgctcattagcgaagcgtccggttcacacacgtgccacgttgccgaggtggcaggtgacaatgatcggtgg  
5 agctgatggctgaaacgttcacagcctagggatatcgaattccttcttgcgctatgacacttcagcaaaaggtagggcggtgctgc  
gagacggcttcccggcgctgcatgcaacaccgatgatgcttcgacccccgaagtccttcggggctgcatggcgctccgatgccg  
10 ctccagggcgagcgctgtttaaatagccaggccccgattgcaaagacattatagcgagctaccaagccatattcaaacacctag  
atcactaccactttacacaggccactcgagcttgatcgactccgtaagggggcgctcttctcttctgcttcagtcacaacccg  
caaacaactagtGCGCTGGACGCGGCAGTGGGTGGCCGAGGAGAACCGGCACGGCGACCTGCTGAAC  
15 AAGTACTGTTGGCTGACGGGGCGCTCAACATGCGGGCCGTGGAGGTGACCATCAACAACCTGAT  
CAAGAGCGGCATGAACCCGACAGCGGACAACAACCCCTTACTTGGGCTTCGTCTACACCTCCTTCCAG  
20 GAGCGCGGACCAAGTACAGCCACGGCAACACCGCGCGCTTGC GGCCGAGCAGTGTGTTTGAGG  
GTTTTGGTTGCCCCGATCGAGGTCCTGGTGGCGCGCATGGGGGAGAAGGCGCCTGTCCCGCTGACC  
CCCCGGCTACCCCTCCCGGCACCTTCCAGGGCGCGTACGggatccTGCTCGGCCGCAAGGCGCGCGGT  
25 GTTGCCGTGGCTGTACTTGGTCGCGCGCTCCTGGAAGGAGGTGTAGACGAAGCCCAAGTAAGGGT  
TGTTGTCCGTCTGCGGGTTCATGCCGCTCTTGATCAGGTTGTTGATGGTCACCTCCACGGCCCCGCAT  
30 GTTGACGCGCCCCGTACGCCAACAGTACTTGTTCAGCAGGTGCGCGTGCCGTTCTCTCGGCCACC  
CACTGCCGCGTCCAGCGCaagcttGCAGCAGCAGCTCGGATAGTATCGACACACTCTGGACGCTGGTC  
35 GTGTGATGGACTGTTGCCGCCACACTTGTGCCTTGACCTGTGAATATCCCTGCCGCTTTTATCAAAC  
AGCCTCAGTGTGTTGATCTTGTGTGTACGCGCTTTTGCAGTTGCTAGCTGCTTGTGCTATTTGCGA  
ATACCACCCCCAGCATCCCCTCCCTCGTTTCATATCGCTTGCATCCCAACCGCAACTTATCTACGCTG  
40 TCCTGCTATCCCTCAGCGCTGCTCCTGCTCCTGCTCACTGCCCCCTCGCACAGCCTTGTTTGGGCTCCG  
CCTGTATTCTCCTGGTACTGCAACCTGTAAACCAGCACTGCAATGCTGATGCACGGGAAGTAGTGGG  
45 ATGGGAACACAAATGGAaagctggagctccagccacggcaacaccgcgcgcttgcggccgagcacggcgacaagaacc  
tgagcaagatctcgggctgatgccagcgacagggcgccgacgagatcgctacacgcgcatcgtggacgagttcttcgcctc  
gaccccgagggcgccgtcgccgctacgccaacatgatgcgaagcagatcaccatgcccgcgcacctcatggacgacatggggc  
50 acggcgaggccaacccggcgcaacctcttcgccgacttctccgcggtcgccgagaagatcgacgtctacgacgaggactac  
tgccgcatcctggagcacctcaacgcgcgctggaaggtggacgagcgccaggtcagcgccaggccgcccggaccaggagtac  
gtcctgggctgccccagcgcttccggaaactcgccgagaagaccgcccgaagcgcaagcgctcgcgcgaggcccgctcgctt  
55 ctcttgatctccggcgcgagatcatggtctagggagcgacgagtgctgctgcccgggctggcgaggaggacccctctcgct  
cctctctgttctgaacggaacaatcgccaccccgctacgcgccacgcatcgagcaacgaagaaaacccccgatgataggttg  
60 cggtggtgctccgggatatagatccggccgcacatcaaaggccctccgccagagaagaagctccttccagcagactcctgaag  
agc (SEQ ID NO:97)

[0415] La secuencia del ADN transformante derivado de pSZ2697 se proporciona inmediatamente debajo. Sitios de  
65 restricción relevantes se indican en minúsculas, negrita, y son de 5'-3' NsiI, SpeI, BamHI, HindIII, SacII, EcoRV, KpnI,  
XbaI, MfeI, BamHI, AvrII, EcoRV, EcoRI y XbaI, respectivamente. Secuencias subrayadas en los extremos 5' y 3'

flancos de la construcción representan ADN genómico de *P. moriformis* que permiten la integración dirigida del ADN de transformación a través de recombinación homóloga en el locus *SAD2-1*. Procediendo en la dirección 5' a 3', las hebras de *SAD2* de horquilla C sensorial y antisentido se indican con mayúsculas, negrita y cursiva, y están separados por *P. moriformis* *FAD2* intrón y las primeras 10 bases del segundo exón *FAD2* (cursiva y en mayúsculas). UTR 3' de gen *NR C. vulgaris* se indica por pequeñas mayúsculas. *Chlorella sorokiniana* *Glutamato Deshidrogenasa* (*GDH*) promotor que dirige la expresión de *neoR* (Que codifica la actividad de la fosfotransferasa de aminoglucósido, permitiendo de este modo la cepa para crecer en G418) está indicado por letras minúsculas, texto en caja. El iniciador ATG y el terminador TGA para *neoR* se indican mediante cursiva y en mayúsculas, mientras que la región de codificación está indicada con letra cursiva en minúsculas. Un segundo *NR* 3' UTR *C. vulgaris* se indica por pequeñas mayúsculas, seguido por una región espaciadora indicada por texto en minúsculas.

**[0416]** Secuencia de nucleótidos del ADN transformante de pSZ2697:

**atgcatgccggtcaccacccgcatgctcgtactacagcgcacgcaccgcttcgtgatccaccgggtgaacgtagtcctcgacggaa**  
acatctgggttcgggcctcctgcttgcaactcccgcccatgccgacaacctttctgctgttaccacgaccacaatgcaacgcgacacga  
ccgtgtgggactgatcgggtcactgcacctgcatgcaattgtcacaagcgcttactccaattgtattcgtttgtttctgggagcagttg  
ctcgaccgcccgcgtcccgaggcagcgatgacgtgtgcgtggcctgggtgtttcgtcgaaaggccagcaaccctaaatcgaggc  
gatccggagattgggatctgatccgagtttgaccagatccgccccgatgcggcacgggaactgcatcgactcggcgcggaaccca  
gctttcgtaaatgccagattggtgtccgatacctggatttgccatcagcgaacaagacttcagcagcgagcgattttggcgggcgt  
gctaccaggggtgcatacattgccatttctgtctggaccgctttactggcgagagggtgagttgatggggttgccaggcatcgaaa  
cgcgcgatgcatgggtgtgcgtgtctgttttcggctgcacgaattcaatagtcggatgggacgaggtagaattgggtgtggcgctcgct  
gcatgcctcgccccgtcgggtgtcatgaccgggactggaatccccctcgacacatcttgctaacgctcccgactctcccgactag  
***GCGCTGGACGCGGCAGTGGGTGGCCGAGGAGAACCGGCACGGCGACCTGCTGAACAAGTACTGT***  
***TGGCTGACGGGGCGCGTCAACATGCGGGCCGTGGAGGTGACCATCAACAACCTGATCAAGAGCG***  
***GCATGAACCCGACAGCGGACAACAACCTTACTTGGGCTTCGTCTACACCTCCTCCAGGAGCGCGC***  
***GACCAAGTACAGCCACGGCAACACCGCGCGCCTTGCGGCCGAGCAGTGTGTTTGAGGGTTTTGGTT***  
***GCCCGTATCGAGGTCTGGTGGCGCGCATGGGGGAGAAGGCGCCTGTCCCGCTGACCCCCCGGCT***  
***ACCCTCCCGGCACCTTCCAGGGCGCGTACGgatccTGCTCGGCCGCAAGGCGCGCGGTGTTGCCGTG***  
***GCTGTACTTGGTCGCGCGCTCCTGGAAGGAGGTGTAGACGAAGCCCAAGTAAGGGTTGTTGTCCG***



**TCTGCGGGTTCATGCCGCTCTTGATCAGGTTGTTGATGGTCACCTCCACGGCCCGCATGTTGACGCG**  
**CCCCGTACGCAACAGTACTTGTTACAGAGGTCGCCGTGCCGGTTCTCCTCGGCCACCCACTGCCGC**  
**GTCCAGCGCaagctt**GCAGCAGCAGCTCGGATAGTATCGACACACTCTGGACGCTGGTCGTGTGATG  
 5 GACTGTTGCCGCCACACTTGCTGCCTTGACCTGTGAATATCCCTGCCGCTTTTATCAAACAGCCTCAG  
 10 TGTGTTTGATCTTGTGTGTACGCGCTTTTGCAGATTGCTAGCTGCTTGTGCTATTTGCGAATACCACC  
 CCCAGCATCCCCCTTCCCTCGTTTCATATCGCTTGCATCCCAACCGCAACTTATCTACGCTGTCCTGCTA  
 TCCCTCAGCGCTGCTCCTGCTCCTGCTCACTGCCCTCGCACAGCCTTGTTTTGGGCTCCGCTGTATT  
 15 CTCCTGGTACTGCAACCTGTAAACCAGCACTGCAATGCTGATGCACGGGAAGTAGTGGGATGGGAA  
 CACAAATGGAAAGCTG**gagctcaaa****gatat**caacttaattaacca**aggtacc****cgctgcaacgcaagggcagccacagcc**  
 20 **gctccacccgccgtgaaccgacacgtgcttgggcgcctgccgcctgctgcccatgcttgtgctggtgaggctgggcagtgctg**  
**ccatgctgattgaggcttggtcatcggtggaagcttatgtgtgtgctgggcttgcagccgggcaatgcgatggtggcaagagg**  
**gcggcagcacttgctggagctgccgcggtgctccaggtggttaatcgccgcagccagagggatttcagatgatcgcgctacag**  
 25 **gttgagcagcagtgctagcaaaaggtagcagtttgcagaatgatcggttcagctgttaatcaatgccagcaagagaaggggtcaag**  
**tgcaaacacgggcatgccacagcacgggcacccgggagtggaatggcaccaccaagtgtgtgcgagccagcatcgccgcctggct**  
 30 **gtttcagctacaacggcaggagtcaccaacgtaacctagctgatcaacactgcaatcatcgggcgggcgtgatgcaagcatgc**  
**ctggcgaagacacatggtgtgcggatgctgccggctgctgcctgctgcgcacgccgttgagttggcagcaggctcagccatgcactg**  
 35 **gatggcagctgggctgccactgcaatgtggtggataggatgcaagtggagcgaatacacaacccctctggctgcttgcgtgggtgcat**  
**ggcatgcaccatcagcaggagcgcatgcgaagggaactggcccatgcacgccatgcaaacggagcgaccagtgctccaca**  
**ctgtcaccaggcccgcaagctttgcagaacctgctcatggacgcatgtagcgctgacgtcccttgacggcgctcctctcggtgtg**  
 40 **ggaaacgcaatgcagcacaggcagcagaggcgggcggcagcagagcgggcggcagcagcgggggccacccttctgcggggt**  
**cgcgccccagccagcggtgatgcgctgatcccaaacgagttcacattcatttgcagcctggagaagcgaggctggggccttgggc**  
 45 **tggtgcagcccgcaatggaatgcgggaccgccaggctagcagcaaaaggcgctcccctactccgcatcgatgttccatagtgcatt**  
**ggactgcatttgggtggggcgccggctgtttcttctgtgtgcaaacgcgcagctcagcaacctgtccgtgggtccccgtgcc**  
 50 **gatgaaatcgtgtgcagccgatcagctgattgccggctcgcaagtaggcgcctccttctgctgcctctctccgtccccgctc**  
**taga**atatcaATGatcgagcaggacggcctccacgcccgtcccccgccgctgggtggagcgctgttcggctacgactggg  
 55 cccagcagaccatcggtgctccgacgcccgtgttccgctgtccgcccaggggccgccccgtgctgttcgtgaagaccgacct  
 gtccggcgccctgaacgagctgcaggacgaggccggccgctgtcctggctggcaccaccggcggtgcctgcgcgcccgtgc  
 tggacgtggtgaccgaggccggccgactggctgctgctggcgaggtgcccggccaggacctgctgtcctccacctggcc  
 60 cccgcccgagaaggtgtccatcatggccgacgccatgcgcccgtgcacacctggacccccccacctgccccttcgaccaccag  
 gccaagcaccgcatcgagcgcgcccgcacccgcatggaggccggcctggtggaccaggacgacctggacgaggagcacca

5 *gggcctggccccgcccagctgttcgcccgcctgaaggcccgcatgcccgcggcgaggacctggtggtgacccacggcgac*  
*gcctgcctgcccacatcatggtggagaacggccgcttctccggttcacgactgcggccgcctgggcgtggccgaccgctac*  
*caggacatcgccctggccacccgcgacatcgccgaggagctggcgggcgagtgggccgaccgcttctggtgctgtacggca*  
*tcgccgccccgactcccagcgcatcgcttctaccgctgctggacgagttcttcTGA**caattg**GCAGCAGCAGCTCGGA*  
 10 TAGTATCGACAACTCTGGACGCTGGTCGTGTGATGGACTGTTGCCGCCAACTTGTGTCCTTGACC  
 TGTGAATATCCCTGCCGCTTTTATCAAACAGCCTCAGTGTGTTTGATCTTGTGTGTACGCGCTTTTGC  
 GAGTTGCTAGCTGCTTGTGCTATTTGCGAATACCACCCCCAGCATCCCCTTCCCTCGTTTCATATCGCT  
 15 TGCATCCCAACCGCAACTTATCTACGCTGTCCTGCTATCCCTCAGCGCTGCTCCTGCTCCTGCTCACTG  
 CCCCTCGCACAGCCTTGTTTTGGGCTCCGCTGTATTCTCTGCTACTGCAACCTGTAAACCAGCACT  
 20 GCAATGCTGATGCACGGGAAGTAGTGGGATGGGAACACAAATGGA**ggatccc**gcgtctgaacagagcgcg  
 cagaggaacgctgaaggtctgcctctgtcgacctcagcgcgccatacaccacaataaccacctgacgaatgcgcttggttcttcg  
 tccattagcgaagcgtccggttcacacacgtgcccggttgccgaggtggcaggtgacaatgatcggtggagctgatggtcgaaacg  
 25 ttcacag**cctagggatcgaattc**cggttcgcccgcgtgcctcgctcccctggtggtgcgcgcggtcgccagcgaggccccgctg  
ggcgttccgcccctcggtgcagcgcccctccccggtggtctactccaagctggacaagcagcaccgctgacgcccagcgccctgga  
 30 gctggtgcagagcatggggcagtttgcggaggagaggggtgctgcccgtgctgcaccccgtggacaagctgtggcagccgcaggac  
ttttgccccgaccccgagtcgcccgacttcgaggatcaggtggcgagctgcgcgcgcgccaaggacctgcccgacgagtacttt  
gtggtgctggtggggacatgatcacggaggaggcgctgccgacctacatggccatgctcaacacgctggacggcgtgcgcgacg  
 35 acacggcgcgccgaccacccgtggcgcgctggacgcggcagtggtggcgaggagaaccggcacggcgacctgctgaaca  
agtactgctggtgacggggcgctgaacatgcggggcgtggaggtgacctcaacaacctgatcaagagcggtcatgaaccgca  
 40 gacggacaacaaccctatttggggtcgtctacacctcctccaggagcgcgccaccaagta**tctaga** (SEQ ID NO:98)

45 **[0417] Identificación y análisis de SAD2 cepas knockout/knockdown en el fondo S5003:** Constructos D1639, derivados de pSZ2697, y D1682, derivado de pSZ2283, se transformaron en S5003 como se describió anteriormente. Los transformantes primarios fueron purificados clonalmente y cultivados bajo condiciones de producción de lípidos estándar a pH 7. Los perfiles de ácidos grasos resultantes de clones representativos derivados de la transformación se resumen en la Tabla 47, a continuación. transformantes D1639 acumulados hasta 56% de C18: 0, y los transformantes D1682 acumulados un máximo de aproximadamente 35% de C18: 0. La mayor parte de los aumentos de estearato vinieron a expensas de C18: 1, lo que indica que la actividad SAD se redujo significativamente por constructos de SAD2 knockout/iARN en estas cepas. Niveles C16: 0 variaban de 6% a 14%; C18: 2 variaban de 2-5%. La mayoría de las cepas mantuvieron fenotipos bajos C16: 0 y C18: 2 de los padres S5003. Estos perfiles de ácidos grasos demuestran que la expresión de regulación a la baja de SAD2 usando constructos knockout/iARN, en un fondo con perturbado *FATA-1*, *KASII* sobre-expresión y *FAD2* iARN, produce cepas con fenotipos alto C18: 0, bajo C16: 0 y bajo C18: 2. Estas cepas serán útiles para la producción de alta estabilidad, alto estearato, aceites oleicos altos, y los aceites que tienen alto contenido SOS.

60

65

Tabla 47. Perfiles de ácido graso de transformantes primarios D1639 [pSZ2697] y D1682 [pSZ2283], en comparación con la cepa de tipo silvestre, S1920, y la cepa base padre S5003.

Cepa	S1920	S5003	D1682-4	D1682-17	D1682-7	D1682-6	D1639-2	D1639-3	D1639-10	D1639-19	
Área % de ácido graso	C12:0	0.04	0.11	0.14	0.30	0.32	0.31	0.00	0.13	0.17	0.00
	C14:0	1.29	0.98	1.03	0.94	1.11	1.15	1.64	1.39	1.61	1.02
	C16:0	27.50	7.75	8.68	10.41	5.70	5.96	7.54	9.90	14.39	12.02
	C16:1	0.71	0.30	0.06	0.07	0.07	0.10	0.00	0.00	0.00	0.00
	C18:0	3.28	3.60	35.46	29.82	24.66	22.30	55.96	53.38	43.46	37.30
	C18:1	57.80	84.14	48.39	52.45	61.04	63.60	23.70	26.79	32.93	42.81
	C18:2	7.90	2.09	2.37	2.36	3.83	2.88	5.09	3.50	3.22	2.79
	C18:3 $\alpha$	0.57	0.32	0.50	0.65	0.66	0.58	1.59	0.98	1.01	0.85
	C20:0	0.28	0.23	2.07	1.87	1.75	1.51	3.04	2.73	2.29	2.22
	C20:1	0.18	0.35	0.54	0.40	0.78	0.89	0.37	0.33	0.30	0.40
	C22:0	0.06	0.02	0.27	0.27	0.23	0.20	0.43	0.36	0.29	0.29
	C24:0	0.09	0.02	0.33	0.26	0.34	0.25	0.64	0.45	0.32	0.31
Suma C18	69.55	90.14	86.72	85.42	89.39	89.36	86.34	84.65	80.62	83.75	
Saturados	32.54	12.70	47.98	43.77	34.11	31.69	69.25	68.40	62.53	53.16	
Insaturado	67.16	87.21	51.86	56.06	65.58	67.89	30.75	31.60	37.46	46.86	

[0418] En la Tabla 47, niveles de estearato (C18: 0) mayores que el nivel de tipo salvaje se destacan con negrita. Niveles de oleato (C18: 1) que son más altos que en los de tipo salvaje se indican con el texto en negrita. Niveles de palmitato (C16: 0) menores que el nivel de tipo salvaje se destacan con negrita. Los niveles reducidos de linoleato (C18: 2) en comparación con los de tipo salvaje se destacan con negrita.

[0419] Líneas estables se aislaron a partir de una serie de transformantes D1639 y D1682. Ensayos de frasco de agitación se llevaron a cabo para evaluar el rendimiento de cuatro líneas derivadas de D1639-5. Perfiles de ácidos grasos y los títulos de lípidos relativos desde la biomasa se muestran en la Tabla 48, a continuación.

Tabla 48. Agitar ensayos de frasco de cepas derivadas de D1639-5, expresando *SAD2hpC*, impulsado por el promotor *CrTUB2*, orientado al locus *SAD2-1*

Primario		T530;D1639-5					
Cepa		S1920	S5003	S5774	S5775	S5776	S5777
Área % de ácido graso	C10:0	0.01	0.00	0.07	0.08	0.05	0.04
	C12:0	0.02	0.11	0.19	0.22	0.25	0.23
	C14:0	1.52	1.10	1.35	1.32	1.30	1.43
	C16:0	31.61	9.59	9.28	8.44	7.74	9.46
	C16:1	1.04	0.34	0.03	0.02	0.01	0.01
	C17:0	0.10	0.11	0.10	0.10	0.10	0.09
	C18:0	2.98	4.36	53.01	53.52	55.32	52.09
	C18:1	54.81	<b>80.84</b>	27.26	27.52	27.42	28.06
	C18:2	6.88	2.42	3.55	3.52	2.38	3.45
	C18:3 $\alpha$	0.53	0.33	0.97	1.03	0.82	1.06
	C20:0	0.26	0.31	2.88	2.94	3.15	2.72
	C20:1	0.05	0.34	0.38	0.38	0.40	0.37
	C22:0	0.03	0.06	0.36	0.37	0.39	0.35
	C24:0	0.07	0.08	0.53	0.54	0.53	0.60
Suma C18		65.19	87.95	84.79	85.58	85.94	84.66
Saturados		36.59	15.70	67.76	67.52	68.82	66.99
Insaturado		63.30	84.26	32.19	32.46	31.02	32.95
%Título lipídico de tipo silvestre		100.0	70.3	34.8	33.7	31.4	35.3

[0420] En la Tabla 48, S5003 es la cepa parental; S1920 es la cepa de base de tipo salvaje. Niveles de estearato de (C18: 0) más altos que en la cepa de tipo salvaje se indican con negrita. El texto en negrita indica el aumento del nivel de oleato (C18: 1) en S5003 en comparación con el de tipo salvaje. Niveles de palmitato (C16: 0) que son menos que en el de tipo salvaje se destacan en negrita. Niveles de linoleato (C18: 2) que son menos que en el de tipo salvaje se indican con negrita.

[0421] Aceites de escala de laboratorio se prepararon a partir de biomasa recogida de los matraces de agitación S5774, S5775 y S5776. Las composiciones de TAG de estos aceites se determinaron por LC/MS, y se muestran en la Figura 21. La acumulación SOS variaba entre 42-47% en estas cepas. POS fue el siguiente TAG más abundante, al 16-17%. TAGs que contienen linoleato se redujeron en más de un 50% en comparación con los aceites S5665 y S5675, descritos anteriormente. Aceites S5774-S5776 contenían 12-13% de TAG trisaturados (SSS), similares a las cantidades que se acumularon en los aceites S5665 y S5775. Modulación de la actividad SAD durante la producción de aceite para evitar la sobreproducción de ácidos grasos saturados puede ayudar a reducir la acumulación de trisaturados.

#### EJEMPLO 49: PROPIEDADES DE OLEATO DE METILO A PARTIR DE ACEITES DE MICROALGAS RICAS EN OLEICO.

[0422] Aceites esterificados con alto contenido en oleato de metilo son útiles en una variedad de aplicaciones tales como la limpieza y lubricación de maquinaria. Para algunas de estas aplicaciones, se desea una alta estabilidad térmica. Las pruebas de estabilidad térmica se realizaron en aceite metilado preparado a partir de aceites de triglicéridos de alto oleico y de alta estabilidad oleicos preparados a partir de microalgas oleaginosas heterotróficamente cultivadas como se describe anteriormente. Los aceites se blanquearon y desodorizaron antes de la metilación. Éster metílico de soja comercialmente disponible se usó como un control.

[0423] Aceite alto oleico (HO) se preparó a partir de una cepa de alta tensión oleaginosa de *Prototheca moriformis* transformada con un plásmido que puede ser descrito como FatA1\_Btub: inv: nr::amt03-CwTE2:nr\_FatA1. Este plásmido fue diseñado para recombinarse de manera homóloga en el sitio cromosómico FatA1, ablación por lo tanto una tioesterasa FATA de acil-ACP alelo cromosomal, mientras que la expresión de una tioesterasa acil-ACP exógena de *Cuphea wrightii* (CwTE2, SEQ ID NO: 11) bajo el control del promotor amt3 pH-regulable. El gen CwTE2 puede regularse a la baja de cultivo a pH 5 durante la producción de petróleo para elevar aún más la producción de oleato. Invertasa de sacarosa también se expresó como un marcador de selección y para permitir cultivo de la cepa en sacarosa como única fuente de carbono. Secuencias UTR 3' son *Chlorella vulgaris* gen de la reductasa de nitrato. La cepa HO resultante se denota la mancha P. El perfil de ácidos grasos del aceite producido por la cepa Q se enumera a continuación en la Tabla 49.

Tabla 49. Perfil de ácido graso de alto aceite oleico de la Cepa Q

Ácido graso	Area %
C10	0,01
C12:0	0,03
C14:0	0,43
C15:0	0,03
C16:0	7,27
C16:1 iso	0,81
C16:1	0,689
C17:0	0,06
C18:0	1,198
C18:1	80,15
C18:1 iso	0,08
C18:2	8,38
C18:3 ALFA	0,25
C20:0	0,02
C20:1	0,38
C22:0	0,04
C24:0	0,03

[0424] Un aceite alto oleico de alta estabilidad (HSAo) también se preparó a partir de una alta tensión oleaginosa de *Prototheca moriformis* transformada con un plásmido que puede ser descrito como FADc5'\_Btub: inv: nr::BTub-CpSAD\_CtOTE: nr\_FADc3'. La cepa resultante (cepa R) expresa la invertasa de sacarosa como un marcador de selección y para permitir el cultivo en sacarosa como única fuente de carbono. Además, un alelo de FAD (que codifica desaturasa de ácido graso responsable de la conversión de oleato de linoleato) se interrumpe y una tioesterasa acil-ACP-oleato específico (*Carthamus tinctorius* OTE, véase el ejemplo 5) fusionado con el péptido de tránsito del gen SAD de *Chlorella protothecoides* se expresa bajo el control del promotor de beta tubulina. Secuencias UTR 3' son de

*Chlorella vulgaris* gen de la reductasa de nitrato. El perfil de ácidos grasos del aceite producido por la cepa R después del cultivo heterotrófico se enumeran a continuación en la Tabla 50. El perfil de ácidos grasos tiene más de 85% de oleato sin embargo, casi ninguno de los principales ácidos grasos poliinsaturados, linoleico y linolénico.

Tabla 50. Perfil de ácido graso de alto aceite oleico de la cepa R.

Ácido graso	Area %
C10	0,02
C12:0	0,07
C14:0	0,09
C15:0	0,05
C16:0	7,28
C16:1	0,70
C17:0	0,08
C18:0	2,15
C18:1	86,32
C20:0	0,30
C20:1	0,46
C22:0	0,08
C23:0	0,01
C24:0	0,06

**[0425]** Los aceites Ho y HSAo se metilan por técnicas de producción de biodiesel conocida para hacer ésteres de metil-HO y metil-HSAo. Estos ésteres metílicos luego se someten a prueba térmica de acuerdo con el siguiente procedimiento:

1. Preparar equipo como se muestra en la Figura 1.
2. Añadir 1 litro de agua para probar recipiente y llevar a un hervor activo en la placa caliente.
3. Para cada producto de ensayo añadir 50 ppm de cobalto (0,083 g de 6% de cobalto naftenato en 100,0 gramo de muestra) y mezclar completamente.
4. Pesar, en un vidrio de reloj, 7,0 g de gasa de algodón 100%, (nº 50 del paño de queso).
5. distribuir uniformemente 14,0 g de producto de ensayo, tal como se preparó en el paso 3, en la gasa.
6. Colocar el termopar (termómetro) a través del centro del tapón nº 15. Envolver el algodón alrededor del termopar.
7. Colocar algodón envuelto en 24 cilindro de marco de alambre de malla de manera que ocupe las 4 ½ pulgadas superiores.
8. Posición con gasa envuelta en la vaso alto de 1L. Asegurar el vaso de precipitados en el agua hirviendo y comenzar a registrar el aumento de la temperatura con el tiempo.
9. Continuar la vigilancia de la temperatura durante 2 horas o hasta que se observe una caída de temperatura de 10 grados.
10. Trazar la temperatura vs tiempo en un gráfico.
11. Cualquier muestra que muestra una temperatura superior a 100 grados C en 1 hora o 200 grados C en 2 horas debe ser considerada como un riesgo de oxidación peligroso o uno que es probable que produzca una combustión espontánea.

**[0426]** Resultados: El éster metílico HO y HSAo no mostró auto-oxidación como se evidencia por un aumento de temperatura. La muestra de éster de metilo de control de soja hizo exhibir el potencial para la auto-oxidación. Los perfiles de tiempo y temperatura se muestran en la Figura 18.

**[0427]** Además, se encontró que los ácidos grasos metilados a partir de aceite producidos por la cepa Q tenían las siguientes características:

- Punto de inflamación (ASTM D93) de 182°C
- No COV
- Valor Kauri Butanol (ASTM D1133) de 53,5
- Viscosidad a 40°C (ASTM D445) de 4,57 mm<sup>2</sup>/s
- Número de ácido (D664 ASTM) de 0,17 mg KOH/g
- distribución de intervalo de ebullición (ASTM D2887) 325 a 362°C.

**EJEMPLO 50: PROPIEDADES ADICIONALES DE ACEITES DE MICROALGAS ALTOS OLEICOS (HO) Y ALTOS OLEICOS DE ALTA ESTABILIDAD (HSAO).**

[0428] El alto aceite oleico y aceites de alto oleico de algas de alta estabilidad pueden tener las propiedades mostradas en la Figura 19 o estos valores  $\pm 20\%$  para los parámetros medidos.

[0429] En un experimento, aceite de microalgas HSAO mostró estabilidad 512 horas medido por OSI a 110°C (estimada a partir de datos 130°C) con antioxidantes de 0,5% fenil-alfa-naftilamina (PANA) y 500 ppm palmitato de ascorbilo (AP).

#### EJEMPLO 51: PRODUCCIÓN DE ACEITE DE BAJO SATURADO POR CONVERSIÓN DE PALMÍTICO A PALMITOLEATO.

[0430] Como se describe en los ejemplos anteriores, la manipulación genética de microalgas puede disminuir los niveles de grasas saturadas, especialmente mediante el aumento de la producción de ácido oleico. Sin embargo, en algunos casos, las tioesterasas acilo-ACP expresadas en la célula oleaginosas desprende más que cantidades deseables de palmitato. A continuación, describimos métodos para la conversión de palmitato (16: 0) a palmitoleato (16: 1) mediante la sobreexpresión de un gen desaturasa (PAD) palmitoil-ACP. El gen PAD puede ser obtenido a partir de fuentes naturales tales como *Macfadyena unguis* (uña de gato), *Macadamia integrifolia* (nuez de macadamia), *Hippophae rhamnoides* (espino amarillo), o mediante la creación de un PAD a través de la mutación de una desaturasa de estearoil-ACP de tener actividad 16: 1. La desaturasa *Macfadyena unguis* se denota (MuPAD).

[0431] Una cepa productora de alto aceite de *Prototheca moriformis* (Cepa Z) se transforma biolísticamente con construcciones de plásmido de ADN con un gen PAD. Por ejemplo, una de las altas cepas oleicas descritas en los Ejemplos 6, 36, o 49 puede comprender además un gen PAD exógeno. Las construcciones comprenden invertasa sacarosa como un marcador seleccionable y, o bien la MuPAD o un gen SAD (por ejemplo, *Olea europaea* desaturasa de estearoil-ACP, nº de acceso de GenBank AAB67840,1) que tiene la mutación L118W para cambiar sustrato-especificidad hacia palmitato. Ver Cahoon, et al, Plant Physiol (1998) 117: 593-598. Se utilizan tanto los promotores de tubulina beta (BTub) como amt3. Además, el péptido de tránsito nativo de un gen vegetal PAD se puede intercambiar con un conocido por ser eficaz en microalgas (por ejemplo, el péptido de tránsito de el *Chlorella vulgaris* gen SAD).

[0432] El gen PAD se puede expresar en una variedad de cepas incluyendo aquellas con un FATA knockout o knockdown y/o un KASII knockin para producir aceite de alto oleico. Opcionalmente, estas cepas también pueden producir aceite de alta estabilidad (bajo poliinsaturado) en virtud de un FAD (desaturasa de ácido graso delta 12) knockout, knockdown, o mediante la colocación de expresión de FAD bajo el control de un promotor regulable y producción de petróleo en condiciones que regula FAD a la baja. Además, las cepas base útiles para la introducción de actividades de genes PAD también pueden incluir cepas que poseen KASII knockouts, y FATA Knockins, con lo que los niveles de C16: 0 palmitato son elevados.

[0433] Como resultado, los niveles más bajos de ácido palmítico se encuentran en el perfil de ácidos grasos del aceite de microalgas como este se convierte en ácidos cis-palmitoleico y cis-vacénico. En algunos casos, el porcentaje de área total de ácidos grasos saturados es inferior a igual a 3,5%, 3% o 2,5%.

[0434] Siguen construcciones para la sobreexpresión de *Macfadyena unguis* C16: 0 desaturasa (MuPAD):

#### **1) pSZ3142: 6S::CrTUB2: ScSUC2: CvNR::PmAMT3: CpSADtp: MuPAD: CvNR::6S**

Sitios de restricción relevantes en el constructo pSZ3142

[0435] 6S::CrTUB2: ScSUC2: CvNR::PmAMT3: CpSADtp: MuPAD: CvNR::6S se indican en minúsculas, en negrita y subrayado y son 5'-3' BspQ1, KPN I, Xba I, Mfe I, BamH I, EcoR I, Spe I, Asc I, Cla I, Sac I, BspQI, respectivamente. Sitios BspQI delimitan el 5' y 3' del ADN transformante, secuencias minúsculas en negrita representan ADN genómico de esa integración dirigida en el locus 6s a través de recombinación homóloga. Procediendo en la dirección 5' a 3', *C. reinhardtii* promotor  $\beta$ -tubulina de conducir la expresión del gen de levadura de sacarosa invertasa (que confiere la capacidad de la cepa Z para metabolizar la sacarosa) se indica mediante texto en caja. El iniciador ATG y el terminador TGA para la invertasa se indican con mayúsculas, negrita y cursiva, mientras que la región de codificación está indicada en minúsculas en cursiva. *Chlorella vulgaris* nitrato reductasa 3' UTR se indica mediante letras minúsculas texto subrayado seguido de un promotor endógeno de amt03 *Prototheca moriformis*, indicado por texto cursiva en caja. Los codones ATG iniciador y terminador TGA de la MuPAD se indican con mayúsculas, negrita y cursiva, mientras que el resto de la región codificante se indica mediante negrita y cursiva. *Chlorella protothecoides* péptido de tránsito desaturasa de estearoil-ACP S106 está situado entre el iniciador ATG y el sitio Asc I. *C. vulgaris* nitrato reductasa 3' UTR se indica de nuevo por minúsculas de texto subrayado seguido por la región genómica 6S indicado por texto minúsculas en negrita.

[0436] Secuencia de nucleótidos de la transformación de ADN contenido en pSZ3142:

**gctcttcgccgccgcccactcctgctcgagcgcgcccgcgctgcgccgccagcgcttggccttttcgccgctcgtgcgcgtcgct**  
**gatgtccatcaccaggtccatgaggtctgccttgcgccggctgagccactgcttcgtccgggcgccaagaggagcatgagggag**  
 5 **gactcctgggtccagggtcctgacgtggtcgcggtctgggagcgggccagcatcatctggctctgccgaccgaggccgcctcaa**  
**ctggctctccagcagccgcagtcgccgccgaccctggcagaggaagacaggtgaggggggtatgaattgtacagaacaaccacg**  
 10 **agccttgtctaggcagaatccctaccagtcatggctttacctggatgacggcctgcgaacagctgtccagcgaccctcgtgccgcc**  
  
 15  
  
 20  
  
 25  
  
 30  
  
 35  
  
 40  
  
 45  
  
 50  
  
 55  
  
 60  
  
 65

gcttctccgcacgcttcttccagcaccgtgatggcgagccagcgccgcacgctggcgctgcgcttcgccgatctgaggacagt  
 cggggaactctgatcagtctaaaccccccttgcgcttagtgttgccatcctttgagaccggtgagagccgacttgttgcgccac  
 5 cccccacaccacctcctccagaccaattctgtcaccttttggcgaaggcatcggcctcggcctgcagagaggacagcagtgtccc  
 agccgctgggggttgcgcatgcacgctcaggtacccttcttgctatgacacttcagcaaaaggtaggcgggctgcgagac  
 ggcttccggcgctgcatgcaacaccgatgatgcttcgacccccgaagctccttcggggctgcatggcgctccgatgccgtcca  
 10 gggcgagcgctgttaaatagccaggccccgattgcaaagacattatagcgagctaccaagccatattcaaacactagatcac  
 taccacttctacacaggccactcgagcttgtgatcgactccgctaaggggcgcttcttcttctgttcagtcacaacccgcaaa  
 15 ctctagaatatca**ATG**ctgctgcaggccttctgttctgctggtggcgcttcgcccaagatcagcgctccatgacgaacga  
 gacgtccgaccccccctggtgcacttcaccccaacaagggtggatgaacgaccccaacggcctgtggtacgacgagaag  
 20 gacgccaagtggcacctgtacttccagtacaacccgaacgacaccgtctgggggacgcccctgttctggggccacgccacgtc  
 cgacgacctgaccaactgggaggaccagcccatcgccatcgccccgaagcgcaacgactccggcgcttctccggctccatgg  
 tgggtgactacaacaacacctccggcttcttaacgacacccatcgacccgcccagcgctgctggtggccatctggacctacaaca  
 25 ccccgagtcggaggagcagtacatctctacagcctggacggcggtacaccttcaccgagtaccagaagaaccccgctgtg  
 gccgccaactccaccagttccgacgacccgaaggtcttctggtacgagccctccagaagtggatcatgaccgcgccaagtc  
 30 ccaggactacaagatcgagatctactctccgacgacctgaagtctggaagctggagtccgcttcgccaacgaggggttcc  
 tcggctaccagtacgagtgtcccgctgatcgaggtccccaccgagcaggacccagcaagtctactgggtgatgttcatct  
 ccatcaaccccgcgccccggcggtccttcaaccagtacttcgtcggcagcttcaacggcacccacttcgaggccttcga  
 35 caaccagtcgctggtggacttcggcaaggactactacgccctgcagaccttcttaacaccgacccgacctacgggagcg  
 ccctgggcatcgctgggctccaactgggagtactccgcttcgtgccaccaacccctggcgctcctcatgtcctcgtgcgc  
 40 aagtttccctcaacaccgagtaccaggccaacccggagacggagctgatcaacctgaaggccgagccgatcctgaacatca  
 gcaacgcccggcccctggagccggttcgccaccaacaccacgttgacgaaggccaacagctacaacgtcgacctgtccaacag  
 45 caccggcacccctggagttcgagctggtgtacgccgtcaacaccaccagacgatctccaagtccgtgttcgaggacctctccctc  
 tgggtcaaggcgctggaggaccccgaggagtacctccgcatgggcttcgaggtgtccgctcctccttcttctggaaccgagg  
 aacagcaaggtgaagttcgtgaaggagaacccctacttccaacaccgcatgagcgtgaacaaccagcccttcaagagcgag  
 50 aacgacctgtcctactacaaggtgtacggcttctggtgaccagaacatcctggagctgtacttcaacgacggcgacgtcgtgtcc  
 accaaccactacttcatgaccacgggaacgccttgggtccgtgaacatgacgacgggggtggacaacctgttctacatcga  
 caagttccaggtgcgcgaggtcaag**TGA**caattggcagcagcagctcggatagtatcgacacactctggacgctggtcgtgtga  
 55 tggactgttgcgccacacttgccttgacctgtgaatatccctgccgcttttatcaaacagcctcagtggttgcctgtgtgtac  
 gcgcttttgcgagttgctagctgctgtgctatttcggaataccacccccagcatcccttccctcgtttcatatcgcttgcacccaacc  
 60 gcaacttatctacgctgtcctgctatccctcagcgctgctcctgctcactgcccctcgacagccttggttgggctccgctgt  
 atttctctggtactgcaacctgtaaacccagcactgcaatgctgatgcacgggaagtagtgggatgggaacacaaatggaggatccc

65



gcgtctgaacagagcgcgcagaggaacgctgaaggctcgctctgtcgacctcagcgcggcatacaccacaataaccacctga  
cgaatgcgcttggttcttctgctccattagcgaagcgtccggttcacacacgtgccacgttggcgagggtggcaggtgacaatgatcggt  
5 ggagctgatggcgaacgttcacagcctagggatatcgaattcggccgacaggacgcgcgtcaaagggtgctggtcgtgtatgc  
cctggccggcaggtcggtgctgctgctggttagtgattccgcaaccctgattttggcgtcttattttggcgtggcaaacgctggcg  
10 cccgcgagccgggcccggcgatgcggtgccccacggctgccggaatccaaggaggcaagagcgcggggtcagttga  
agggtttacgcgcaaggtagccgctcctgcaaggctgcgtggtggaattggacgtgcaggtcctgctgaagttcctccac  
cgcctcaccagcggacaaagcaccggtgtatcagggtccgtgtcatcactctaaagaactcgactacgacctactgatggccct  
15 agattcttcatcaaaaacgcctgagacacttgcccaggattgaaactccctgaagggaaccaccaggggcccctgagttgttctt  
cccccggtggcgagctgccagccaggctgtacctgtgatcgaggctggcgggaaaatagggtcgtgtgctcaggtcatggg  
20 aggtgcaggacagctcatgaaacgccaacaatcgacaaattcatgtcaagctaatacagctatttcttctcacgagctgtaatt  
gtcccaaaattctggtctaccgggggtgatccttctgtacgggcccctccctcaaccctaggtatgcgcgcatgcggtcgccgc  
25 gcaactcgcgcgagggccgaggggttgggacgggcccgtcccgaatgcagttgcacccggatgcgtggcacctttttgcgat  
aatattgcaatggactgctctgcaaaattctggtctgtcgcaaccctaggatcagcggcgtaggatttcgtaatcattcgtc  
ctgatggggagctaccgactacctaataatcagcccagctgcctgacgccagcgtccacttttgcacacattccattcgtgcc  
30 caagacatttcattgtggtgcgaagcgtcccagttacgctcacctgtttcccgaacctcttactgttctgtcgacagagcggggc  
cacaggccggtcgagccactagATGgccaccgcacccatttctcggcgttcaatgccgctgcggcgacctgcgtcgctc  
35 ggccgggtccgggccccggcgcccagcagggccccctccccgtgcgcggcgccgcccaccctgcgtccggcctgcgcgac  
gtggagaccgtgaagaagaccttctccccgcccgcgaggtgcacgtgcaggtgacctactccatggccccccagaagatc  
40 gagatcttcaaggccatggaggactgggcccagaaacaacatcctggtgcacctgaagaacgtggagaagtggccccagc  
cccaggacttctgcccgaacccgctccgacgagttccacgaccagatcaaggagctgcgcgagcgcgccaaggagatcc  
ccgacgactacttctggtgctggtgggagacatgatcaccgaggaggccctgccacctaaccagacctgctgaacacctg  
45 ggacggcgtgcgcgacgagaccggcgctccccacacctctgggccatctggacccgcgctggaccgcccaggagaaaccg  
ccacggcgacccccgaacaagtaacctgtacctgtccggcgcggtggacatgaagcagatcgagaagaccatccagtacct  
50 gatcgggtccggcatggacccccgaccgagaactccccctacctgggcttcatctacacctcttccaggagcgcgccacctt  
catctcccacggcaacaccgcccgcctggcccgcgaccacggcgactcaagctggcccagatctgcggcaccatcgctccg  
acgagaagcgccacgagaccgctacaccaagatcgtggagaagctgttcgagatcgaccccgacggcacccgtgctggcc  
55 ttggcgacatgatgaagaagaagatctccatgcccgaccacttcatgtacgacggccgcgacgacaacctgttcgaccact  
tctctccgtggcccagcgcctggcggtgtacaccgccaaggactacgccgacatcctggagcacctggtgggcccgtggaa  
60 ggtggagaagctgacccgctgtccgcgagggccagaaggccaggactacgtgtgcggcctgccccccgcatccgccg  
cctggaggagcgcgcccagatccgcgccaagcaggccccccgctgcccttctctggtatctacgaccgcgaggtgcagctg  
atggactacaaggaccacgacggcgactacaaggaccacgacatcgactacaaggacgacgacgacaagTGAatcgat

65

agatctttaaggcagcagcagctcggatagtatcgacacactctggacgctggctcgtgtgatggactgttgcgcccacacttgctgc  
 5 cttgacctgtgaatatccctgccgcttttatcaaacagcctcagtggtttgatcttgtgtgtacgcgcttttgcgagttgctagctgctt  
gtgctatttgcgaataccacccccagcatccccttcctcgtttcatatcgcttgcacccaaccgcaacttatctacgctgtcctgcta  
 10 tccctcagcgctgctcctgctcctgctcactgcccctcgacagccttggtttgggctccgctgtattctcctggactgcaacctgta  
aaccagcactgcaatgctgatgcacgggaagtagtgggatgggaacacaaatggaaagcttaattaagagctcttgtttccagaa  
 15 ggagttgctccttgagcctttcattctcagcctcgataacctccaaagcgcctctaattgtggagggggttcgaatttaaagcttgg  
aatgttgggtcgtcgtctggaacaagcccagacttgttgcactgggaaaaggaccatcagctccaaaaaacttgccgctcaaa  
 20 ccgctacctctgtttcgcgcaatctgcctgttgaaatcgccaccacattcatattgtgacgcttgagcagctgtaattgcctca  
gaatgtggaatcatctgcccctgtgcgagcccatgccaggcatgtcgcgggaggagacacccgccactcgtaacgagaccatt  
 25 atgctacctcacaatagttcataacagtgaccatatttctcgaagctcccaacgagcacctccatgctctgagtgccacccccg  
gccctgggtgcttgaggaggcaggtcaaccggcatggggctaccgaaatccccgaccggatcccaccacccccgcatgggaag  
 30 aatctctccccgggatgtgggcccaccagcacaacctgtggcccaggcgagcgtcaaaccataccacacaaatatccttgg  
catcgccctgaattccttctgccgctctgctacccggtgcttctgtccgaagcaggggttgctagggatcgctccgagtcgcaaa  
cccttgcgcgtggcggggcttgttcgagcttgaagagc (SEQ ID NO:99)

**2) pSZ3145: 6S::CrTUB2: ScSUC2: CvNR::PmAMT3: MuPAD: CvNR::6S**

[0437] Sitios de restricción relevantes en el constructo pSZ3145 6S::CrTUB2: ScSUC2: CvNR::PmAMT3: MuPAD: CvNR::6S se indican en minúsculas, en negrita y subrayado y son 5'-3' *BspQ* 1, *KPN* I, *Xba* I, *MFE* I, *Bam* H I, *Eco* R I, *Spe* I, *Cla* I, *Sac* I, *BspQ* I, respectivamente. Sitios *BspQ* I delimitan el 5' y 3' del ADN transformante, secuencias minúsculas en negrita representan ADN genómico de esa integración dirigida en el locus 6s a través de recombinación homóloga. Procediendo en la dirección 5' a 3', *C. reinhardtii* promotor  $\beta$ -tubulina conduce la expresión del gen de levadura sacarosa invertasa (que confiere la capacidad de la cepa Z para metabolizar la sacarosa) se indica mediante texto en caja. El iniciador ATG y el terminador TGA para la invertasa se indican con mayúsculas, negrita y cursiva, mientras que la región de codificación está indicada en minúsculas en cursiva. *Chlorella vulgaris* nitrato reductasa 3' UTR se indica mediante letras minúsculas de texto subrayado seguido de un promotor endógeno de *amt03 Prototheca moriformis*, indicado por texto cursiva en caja. Los codones ATG iniciador y terminador TGA de MuPAD se indican con mayúsculas, negrita y cursiva, mientras que el resto de la región codificante se indica mediante negrita y cursiva. *C. vulgaris* nitrato reductasa 3' UTR se indica de nuevo por minúsculas de texto subrayado seguido por la región genómica 6S indicado por texto en minúsculas en negrita.

[0438] Secuencia de nucleótidos de la transformación de ADN contenido en pSZ3145:

5 gctcttcgccgcccaactcctgctcgagcgcgcccgcgctgcgccgccagcgcttgccctttcgccgctcgctgcgctgct  
 gatgtccatcaccaggtccatgaggtctgccttgcgcggctgagccactgcttcgtccgggcgccaagaggagcatgaggag  
 10 gactcttggtccagggtcctgacgtggtcgcggtctgggagcgggccagcatcatctggtctgcccaccgaggccgctccaa  
 ctggtcctccagcagccgagtcgcccgcgacctggcagaggaagacaggtgaggggggtatgaattgtacagaacaaccacg  
 agccttgtctaggcagaatccctaccagtcaggtttacctggatgacggcctgcaacagctgtccagcgacctcgctgcgcgc  
 gcttctccgcacgttctttccagcaccgtgatggcgcgagccagcgccgcacgctggcgctgcgttcgccgatctgaggacgt  
 15 cggggaactctgatcagtcctaaaccccttgcgcttagtggttgcctcctttgcagaccggtgagagccgacttgttgcgccac  
 cccccacaccacctcctccagaccaattctgtcacctttttggcgaaggcatcgccctggcctgcagagaggacagcagtgccc  
 agcgcctgggggttgcggtgacacgctcaggtacccttcttcgctatgacacttcagcaaaaggtagggcggtgagagac  
 20 ggcttccggcgctgcatgaacaccgatgatgcttcgacccccgaagctccttcggggctgcatggcgctccgatccgctcca  
 gggcgagcgctgtttaaatagccaggccccgattgcaaagacattatagcgagctaccaaagccatattcaaaccttagatcac  
 taccacttctacacaggccactcgagcttgtgatcgactccgctaagggggcgctcttctcttcttcttcagtcacaaccgcaaa  
 25 ctctagaatatca**ATG**ctgctgcaggccttctgttctgctggccggcttcgccccaagatcagcgctccatgacgaacga  
 gacgtccgaccgccccctggtgcacttcaccccaacaagggctggatgaacgaccccaacggcctgtggtacgacgagaag  
 30 gacgccaagtggcacctgtacttcagttacaacccgaacgacacccgtctgggggacgacctgttctggggccacgccacgtc  
 cgacgacctgaccaactgggaggaccagcccatcgccatcgccccgaagcgcaacgactccggcgcttctccggctccatgg  
 35 tgggtggactacaacaacacctccggcttcttaacgacaccatcgacccgcgccagcgctgctggccatctggacctacaaca  
 ccccgagtcgaggagcagttacatctctacagcctggacggcggtacaccttcaccgagtaccagaagaaccccgctgctg  
 gccgccaactccaccagttccgacccgaaggtcttctggtacgagccctccagaagtggatcatgaccgaggccaagtc  
 40 ccaggactacaagatcgagatctactcctccgacgacctgaagtcttgaagtggagtcgcttcgccaacgaggggttcc  
 tcggctaccagtagcagtgccccggcctgatcgaggtccccaccgagcaggacccagcaagtctactgggtgatgttcatct  
 45 ccatcaaccccgcgccccggcggtccttcaaccagtacttcgtcggcagcttcaacggcaccacttcgaggccttcga  
 caaccagtcccgctggtggacttcggcaaggactactacgcctgcagaccttcttaacaccgacccgacctacgggagcg  
 ccctgggcatcgctgggctccaactgggagtaactccgcttcgtgcccaccaacccctggcgctcctccatgtccctcgcgcg  
 50 aagtttccctcaacaccgagtaccaggccaacccggagacggagctgatcaacctgaaggccgagccgatcctgaacatca  
 gcaacgcggccccctggagccggttcgccaccaacaccacgttgacgaaggccaacagctacaacgtcgacctgtccaacag  
 55 caccggcacccctggagttcgagctggtgtacgcgtcaacaccaccagacgatctcaagtcggttcgaggacctctccctc  
 tgggtcaagggcctggaggaccccgaggagtacctccgatgggcttcgaggtgtccgctcctcttcttctggaccgagg  
 aacagcaaggtgaagttcgtgaaggagaacccctacttcaccaaccgcatgagcgtgaacaaccagcccttcaagagcgag  
 60 aacgacctgtctactacaaggtgtacggcttctggaccagaacatcctggagctgtacttcaacgacggcgacgtcggtcc  
 accaacactacttcatgaccacgggaacgcctgggctccgtgaacatgacgacgggggtggacaacctgttctacatcga  
 65

caagttccaggtgctgaggtcaag**TGA**caattggcagcagcagctcgatagatcgacacactctggacgctggtcgtgta  
 tggactgttgcgccacacttgctgccttgacctgtgaatatccctgccgcttttatcaaacagcctcagtggttgccttggtgac  
 5 gcgcttttgcgagttgctagctgcttgctatttgcgaataaccacccagcatcccctccctcgttcatatcgcttgcatccaacc  
 gcaacttatctacgctgctctgctatccctcagcgctgctctgctcctgctcactgccctcgacagccttggttgggctccgctgt  
 attctcctggtactgcaacctgtaaaccagcactgcaatgctgatgcacgggaagtagtgggatgggaacacaaatggaggatccc  
 10 gcgtctgaacagagcgcgagaggaacgctgaaggtctgcctctgtcgacactcagcgcgccatacaccacaataaccacctga  
 cgaatgcgcttggttcttctccattagcgaagcgctccggttcacacacgtgccacgttggcgaggtggcaggtgacaatgatcggt  
 ggagctgatggtcgaaacgttcacagcctagggatatcgaattcggccgacaggacgcgctcaaaggtgctggtcgtgtatgc  
 15 cctggccggcaggtcgttgctgctgctggttagtgattccgcaaccctgattttggcgtcttattttggcgtggcaaacgctggcg  
 cccgcgagccggcgccggcgatgcggtgccccacggctgccggaatccaagggaggcaagagcgcccggtcagttga  
 20 agggctttacgcgaaggtacagccgctcctgcaaggctgcgtggtggaattggacgtgcaggtcctgtgaagttcctccac  
 cgctcaccagcggacaaagcaccggtgtatcaggtccgtgtcatcactctaagaactcgactacgacctactgatggccct  
 25 agattcttcatcaaaaacgcctgagacacttgcccaggattgaaactccctgaagggaccaccaggggcccctgagttgttctt  
 ccccccgtggcgagctgccagccaggctgtacctgtgatcgaggctggcgggaaaataggcttcgtgtgctcaggtcatggg  
 30 aggtgcaggacagctcatgaaacgccaacaatcgacaaattcatgtcaagctaatacagctatttcttccagagctgtaatt  
 gtcccaaaattctggtctaccgggggtgatccttcgtgtacggcccttcctcaaccctaggtatgcgcgatgcggtcgccg  
 35 gcaactcgcgaggggcccaggggttgggacgggcccgcgaatgcagttgcacccggatgcgtggcacctttttgcgat  
 aatttatgcaatggactgctctgcaaaattctggctctgtcgccaaccctaggatcagcggcgtaggatttcgtaatcattcgct  
 ctgatggggagctaccgactaccctaatatcagcccagctgctgacgccagcgtccacttttgcacacattccattcgtgcc  
 40 caagacatttcattgtggtgcaagcgtccccagttacgtcacctgtttcccagaccttactgttctgacagagcgggccc  
 cacaggccgggtcgagccactagt**ATG**ccctgaagctgaacgccatcaacttcagttccccaagtgtcctccttcggcct  
 45 gcccccggtggtgtcctgcgctccccaagctgtccgtggccgccaccctgcgctccggcctgcgcgacgtggagaccgtga  
 agaagaccttctccccgccgaggtgcaggtgcaggtgaccactccatggccccccagaagatcgagatcttcaaggc  
 catggaggactgggcccagaaacacatcctggtgcacctgaagaacgtggagaagtccccagccccaggacttctgc  
 50 ccgaccccgctccgacgagttccacgaccagatcaaggagctgcgcgagcgcgaaggagatccccgacgactacttcg  
 tgggtgctggtgggacatgatcaccgaggaggccctgccacctaccagaccatgctgaacacctgggacggcggtgcgcg  
 55 acgagaccggcgctccccacctctgggcatctggaccgcgctggaccgaggagaaaccgccagggcagccccct  
 gaacaagtacctgtacctgtccggccgctggacatgaagcagatcgagaagaccatccagtacctgatcggtccggcat  
 60 ggacccccgcaccgagaactccccctacctgggcttcatctacacctccttcaggagcgccaccttcattctccacggcaa  
 caccgcccgcctggcccgcaccacggcgacttcaagctggcccagatctgcccaccatcgctccgacgagaagcgccac  
 gagaccgcctacaccaagatcgtggagaagctgttcgagatcgaccccgacggcaccgtgctggccttcggcgacatgatg  
 65

**aagaagaagatctccatgcccgaccacttcatgtacgacggccgacgacgacaacctgttcgaccacttctcctccgtggccca**  
**gcgcctggcggtgtacaccgccaaggactacgacgacatcctggagcacctggtggccgctggaaggtggagaagctga**  
**ccggcctgtccgagggccagaaggcccaggactacgtgtgcccctgccccccgcatccgcccctggaggagcgcg**  
**cccagatccgcgccaagcaggcccccgctgccttctcctggatctacgaccgaggtgagctgatggactacaagga**  
**ccacgacggcgactacaaggaccacgacatcgactacaaggacgacgacgacaagTGAatcgat** tagatctcttaaggcag  
cagcagctcggaatagatcgacacactctggacgctggctggtgatggactgttccgccacacttgctgccttgacctgtgaatat  
ccctgccgcttttatcaaacagcctcagtggtttgatctgtgtgtacgcgcttttgcgagttgctagctgcttgtgctatttgcgaata  
ccacccccagcatccccttccctcgtttcataatcgcttgcacccaaccgcaacttatctacgctgtcctgctatccctcagcgctgctc  
ctgctcctgctcactgcccctgcacagccttggtttgggctccgctgtattctcctggtactgcaacctgtaaaccagcactgcaat  
gctgatgcacgggaagtagtgggatgggaacacaaatggaaagcttaattaagagctcttgtttccagaaggagttgctccttga  
gcctttcattctcagcctcgataacctccaaagccgcttaattgtggagggggttcgaatttaaagcttggaaatgttggttcgtgc  
gtctggaaacagccagactgttgcctcactgggaaaaggaccatcagctccaaaaaacttgccgctcaaacccgctacctctgct  
ttcgcgcaatctgcctgttgaatcgccaccaattcatattgtgacgcttgagcagctgtaattgcctcagaatgtggaatcatc  
tgccccctgtgcgagcccatgccaggcatgtcggggcgaggaccccgcacatcgtaacgacagaccattatgctacctcacaata  
gttcataacagtgacatatttctgaagctcccaaagcagcacctccatgctctgagtgccacccccggccctggtgcttgcgg  
agggcaggtcaaccggcatggggctaccgaaatccccgaccggtatccaccacccccgcgatgggaagaatctctccccgggat  
gtgggcccaccaccagcacaaacctgctggcccaggcgagcgtcaaacataccacacaaatatccttggcatcgggccctgaattc  
cttctgccgctctgctacccggtgcttctgtccgaagcaggggttgctagggatcgctccgagtcgcgaaccccttgcgcgtggcg  
gggcttgttcgagcttgaagagc (SEQ ID NO:100)

### 3) pSZ3137: 6S::CrTUB2: ScSUC2: CvNR::CrTUB2: CuSADtp: MuPAD: CvNR::6S

Sitios de restricción relevantes en el constructo pSZ3137

**[0439]** 6S::CrTUB2: ScSUC2: CvNR::CrTUB2: CpSADtp: MuPAD: CvNR::6S se indican en minúsculas, en negrita y subrayado y son 5'-3' *BspQ* 1, *KPN* I, *Xba* I, *MFE* I, *Bam* H I, *Eco* R I, *Spe* I, *Asc* I, *cl* a I, *Sac* I, *Bsp* Q I, respectivamente. Sitios *Bsp* Q I delimitan el 5' y 3' del ADN transformante, secuencias minúsculas en negrita representan ADN genómico de esa integración dirigida en el locus 6s a través de recombinación homóloga. Procediendo en la dirección 5' a 3', *C. reinhardtii* promotor  $\beta$ -tubulina conduce la expresión del gen de levadura sacarosa invertasa (que confiere la capacidad de la cepa Z para metabolizar la sacarosa) se indica mediante texto en caja. El iniciador ATG y el terminador TGA para la invertasa se indican con mayúsculas, negrita y cursiva, mientras que la región de codificación está indicada en minúsculas en cursiva. *Chlorella vulgaris* nitrato reductasa 3' UTR se indica por minúsculas de texto subrayado seguido por *C. reinhardtii* promotor  $\beta$ -tubulina, indicado por texto cursiva en caja. Los codones ATG iniciador y terminador TGA de MuPAD se indican con mayúsculas, negrita y cursiva, mientras que el resto de la región codificante se indica mediante negrita y cursiva. *Chlorella protothecoides* péptido de tránsito desaturasa de estearoil-ACP S106 está situado entre el iniciador ATG y el sitio *Asc* I. *C. vulgaris* nitrato reductasa 3' UTR se indica de nuevo por minúsculas de texto subrayado seguido por la región genómica 6S indicada por texto minúsculas en negrita.

**[0440]** Secuencia de nucleótidos de la transformación de ADN contenido en pSZ3137:

gctcttcgccgcccactcctgctcgagcgccccgcgctgcgccgagcgcttggccttttcgccgctcgtgcgctcgt  
 gatgtccatcaccaggtccatgaggtctgcttgcgccgctgagccaactgcttcgtccggcgccaagaggagcatgaggag  
 5 gactcctggtccagggctctgacgtggtcgcggctctgggagcgggccagcatcatctggtctgcgcaccgaggccgctcaa  
 ctggtcctccagcagccgagtcgccgccacccctggcagaggaagacaggtgaggggggtatgaattgtacagaacaaccag  
 10 agccttgtctaggcagaatccctaccagtcaggttacctggatgacggcctgcgaacagctgtccagcagccctcgtgcgcc  
 gcttctccgcacgcttcttccagcaccgtgatggcgcgagccagcgccgcacgctggcgctgcgcttcgccatctgaggacagt  
 cggggaactctgatcagtcataaacccttgcgcttagtggttccatcctttgcagaccggtgagagccgacttgttgcgccac  
 15 ccccccacaccacctcctccagaccaattctgtcaccttttggcgaaggcatcggcctcggcctgcagagaggacagcagtgccc  
 agccgctgggggttgccgatgcagctcaggtacccttcttgcgctatgacacttcagcaaaaggtagggcgggctgcgagac  
 20 ggcttccggcgctgcatgcaacaccgatgatgcttcgacccccgaagctccttcggggctgcatggcgctccgatgccgctcca  
 gggcgagcgctgtttaatatgccaggccccgattgcaaagacattatagcgagctaccaaagccatattcaaacacctagatcac  
 taccacttctacagggccactcgagcttgatgcactccgctaagggggcgcttcttctcttcttctcagtcacaacccgaaa  
 25 ctctagaatatca**ATG**ctgctgcaggccttctgttctgctggtggcggttcgccgccaagatcagcgctccatgacgaacga  
 gacgtccgaccgccccctggtgcacttcacccccacaagggctggatgaacgaccccaacggcctgtgttacgacgagaag  
 30 gacgccaagtggcacctgtacttccagtacaacccgaacgacacccgtctgggggacgccttgttctggggccacgccacgtc  
 cgacgacctgaccaactgggaggaccagcccatcgccatcgccccgaagcgcaacgactccggcgcttctccgggtccatgg  
 tgggtgactacaacaacacctccggcttcttaacgacaccatcgaccgcgccagcgctgcgtggccatctggacctacaaca  
 35 ccccgaggtccgaggagcagtacatctctacagcctggacggcggtctacaccttcaccgagtagcagaagaaccccgctgtg  
 gccgccaactccaccagttccgcgacccgaaggtcttctggtacgagccctccagaagtggatcatgaccgcggccaagtc  
 40 ccaggactacaagatcgagatctactcctccgacgacctgaagtctggaagctggagtccgcgttcgccaacgagggcttcc  
 tcggctaccagtacgagtgcgccggcctgatcgaggtccccaccgagcaggacccagcaagtctactgggtgatgttcatct  
 ccatcaaccccggcgccccggcggtccttcaaccagtacttcgtcggcagcttcaacggcaccacacttcgaggccttcga  
 45 caaccagtcccgcgtggtggacttcggcaaggactactacgccctgcagaccttcttaacaccgacccgacctacgggagcg  
 ccctgggcatcgctgggctccaactgggagtactccgccttcgtgccaccaacccctggcgctcctcatgtccctcgtgcgc  
 50 aagttctccctcaacaccgagtagcaggccaacccggagacggagctgatcaacctgaaggccgagccgatcctgaacatca

55

60

65

gcaacgccggccccctggagccggttcgccaccaacaccacgttgacgaaggccaacagctacaacgtcgacctgtccaacag  
 caccggcaccctggagttcgagctggtgtacgccgtcaacaccacccagacgatctccaagtcggtgttcgaggacctctccctc  
 5 tggttcaagggcctggaggaccccaggagtagctccgcatgggcttcgaggtgtccgctcctcttctcttgaccgcggg  
 aacagcaaggtgaagttcgtgaaggagaacccctacttcaccaaccgcatgagcgtgaacaaccagccctcaagagcgag  
 10 aacgacctgtcctactacaaggtgtacggcttgctggaccagaacatcctggagctgtacttaacgacggcgacgtcgtgtcc  
 accaacacctacttcatgaccacccgggaacgcccctgggctccgtgaacatgacgacgggggtggacaacctgttctacatcga  
 caagttccaggtgcgcgaggtcaag**TGA**caattggcagcagcagctcgatagtagtgcacacactctggacgtggtcgtgtga  
 15 tggactgttgccccacacttgctgccttgacctgtgaatatccctgccgcttttatcaaacagcctcagtggttggatcttgtgtac  
gcgcttttgcgagttgctagctgctgtgtctatttgcgaataccacccccagcatcccttccctcgttccatcgcctgcatcccaacc  
 20 gcaacttatctacgtgtcctgctatccctcagcgtgctcctgctcctgctcactgcccctcgacacgcttggttgggctccgctgt  
attctcctggactgcaacctgtaaacgacactgcaatgctgatgcacgggaagtagtgggatgggaacacaaatggaggatccc  
 25 gcgtctgaacagagcgcgagaggaacgtgaaggtctgcctctgtgcacctcagcgcgccatacaccacaataaacacctga  
 cgaatgcgcttggttcttctgctcattagcgaagcgtccggttcacacacgtgccacgttggcgaggtggcaggtgacaatgatcgg  
 ggagctgatggtcgaaacgttcacagcctagggatatc**gaattc**ctttctgctatgacacttccagcaaaaggtagggcggg  
 30 ctgcgagacgggtcccggcgctgcatgcaacaccgatgatgcttcgacccccgaagctccttcggggctgcatgggcgctcc  
gatgccgtccagggcgagcgctgtttaaatagccaggccccgattgcaaagacattatagcgagctaccaaaagccatattc  
 35 aaacacctagatcactaccattctacacaggccactcgagctgtgatcgactccgctaagggggcgctcttctcttctgctt  
cagtcacaacccgcaaac**actag**ATGgccaccgcatccactttctcggcggttaatgcccgtgcggcgacctgcgtcgtc  
 40 **ggcgggctccgggccccggcgcccagcgaggccctccccgtgcgcggcgccgcccacacctgcgtccggcctgcgcgac**  
**gtggagaccgtgaagaagaccttctccccgcccgcgaggtgcacgtgcaggtgacctactcatggccccccagaagatc**  
**gagatcttcaaggccatggaggactgggcccgagaacaacatcctggtgcacctgaagaacgtggagaagtggccccagc**  
 45 **cccaggacttctgcccgacccgcctccgacgagttccacgaccagatcaaggagctgcgcgagcgccaaggagatcc**  
**ccgacgactacttctgtggtgctggtgggacatgatcaccgaggaggccctgcccacctaccagaccatgctgaacacctg**  
**ggacggcgtgcgcgacgagaccggcgctccccacctcctgggcatctggacccgcgctggacccgagggagaaccg**  
 50 **ccacggcgacccccctgaacaagtacctgtacctgtccggccgctggacatgaagcagatcgagaagaccatccagtacct**  
**gatcggctccggcatggacccccgacccgagaactccccctacctgggcttcatctacacctccttccaggagcgcgccacctt**  
 55 **catctcccacggcaacacccgcccgtggcccgcgaccacggcgacttcaagctggcccagatctgcggcaccatcgctccg**  
**acgagaagcgccacgagaccgctacaccaagatcgtggagaagctgttcgagatcgaccccgacggcaccgtgctggcc**  
**ttcggcgacatgatgaagaagaagatctccatgcccgaccacttcatgtacgacggccgacgacacaacctgttcgaccact**  
 60 **tctcctccgtggcccagcgctgggctgtacaccgccaaggactacgccgacatcctggagcacctggtgggcccgtggaa**  
**ggtggagaagctgacggcctgtccgcccaggggccagaaggcccaggactacgtgtgcggcctgccccccgcatccgccc**  
 65

5 **cctggaggagcgcgcccagatccgcgccaagcaggccccccgctgcccttctcctggatctacgaccgaggtgcagctg**  
**atggactacaaggaccacgacggcgactacaaggaccacgacatcgactacaaggacgacgacgacaagTGAatcgat**  
 10 agatctcttaaggcagcagcagctcgatagtagtacacactctggacgctggctgtgtgatggactgttgcgcccacacttgctgc  
cttgacctgtgaatatccctgccgcttttatcaaacagcctcagtggtgtttgatcttgtgtgtacgcgcttttgcgagttgctagctgctt  
gtgctatttgcgaataaccacccagcatccccttccctcgtttcatatcgcttgcacccaaccgcaacttatctacgctgtcctgcta  
 15 tccctcagcgctgctcctgctcgtcactgccccctgcacagccttggtttgggctccgctgtatttctcctggtactgcaacctgta  
aaccgactgcaatgctgatgcacgggaagtagtgggatgggaaacacaaatggaaagcttaattaagagctcttgtttccagaa  
ggagttgctccttgagcctttcattctcagcctcgataacctccaaagccgctctaattgtggaggggttcgaattaaaagcttgg  
 20 aatgttggctcgtgcgtctggaacaagcccagactgttgctcactgggaaaaggaccatcagctccaaaaaacttgccgtcaaa  
ccgctacctctgctttcgcaatctgccctgttgaaatcgccaccacattcatattgtgacgcttgagcagctgtaattgcctca  
 25 gaatgtggaatcatctgccccctgtgcgagccatgccaggcatgtcgcgggcaggacacccgccactcgtacagcagaccatt  
atgctacctcacaatagttcataacagtgacatatttctgaagctcccaacgagcacctccatgctctgagtgccaccccccg  
gccttggtgcttgcggagggcaggtcaaccggcatggggctaccgaaatccccgaccggatcccacacccccgcgatgggaag  
 30 aatctctccccgggatgtgggcccaccaccagcacaacctgctggcccaggcgagcgtaaacataaccacacaaatatccttgg  
catcgccctgaattccttctgccgctctgtaaccggtgcttctgtccgaagcaggggttgtagggatcgctccgagtcgcaaaa  
 35 cccttgcgcgtggcggggctgttgcagcttgaagagc (SEQ ID NO:101)

**EJEMPLO 52: ACEITE RICO EN MIRISTATO PRODUCIDO POR SOBREEXPRESIÓN DE UNA TIOESTERASA CUPHEA PALUSTRIS**

**[0441]** Aquí, hemos demostrado que la sobreexpresión de una tioesterasa de *Cuphea palustris* (*Cpal* FATB1, adhesión AAC49180) UTEX1435 resulta en un gran aumento de C14: 0.

**[0442]** Construcciones utilizadas para la sobreexpresión del gen *Cpal* FATB1 se optimizó por codón para la expresión en *P. moriformis* como se describe aquí. La construcción puede ser escrita como 6SA: :CrTUB2-ScSUC2-CvNR: PmAMT3- CpSAD1tpExt\_CpalFATB2FLAG\_ExtA-CvNR::6SB.

**[0443]** En esta cepa de alta miristato, el contenido de miristato era 65,70 por ciento, como se muestra en la Tabla 51, a continuación. Este es un muy gran aumento del contenido de miristato de aceite de tipo salvaje producido por la cepa de base que tiene un contenido de miristato de aproximadamente 1%.

Tabla 51. El perfil de ácidos grasos de la cepa de alto miristato.

C10:0	0,04
C12:0	1,19
C14:0	65,7
C16:0	13,55
C18:0	0,57
C18:1	12,2
C18:2	5,13
C20:0	0,05
C22:0	0,01
C24:0	0,01



[0444] La Figura 22 muestra que a 25°C, el contenido de grasa sólida es más del 80%. A 25°C, el aceite de cepa base no tiene o tiene poca grasa sólida. Como comparación, el contenido de grasa sólida de un aceite refinado, blanqueado, desodorizado (RBD-3), como se muestra en la Figura 4, se reproduce. RBD-3 es el aceite de una cepa de *P. moriformis* por ingeniería genética para producir altas cantidades de C16: 0. El constructo de la alta cepa productora C16: 0 se puede escribir como 6SA-BTub-Inv-nr::Amt03-Ch16TE Nativo-nr-6SB. Este constructo codifica para una tioesterasa *Cuphea hookeriana* que prefiere C16: 0.

#### EJEMPLO 53: ACEITE RICO EN MIRISTATO PRODUCIDO POR SOBREEXPRESIÓN DE UNA TIOESTERASA DE *CUPHEA PALUSTRIS*

[0445] Aquí, hemos demostrado que la sobreexpresión de una tioesterasa de *Cuphea palustris* (*Cpal* FATB2, adhesión AAC49180) en los resultados de UTEX1435 en un gran aumento de C14: 0 de producción (más del 60% del perfil de ácido graso).

[0446] Construcciones utilizadas para la sobreexpresión del gen FATB2 *Cpal* se optimizó por codón para la expresión en *P. moriformis* como se describe aquí. *Cuphea palustris* FATB2 es una tioesterasa que prefiere C14. Dos construcciones, ambas codificando el gen *Cpal* de FATB2, se prepararon. La primera construcción, pSZ2479, se puede escribir como 6SA::CrTUB2-ScSUC2-CvNR: PmAMT3-CpSAD1tpExt-CpalFATB2ExtA-CvNR::6SB. La secuencia codificante de FatB2 se da como SEQ ID NO: 86 y la secuencia de aminoácidos se da como SEQ ID NO: 87. El segundo constructo, pSZ2480 puede escribirse como 6SA::CrTUB2- ScSUC2-CvNR: PmAMT3-CpSAD1tpExt-CpalFATB2FLAG- exta-CvNR::6SB. La secuencia de ácido nucleico y secuencia de aminoácidos se dan como SEQ ID NO: 88 y SEQ ID NO: 89.

[0447] *P. moriformis* transformado con pSZ2480 produce altos niveles de ácido mirístico. El contenido de miristato fue 65,70 por ciento. Esto es un incremento muy grande en comparación con el contenido de miristato de aceite de tipo salvaje producido por la cepa de base, que tiene un contenido de miristato de aproximadamente 1%.

[0448] El perfil de ácidos grasos de la cepa de alto miristato se muestra en la Tabla 52 a continuación.

Tabla 52. Perfil de ácido graso de la cepa de alto miristato.

Ácido graso	%
C10:0	0,04
C12:0	1,19
C14:0	65,7
C16:0	13,55
C18:0	0,57
C18:1	12,2
C18:2	5,13
C20:0	0,05
C22:0	0,01
C24:0	0,01

#### EJEMPLO 54: PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EICOSENOICO Y ERÚCICO

[0449] En este ejemplo demostramos que la expresión de la elongasa de ácido graso heterólogo (FAE), también conocido como 3- cetoacil-CoA sintasa (KCS), los genes de *Cramble abyssinica* (*CaFAE*, N° de acceso: AY793549), *Lunaria annua* (*LaFAE*, ACJ61777), y *Cardamine graeca* (*CgFAE*, ACJ61778) conduce a la producción de ácidos grasos de cadena monoinsaturada muy larga tales como ácidos eicosenoico (20: 1 $\Delta^{11}$ ) y erúcico (22: 1 $\Delta^{13}$ ) en derivado mutagenizado clásicamente de UTEX 1435, cepa Z. Por otro lado un gen putativo FAE de *Tropaelum majus* (*TmFAE*, ABD77097) y dos genes FAE de *Brassica napus* (*BnFAE1*, AAA96054 y *BnFAE2*, AAT65206), mientras que resulta un aumento modesto en eicosenoico (20: 1 $\Delta^{11}$ ), no produjo ningún ácido erúcico detectable en cepa Z. Curiosamente el perfil de ácidos grasos insaturados obtenido con la expresión heteróloga de *BnFAE1* en la cepa Z resultó en un incremento notable en ácido docosadienoico (22: 2n6). Todos los genes se optimizaron por codones para reflejar uso de codones UTEX 1435. Estos resultados sugieren que genes *CaFAE*, *LaFAE* o *CgFAE* codifican condensación de enzimas implicadas en la biosíntesis de cadena muy larga utilizando grasas monoinsaturadas y sustratos de acilo saturada, con capacidad específica para mejorar el contenido de ácido eicosenoico y erúcico.

[0450] Construcción utilizada para la expresión de la elongasa de ácidos grasos *Cramble abyssinica* (*CAFAE*) en *P. moriformis* (UTEX 1435 cepa CEPA Z)-[pSZ3070]: En este ejemplo cepas CEPA Z, transformadas con el constructo pSZ3070, fueron generadas, que expresan sacarosa invertasa (permitiendo su selección y crecimiento en un medio que contiene sacarosa) y *C. abyssinica* gen FAE. Constructo pSZ3070 introducido para la expresión en la cepa Z se puede escribir como 6S::CrTUB2-ScSUC2-Cvnr:PmAmt03-CAFAE-Cvnr::6S.

**[0451]** La secuencia del ADN transformante se proporciona a continuación. Sitios de restricción relevantes en el constructo se indican en minúsculas, negrita, y son de 5'-3' *Bsp*QI, *KPM*I, *Xba*I, *Mfe*I, *Bam*HI, *Eco*RI, *Spe*I, *Afl*II, *Sac*II, *Bsp*QI, respectivamente. Sitios *Bsp*QI delimitan el 5' y 3' del ADN transformante, secuencias minúsculas en negrita representan ADN genómico de la cepa Z que permiten integración dirigida en el locus 6S a través de recombinación homóloga. Procediendo en la dirección 5' a 3', *C. reinhardtii* promotor  $\beta$ -tubulina de conduce a la expresión de la *Saccharomyces cerevisiae* gen *suc2* (que codifica actividad de hidrólisis de la sacarosa, permitiendo de este modo que la cepa crezca en sacarosa) se indica mediante letras minúsculas, texto en caja. El iniciador ATG y el terminador TGA para *SUC2* se indican mediante cursiva y en mayúsculas, mientras que la región de codificación está indicad con letra cursiva en minúsculas. *Chlorella vulgaris* nitrato reductasa (*NR*) gen 3' UTR se indica mediante texto en minúsculas subrayado seguido por un promotor endógeno de *AMT3 P. moriformis*, indicado por el texto en cursiva en caja. Los codones ATG iniciador y terminador TGA de la *CAFAE* se indican con mayúsculas, negrita y cursiva, mientras que el resto del gen se indica mediante negrita y cursiva. *C. vulgaris* nitrato reductasa 3' UTR se indica de nuevo por minúsculas texto subrayado seguido por la región genómica Z 6S deformación indicada por, texto minúsculas en negrita. La construcción final se secuenció para asegurarse de marcos de lectura correcto y secuencias de direccionamiento.

**[0452]** Secuencia de nucleótidos del ADN transformante contenido en el plásmido pSZ3070:

gtcttctgccgcccactctgtctcgagcgcgccgcgctgcgcgccagcgccttggccttttcgcccgcctcgtgcgcgtcgtgatgt  
 ccatcaccagggtccatgaggtctgccttgcgcggctgagccactgcttcgtccggcgccaagaggagcatgaggaggactcctggt  
 ccagggtcctgacgtggtcgcggctctgggagcgggccagcatcatctggctctgccgaccgagggcgcctccaactggctcctcagca  
 gccgcagtcgccgccgacctggcagaggaaagacaggtgagggggggtatgaattgtacagaacaaccacgagccttgtctaggcagaa  
 tccctaccagtcattggctttacctggatgacggcctgcgaacagctgtccagcgacctcgtgcgcgcgttctcccgcacgcttcttcca  
 gcaccgtgatggcgcgagccagcgccgcacgtggcgctgcgcttcgccgatctgaggacagtcggggaaactctgatcagtcctaaaccc  
 ctgtgcgcttagtggttccatcctttgcagaccggtagagccgactgtgtgcgccacccccacaccacctctccagaccaattctgt  
 caactttttggcgaaggcatcggcctcggcctgcagagaggacagcagtgcccagccgctgggggttggcggtgcacgctcaggtacc  
 ttcttgcgctatgacacttccagcaaaaggtagggcgggctgcgagacggcttccggcgctgcatgcaacaccgatgatgcttcgacccccg  
 aagctccttcggggctgcatgggcgtccgatccgcctccagggcgagcgcgtgtttaaatagccaggcccccgattgcaaagacattatagcgag  
 ctaccaaaagccataftcaaacacctagatcactaccacttctacacaggccactcagacttggatcgcactccgctaagggggcgcccttctctt  
 cggttcagtcacaaccgcgaactctagaatatcaATGctgtgcaggecttctgttctgtgtggcggttcgcgcgccaaagatcagcgctcc  
 atgacgaacgagacgtccgaccgccccctgggtgcacttcaccccccaacaagggctggatgaacgacccccaacggcctgtgtgtacgacgag  
 aaggacgccaaagtggcacctgtacttccagtacaaccggaacgacaccgtctgggggacgcccctgttctggggccacgccacgtccgacg  
 acctgaccaactgggaggaccagccatcgccatcgccccgaagcgcaacgactccggcgcttctccggctccatggtgtgtgactacaa  
 caacacctccggcttcttcaacgacaccatcgaccgcgccagcgctgcgtggccatctggacttacaacacccccggagtcgaggagcagt  
 acatctctacagcctggacggcggtacaccttcaccgagtaccagaagaacccccgtgctggccgccaactccaccagttccgcgacccg  
 aaggtcttctgtgtacgagccctccagaagtgtgatcatgaccggcgcaagtcceaggactacaagatcgagatctactctccgacgacctg  
 aagtccttgaagctggagtcgcgttcgccaacgaggggcttctcggtaccagtcagagtgccecgggcctgatcgagggtcccaaccgagca  
 ggacccccagcaagtcctactgggtgatgttcatctccatcaaacccccggcgccccggcgggcgctcttcaaccagctacttcgtcggcagcttc

aacggcaccacttcgaggccttcgacaaccagtcgccgctgggtgacttcggcaaggactactacgccctgcagaccttcttaacaccgac  
 ccgacctacgggagcgccttgggcatcgctgggctccaactgggagctactccgcttcgtgcccaccaacccctggcgctcctccatgtcc t  
 5 ctcgtgcgaagtctccctcaacaccgagctaccaggccaacccggagacggagctgatcaacctgaaggccgagccgatcctgaacatca  
 gcaacgcccggccctggagccggttcgccaccaacaccacgttgacgaaggccaacagctacaacgtcgacctgtccaaacagcaccggca  
 ccttgaggttcgagctgggttacgccgtaacaccaccagacgatctcaagtccgtgttcgggacctctccctctgggttaaggccctgga  
 10 ggaccccgaggagctacccgcatgggcttcgagggttcgctcctcttcttcctggaccgcgggaacagcaaggtgaagttcgtgaagga  
 gaaccctacttaccacacccgcatgagcgtgaacaaccagcccttcaagagcgagaacgacctgtcctactacaagggttacggcttctgtg  
 accagaacatcctggagctgtacttcaacgacggcgagctcgtgtccaccaacacctacttcatgaccaccgggaacgccttgggctccgtg  
 15 aacatgacgacgggggtgacaacctgttctacatcgacaagttccaggtgcgcgagggtcaag **TGAcaattggcagcagcagctcggata** ]  
 gtatcgacacactctggacgctggctgtgatggactgttgcgccacacttgccttgacctgtgaatatccctgccgctttatcaaacagccctc  
 agtgtgtttgatcttgtgttacgcgcttttgcgagttgctagctgcttgtgctatttgcgaataaccacccccagatcccccttccctggttcatatcgctt ]  
 20 gcatcccaaccgcaacttatctacgctgtcctgctatccctcagcgctgctcctgctcctgctcactgccccctgcacagccttggtttgggctccgcc  
 tgtattctcctggtactgcaacctgtaaaccagcactgcaatgctgatgcacgggaagtagtgggatgggaacacaaatggaggatcccgctctc  
 gaacagagcgcgcagaggaacgctgaaggtctgcctctgtgcacctcagcgcggcatacaccacaataaccacctgacgaatgcgcttggtt  
 25 ctctgctcattagcgaagcgtccggttcacacacgtgccacgttggcgaggtggcaggtgacaatgatcggtggagctgatgtcgaaacgttcac  
 agcctagggatatcgaattcggccgacaggacgcgcgtcaaaagggtgctggtcgtgtatgccctggccggcaggtcgttgcctgctggttagt  
 gattccgcaacctgattttggcgtcttattttggcggtggcaaacgctggcgcccgagccggggccggcgatggggtgccccacggctg t  
 30 ccggaatccaaggaggcaagagcgcgggggtcagttgaagggtttacgcgcaagggtacagccgctcctgcaaggctcgtggtggaatt  
 ggacgtgcaggtcctgctgaagttcctcaccgcctcaccagcggacaaagcaccgggtgtatcaggtccgtgtcatccactctaaagaactcg 3  
 actacgacctactgatggccctagatttctcataaaaacgcctgagacacttgcacaggattgaaactccctgaagggaaccaccagggggcc t  
 35 ctgagttgttcttcccccggtggcgagctgccagccaggctgtacctgtgatcgaggctggcggaataaggcttctgtgtctcaggtcatgg  
 gaggtgcaggacagctcatgaaacgccaacaatcgacaaattcatgtcaagctaatacagctatttctcttcacgagctgtaattgtcccaaaa  
 40 ttctggtctaccgggggtgatcttctgttacgggccccttccctcaacctaggtatgcgcgcatgcggtcgccgcgaactcgcgcgagggcc  
 gaggggttgggacgggcccgaatgcagttgcacccggatgcgtggcacctttttgcgataatttatgcaatggactgctctgcaaaatt  
 ctggctctgtgccaaacctaggtacagcggcgtaggatttctgaatcattctgctgatggggagctaccgactaccctaataatcagccgact  
 45 gcctgacgccagcgtccacttttgtgcacacattccattcgtgccaaagacatttcatttgggtgcgaagcgtccccagttacgtcacctgtttcc  
 cgacctcttactgttctgtcgacagagcggggcccacaggccggtcgacgcc actagtATGacctccatcaacgtgaagctgctgtacc  
 50 actacgtgatccaacctgttcaacctgtgtcttcttccccctgaccgccatcgtggccggcaaggcctcccgcctgaccatcgacg  
 acctgcaccacctgtactactctacctgcagcacaacgtgatcaccatcgccccctgttcgecttaccgtgttcgggtccatcct  
 gtacatcgtgaccgccccaaagcccggtgtacctggtggagtactcctgtacctgccccccaccagtgccgctcctccatctccaa  
 55 ggtgatggacatcttctaccaggtgcgaaggccgaccccttcgcaacggcacctgcgacgactcctcctggttggacttctgc  
 gcaagatccaggagcgtccggcctgggcgacgagaccacggccccgagggcctgctgcaggtgccccccgcaagacctt  
 cgccgcccccgagggagaccgagcaggtgatcgtgggcgcccctgaagaacctgttcgagaacaccaaggtgaaccccaa  
 60 ggacatcggcatcctggtggtgaactctccatgttcaacccccccccctcctgtccgcatggtggtgaacaccttcaagctgcg  
 ctccaacgtgcgtccttcaacctggggcgcatgggctgtccgcggcggtgatcgccatcgacctggccaaggacctgtgcac  
 65

gtgcacaagaacacctacgcctgggtggtgccaccgagaacatcacctacaacatctacgcggcgacaaccgctccatgatg  
 5 gtgtccaactgcctgttccgcgtgggcggcgccgccatcctgtgtccaacaagccccgcgaccgcccgcgtccaagtacgagc  
 tgggtcacaccgtgcgcacccacacggcgccgacgacaagtccttccgtgcgtgcagcaggcgacgacgagaacggcaa  
 gaccggcggtgtccctgtccaaggacatcacggaggtggccggccgacccgtgaagaagaacatcgccaccctgggccccctga  
 10 tctgtccccgtgccgagaagctgtgttcttctgtgaccttcatggccaagaagctgttcaaggacaagggtgaagcactactacgtgc  
 ccgacttcaagctggccatcgaccacttctgcatccacggcgccgcccgcgtgatcgacgtgctggagaagaacctggggcc  
 tggcccccatcgacgtggaggcctcccgtccaccctgcaccgcttcggcaacacctcctcctccatctggtacgagctggcct  
 15 acatcgaggccaagggcgcatgaagaagggcaacaagggtgtggcagatgccctgggctcgggttcaagtgaactccgc  
 cgtgtgggtggccctgtccaacgtgaaggcctccaccaactccccctgggagcactgcatcgaccgctaccccgtaagatcgac  
 20 tccgactccgccaagtccgagacccgcgccagaacggccgctccTGActtaaggcagcagcagctcgatagtagtacacactct  
ggacgctggtcgtgatggactgtgccccacacttgccttgacctgtgaatatccctgccgctttatcaaacagcctcagtggtttgatcttg  
tgtgtacgcgcttttgcgagttgctagctgctgtgctatttgcgaataccacccccagcatccccctccctcgtttcatatcgcttgcacccaaccgca  
 25 acttatctacgctgtcctgctatccctcagcgtgctcctgctcctgctcactgccctcgcacagccttggttgggctccgctgtattctcctgttac  
tgaacctgtaaacagcactgcaatgctgatgcacgggaagtagtgggatgggaacacaatggaaagcttaattaagagctcttgtttccaga  
 aggagttgctccttgagcctttcatctcagcctcgataacctccaaagccgctctaattgtggaggggggttcgaatttaaaagcttgggaatg  
 30 ttggttcgtgcgtctggaacaagcccagacttgttgcctactgggaaaaggacatcagctccaaaaaacttgcgctcaaaccgctacc  
 tctgctttcgcgcaatctgccctgttgaatcgccaccacattcatattgtgacgcttgagcagctgtgaattgcctcagaatgtggaatcate  
 tgcctcctgtgcgagcccatgccaggcatgtcgggggcaggacacccgccactcgtacagcagaccattatgctacctcacaatagttea  
 35 taacagtgaccatatttctcgaagctcccaacgagcactccatgctctgagtgggcaccccccggccctgggtgcttgcggagggcaggt  
 caaccggcatggggctaccgaaatccccgaccggatccaccacccccgcgatgggaagaatcttccccgggatgtggccccaccacc  
 agcacaacctgctggcccaggcgagcgtcaaaccataccacacaatatccttggcatcgccctgaattctcttccgctctgctaccgg  
 40 gtgcttctgtccgaagcaggggttctagggatcgtccgagtcgcaaaccttgtgcgtggcggggcttctcagcttgaagagc  
 (SEQ ID NO:102)

**[0453] Construcciones utilizadas para la expresión de los genes FAE de plantas superiores en la cepa Z:**  
 Además del gen *CaFAE* (pSZ3070), *LaFAE* (PSZ3071) a partir de *Lunaria annua*, *CgFAE* (pSZ3072) a partir de  
*Cardamine graeca*, *TmFAE* (PSZ3067) *majus* y *BnFAE1* (PSZ3068) y *BnFAE2* (pSZ3069) genes de *Brassica napus*  
 se han construido para la expresión en CEPA Z. Estas construcciones se pueden describir como:

pSZ3071 - 6S::CrTUB2-ScSUC2-Cvnr: PmAmt03-LaFAE-Cvnr::6S  
 pSZ3072 - 6S::CrTUB2-ScSUC2-Cvnr: PmAmt03-CgFAE- Cvnr::6S  
 pSZ3067 - 6S::CrTUB2-ScSUC2-Cvnr: PmAmt03-TmFAE-Cvnr::6S  
 pSZ3068 - 6S::CrTUB2-ScSUC2-Cvnr: PmAmt03-BnFAE1-Cvnr::6S  
 pSZ3069 - 6S::CrTUB2-ScSUC2 -Cvnr: PmAmt03-BnFAE2-Cvnr::6S

**[0454]** Todas estas construcciones tienen el mismo esqueleto del vector; marcador seleccionable, los promotores, y  
 3' UTR como pSZ3070, que sólo difieren en los respectivos genes FAE. sitios de restricción relevantes en estas  
 construcciones son también los mismos que en pSZ3070. Las secuencias de *LaFAE*, *CgFAE*, *TmFAE*, *BnFAE1* y  
*BnFAE2* se muestran abajo. sitios de restricción relevantes como texto en negrita que incluye *Speyo* y *afIII* se muestran  
 5'-3', respectivamente. Secuencia de nucleótidos de *ña FAE* contenida en pSZ3071:

actagtATGacctccatcaacgtgaagctgctgtaccactacgtgatccaaacttctcaacctgtgcttctccccctgaccgccat  
 5 cctggccggcaaggectcccgcctgaccaccaacgacctgcaccacttctactctactgcagcacaacctgateacctgacc  
 ctgctgttcgcttcaccgtgttcggctccgtgctgtacttcgtgacccgccccaaagcccgtgtacctggtggactactctgtacctg  
 cccccccagcactgttcgcccggcatctccaagaccatggagatcttctaccagatccgcaagtcgacccccctgcgcaacgtgg  
 10 ccttgagcactctctccttgacttctgcgcaagatccaggagcgtccggcctgggcgacgagacctacggccccgagg  
 gctgttcgagatccccccccgcaagaacctggcctccgcccgcgaggagaccgagcaggtgatcaacggcgccctgaagaa  
 cctgttcgagaacaccaaggtgaacccccaggagatcggcatctggtggtgaactctccatgttcaacccccccccctcctgt  
 15 ccgccatggtggtgaacacctcaagctgcgctccaacatcaagtccttcaacctgggcggcatgggctgctccgcccggcgtgatc  
 gccatgcacctggccaaggacctgtgcacgtgcacaagaacacctacgccctggtggtgtccaccgagaacatcacccagaa  
 catctacaccggcgacaaccgctccatgatggtgtccaactgcctgttccgctgggcggcgccgccatcctgtgtccaacaagc  
 20 ccggcgaccgccgcgctccaagtaccgctggccccacaccgtgcgcacccacacggcgccgacgacaagtcttcggctgc  
 gtgcgccaggaggaggacgactccggcaagaccggcgtgtccctgtccaaggacatcacggcggtggccggcatcacctgtc  
 25 agaagaacatcacccctgggccccctggtgctgcccctgtccgagaagatcctgttcgtggtgaccttcgtggccaagaagct  
 gctgaaggacaagatcaagcactactacgtgcccgaacttcaagctggcctggaccacttctgcatccacgcggcgggcgcg  
 30 cgtgatcgacgtgctggagaagaacctgggcctgtccccatcgacgtggaggcctcccgtccacctgcaccgcttcggcaac  
 acctctctctctccatctggtacgagctggcctacatcgaggccaagggccgcatgaagaagggaacaaggcctggcagatc  
 gccgtgggtcctcggttcaagtgcactccgctgtgggtggcctgcgcaacgtgaaggcctccgcaactccccctgggagc  
 35 actgcatccacaagtacccccgtgcagatgtactccggctctccaagtccgagaccgcgcccagaacggccgctccTGActta  
ag (SEQ ID NO:103)

Secuencia de nucleótidos de CgFAE contenida en pSZ3072:

actagtATGacctccatcaacgtgaagctgctgtaccactacgtgctgaccaacttctcaacctgtgcttctccccctgaccgcctt  
 45 cccccgccggcaaggectcccagctgaccaccaacgacctgcaccactgtactctactgcaccacaacctgatcacctgac  
 cctgtgttcgcttcaccgtgttcggctccatcctgtacatcgtgacccgccccaaagcccgtgtacctggtggactactctgtacc  
 50 tgcccccccgccacctgtcctgcggcatctccgcgtgatggagatcttctacgagatccgcaagtcgacccccctccgcgaggtg  
 ccttcgacgacccccctctccctggagttcctgcgcaagatccaggagcgtccggcctgggcgacgagacctacggccccag  
 55 ggctggtgcacgacatgccctgcgcatgaacttcgcgcgcccgcgaggagaccgagcaggtgatcaacggcgccctgga  
 gaagctgttcgagaacaccaaggtgaacccccgcgagatcggcatcctggtggtgaactctccatgttcaacccccccccctcc

ctgtccgcatggtggtgaacaccttcaagctgcgtccaacatcaagtccttccctgggcgccatgggctgctcgccggcacc  
 5 atcgccatcgacctggccaaggacctgctgcacgtgcacaagaacacctacgccctgggtggtgccaccgagaacatcacccac  
 tccacctacaccggcgacaaccgctccatgatggtgtccaactgcctgttccgcatgggcgggcgccgcatcctgctgtccaaca  
 ggccggcgaccggcgccgctccaagtacaagctggcccacaccgtgcgcacccacaccggcgccgacgaccagtccttccgct  
 10 gctgtcgccaggaggacgacgaccggcggaagatggcggtgtgctgtccaaggacatcaccgctggcgccggaagaccgt  
 gaccaagaacatcgccacctggggccccctgggtgctccccctgtccgagaagtctgtacgtggtgtccctgatggccaagaag  
 ctgttcaagaacaagatcaagcacacctacgtgcccgaacttcaagctggccatcgaccacttctgcatccacggcgccgcccgcg  
 15 ccgtgatcgacgtgtggagaagaacctggccctgtccccctggacgtggaggcctcccgctccacctgcaccgcttccgcaa  
 cacctcctcctcctccatctggtacgagctggcctacatcgaggccaagggcgcatgaagaagggcaacaaggtgtggcagat  
 20 cgccatcggtcctggcttcaagtgaactccgccgtgtgggtggccctgtgtcaacgtgaagccctccgtgaactccccctgggag  
 cactgcatcgaccgtaccccggtggagatcaactacggctcctccaagtcgagaccgcgcccagaacggccgctccTGActt  
aag (SEQ ID NO:104)

Secuencia de nucleótidos de *TmFAE* contenida en pSZ3067:

actagtATGtccggcaccaaggccacctccgtgtccgtgccccgtcccgacttcaagcagtcctgaacctgaagtacgtgaagc  
 30 tgggtaccactactccateacccaagccatgtacctgttccgtacccccctgctgctgatcatgtccgcccagatctccaccttcc  
 atccaggacttccaccacctgtacaaccacctgacctgcacaacctgtctccctgacctgtgcatcgccctgctgttctgtgt  
 gacctgtacttctgacccgccccacccccgtgtacctgtgaacttctcctgtacaagccccgacgcatccacaagtgcgacc  
 35 gccgcccgttcatggacaccatccgcgcatgggcacctacaccgaggagaacatcgagttccagcgcaaggtgtggagcgc  
 tccggcatcgcgagtcctctacctgccccccacgtgttcaagatcccccccggtgtacgacgccgaggagcgcgccgag  
 gccgagatgtgatgttcggcgccgtggacggcctgttcgagaagatctcgtgaagccaaccagatcgcgctgtgtggtga  
 40 actgcccgtgttcaacccatccccctcctgtctccatgatcgtgaaccgtacaagatcgcgcgcaacgtgttctctacaacct  
 gggcgccatgggctgctccgcccggctgatctccatcgacctggccaaggacctgtgcaggtgcgccccaaactctacgccctg  
 45 gtggtgtccctggagtgcattccaagaacctgtacctggcgagcagcgtccatgctggtgtccaactgcctgttccgcatgggc  
 ggcgccgcatcctgtgtccaacaagatgtccgaccgtggcgctccaagtaccgctggtgcacaccgtgcgcacccacaag  
 ggcaccgaggacaactgttctcctgctgacctgcccgaaggaggactccgacggcaagatcgcatctccctgtccaagaacctg  
 50 atggccgtggcgccgacgccctgaagaccaacatcacccctgggccccctgggtgtgcccattgctcgagcagctgtgttctt  
 cgccacctggtgggcaagaaggtgttcaagatgaagctgcagccctacatccccgacttcaagctggccttcgagcacttctgc  
 atccacgccggcgccgcgcccgtgtggacgagctggagaagaacctgaagctgtctcctggcacatggagccctcccgcat  
 55 gtccctgtaccgcttcggcaacacctctctcctcctgtgtgtacgagctggcctactccgaggccaagggcgcatcaagaagg  
 gcgaccgcgtgtggcagatcgcttccggctcggcttcaagtgaactccgccgtgtggaaggccctgcgcaacgtgaaccccg  
 ccgaggagaagaacccctggatggacgagatccacctgttccccgtggaggtgcccctgaacTGActtaag (SEQ ID  
 60 NO:105)

Secuencia de nucleótidos de *BnFAE1* contenida en pSZ3068:

actagtATGacctccatcaacgtgaagctgctgtaccactacgtgatccaaacctgttcaacctgtgtcttctccccctgaccgccc  
 atcgtggccggcaaggcctacgtgaccatcgacgacctgcaccacctgtactactcctacctgcagcacaacctgatcaccatcg  
 5 cccccctgtggccttcacctgttctggctccgtgctgtacatcgccacccgccccaaagcccggttacctgggtgagtagtactctgcta  
 cctgccccccacccactgcccgtctctccatctccaaggtgatggacatcttctccagggtgcgaaggccgacccccccgcaacg  
 gcacctgcgacgactcctctggctggacttctgcgaagatccaggagcgctccggcctggggcgacgagacccacggcccc  
 10 gagggcctgtcgcaggtgccccccgcaagaccttcgcccgcgcccgcgaggagaccgagcaggtgatcatcggcgccttgg  
 agaacctgttcaagaacaccaacgtgaaccccaaggacatcggcacatcctgggtggaactcctccatgttcaacccccccccctc  
 15 cctgtccgccatgggtggaacaccttcaagctgcgtccaaacctgcgtccttcaacctggggcgcatgggctgtcgcgcccgcg  
 tgatcgccatcgacctggccaaggacctgtcgcacgtgcacaagaacacctacgccctgggtggtgtccaccgagaacatcacct  
 acaacatctacgcccggcgacaaccgctccatgatgggtgtccaaactgcctgttccgctggggcgggcgccgcatcctgtgtccaac  
 20 aagccccgcgaccgcccgcgtccaaagtacgagctgggtgcacaccgtgcgcacccacacccggcgccgacgacaagtccttcc  
 gctgcgtgcagcagggcgacgacgagaacggccagaccggcggtgtccctgtccaaggacatcacggacgtggccggccgcac  
 25 cgtgaagaagaacatcgccacccctgggccccctgatcctgccccctgtccgagaagctgctgttcttctgtgaccttcatgggcaaga  
 agctgttcaaggacgagatcaagcactactacgtgcccgaacttcaagctggccatcgaccacttctgcacccacgcccggcgga  
 ggccgtgatcgacgtgtggagaagaacctgggctggcccccatcgacgtggaggcctcccgtccacccctgcaccgcttcgg  
 30 caacacctctctctctccatctggtacgagctggcctacatcgagcccaagggcgcatgaagaagggcaacaaggtgtggca  
 gatcgccctgggctccggcttcaagtgcactccgctgtgggtggccctgaacaacgtgaaggcctccaccaactccccctgg  
 gagcactgcacgaccgctaccccgtaagatcgactccgactccggcaagtccgagaccgctgcccacggccgctccTG  
 35 Acttaag (SEQ ID NO:106)

Secuencia de nucleótidos de *BnFAE2* contenida en pSZ3069:

actagtATGgagcgaccaactccatcgagatggaccaggagcgctgaccgccgagatggccttaaggactcctcctccgc  
 cgtgatccgcacccgcgcgcctgcccgaacttctgacccctgtaagctgaagtacgtgaagctgggcctgcacaactccttca  
 5 acttcaccacacttctgttctgtgatcactcctgcccctgaccggcaccgtgctggtgcagctgaccggcctgaccttcgagaccttc  
 tccgagctgtggtacaaccacgccgcccagctggacggcgtagcccgctggcctgacctggtgtccctgtcttctgtctgatcact  
 tactgaccaaccgctccaagcccgtgtactggtggacttctcctgtctacaagcccaggagcagagcgcaagatgtccgtggact  
 10 ccttcctgaagatgaccgagcagaacggcgccctcaccgacgacaccgtgcagttccagcagcgcatcccaaccgcgcgggc  
 ctgggcgacgagacctactgccccgcggcatcacctccaccccccaagctgaacatgtccgagggccgcgcgaggccga  
 ggccgtgatgttcggcgccctggactccctgttcgagaagaccggcatcaagcccgcgagggtggccatcctgatcgtgtctgtct  
 15 ccctgttcaacccccccccctccctgtccgcatgatcgtgaaccactacaagatgcgcgaggacatcaagtcctacaacctggg  
 cggcatggggtgtccgcggcctgatctccatcgacctggccaacaacctgtgaaggccaacccccaaactcctacgccgtggtg  
 20 gtgtccaccgagaacatcacctgaactggtacttcggcaacgaccgctccatgctgtgtgcaactgcatcttcgcatgggcgg  
 cgccgccatcctgtgtccaaccgcgcgcaggaccgctccaagtccaagtacgagctggtgaacgtggtgcgcaccacacaagg  
 gctccgacgacaagaactacaactgcgtgtaccagaaggaggacgagcgcgccaccatcgccgtgtccctggccgcgagct  
 25 gatgtccgtggccggcgacgccctgaagaccaacatcacccctgggccccatggtgtgtccctgtccggccagctgatgttct  
 ccgtgtccctggtgaagcgcaagctgtgaagctgaaggtgaagccctacatccccgaacttcaagctggccttcgagcacttctgc  
 30 atccacgccggcgccgcgcgctgctggacgaggtgcagaagaacctggacctggaggactggcacatggagccctcccgca  
 tgacctgcaccgcttcggcaacacctcctcctcctcctcctgtggtacgagatggcctacaccgaggccaagggccgcgtgaaggg  
 cggcgaccgcctgtggcagatcgcttcggctcggcttcaagtgaactccgccgtgtggaaggccctgcgcgtggtgtccacc  
 35 gaggagctgaccggcaacgcctgggcccggctccatcgagaactaccccgctgaagatcgtgcagTGActtaag (SEQ ID  
 NO:107)

**[0455]** Para determinar su impacto sobre los perfiles de ácidos grasos, las construcciones anteriores que contienen diversos genes heterólogos FAE, dirigido por el promotor PmAMT3, se transformaron independientemente en CEPA Z.

**[0456]** Los transformantes primarios fueron purificados clonalmente y cultivados bajo condiciones de producción de lípidos estándar a pH 7,0 (todos los plásmidos requieren crecimiento a un pH de 7,0 para permitir la máxima expresión del gen FAE cuando impulsado por el pH promotor PmAMT03 regulada). Los perfiles resultantes de un conjunto de clones representativos derivados de transformaciones con pSZ3070, pSZ3071, pSZ3072, pSZ3067, pSZ3068 y pSZ3069 en la cepa Z se muestran en las Tablas 53-58, respectivamente, a continuación.

**[0457]** Todas las cepas CEPA Z transgénicas que expresan genes heterólogos FAE muestran un aumento de la acumulación de C20: 1 y C22: ácido graso de 1 (véanse las Tablas 53-58). El aumento en niveles de ácidos eicosenoico (20: 1<sup>Δ11</sup>) y erúico (22: 1<sup>Δ13</sup>) sobre el tipo salvaje es consistentemente más alto que los niveles de tipo salvaje. Además, el perfil de ácido graso insaturado obtenido con la expresión heteróloga de BnFAE1 en la cepa Z resultó en incremento notable en ácido docosadienoico (C22: 2n6). alineación de proteínas de mencionada FAE expresada en la cepa Z se muestra en la Figura 23.



Tabla 53. Perfil de ácidos grasos insaturados en las líneas transgénicas de derivados representativos transformados con ADN pSZ3070 (CAFAE) CEPA Z.

Muestra ID	C18:1	C18:2	C18:3a	C20:1	C22:1	C22:2n6	C22:5
CEPA Z; T588; D1828-20	51.49	9.13	0.65	4.35	1.24	0.11	0.00
CEPA Z; T588; D1828-23	55.59	7.65	0.50	3.78	0.85	0.00	0.13
CEPA Z; T588; D1828-43	54.70	7.64	0.50	3.44	0.85	0.09	0.00
CEPA Z; T588; D1828-12	52.43	7.89	0.59	2.72	0.73	0.00	0.00
CEPA Z; T588; D1828-19	56.02	7.12	0.52	3.04	0.63	0.10	0.11
Cntrl CEPA Z pH 7	57.99	6.62	0.56	0.19	0.00	0.06	0.05
Cntrl CEPA Z pH 5	57.70	7.08	0.54	0.11	0.00	0.05	0.05

Tabla 54. Perfil de ácidos grasos insaturados en CEPA Z y las líneas transgénicas de derivados representativos transformados con ADN pSZ3071 (LaFAE)

Muestra ID	C18:1	C18:2	C18:3a	C20:1	C22:1	C22:2n6	C22:5
CEPA Z; T588; D1829-36	54.66	7.04	0.52	1.82	0.84	0.12	0.09
CEPA Z; T588; D1829-24	56.27	6.72	0.51	1.70	0.72	0.09	0.00
CEPA Z; T588; D1829-11	56.65	8.36	0.54	2.04	0.67	0.00	0.00
CEPA Z; T588; D1829-35	55.57	7.71	0.53	0.10	0.66	0.00	0.00
CEPA Z; T588; D1829-42	56.03	7.06	0.54	.54	0.51	0.06	0.08
Cntrl CEPA Z pH 7	57.70	7.08	0.54	0.11	0.00	0.06	0.05
Cntrl CEPA Z pH 5	57.99	6.62	0.56	0.19	0.00	0.05	0.05

Tabla 55. Perfil de ácidos grasos insaturados en CEPA Z y las líneas transgénicas de derivados representativos transformadas con ADN pSZ3072 (CgFAE)

Muestra ID	C18:1	C18:2	C18:3a	C20:1	C22:1	C22:2n6	C22:5
CEPA Z; T588; D1830-47	57.74	7.79	0.52	1.61	0.25	0.11	0.05
CEPA Z; T588; D1830-16	58.06	7.39	0.55	1.64	0.22	0.07	0.06
CEPA Z; T588; D1830-12	57.77	6.86	0.51	1.34	0.19	0.09	0.00
CEPA Z; T588; D1830-37	58.45	7.54	0.49	1.65	0.19	0.06	0.00
CEPA Z; T588; D1830-44	57.10	7.28	0.56	1.43	0.19	0.07	0.00
Cntrl CEPA Z pH 7	57.70	7.08	0.54	0.11	0.00	0.06	0.05
Cntrl CEPA Z pH 5	57.99	6.62	0.56	0.19	0.00	0.05	0.05

Tabla 56. Perfil de ácidos grasos insaturados en S3067 y líneas transgénicas derivadas representativas transformadas con ADN pSZ3070 (TmFAE). No se detectaron picos de ácido erúico (22: 1) para estas líneas transgénicas.

Muestra ID	C18:1	C18:2	C18:3a	C20:1	C22:2n6	C22:5
CEPA Z; T588; D1825-47	59.97	7.44	0.56	0.57	0.00	0.00
CEPA Z; T588; D1825-35	58.77	7.16	0.51	0.50	0.09	0.11
CEPA Z; T588; D1825-27	60.40	7.82	0.47	0.44	0.07	0.07
CEPA Z; T588; D1825-14	58.07	7.32	0.54	0.41	0.05	0.05
CEPA Z; T588; D1825-40	58.66	7.74	0.46	0.39	0.08	0.00
Cntrl CEPA Z pH 7	57.99	6.62	0.56	0.19	0.05	0.05
Cntrl CEPA Z pH 5	57.70	7.08	0.54	0.11	0.06	0.05

Tabla 57. Perfil de ácidos grasos insaturados en CEPA Z y líneas transgénicas derivadas representativas transformadas con ADN pSZ3068 (TmFAE). No se detectaron picos de ácido erúico (22: 1) para estas líneas transgénicas.

Muestra ID	C18:1	C18:2	C18:3a	C20:1	C22:2n6	C22:5
CEPA Z; T588; D1826-30	59.82	7.88	0.55	0.32	0.17	0.10
CEPA Z; T588; D1826-23	59.32	8.02	0.58	0.27	0.18	0.07
CEPA Z; T588; D1826-45	59.63	7.49	0.55	0.27	0.19	0.08
CEPA Z; T588; D1826-24	59.35	7.78	0.57	0.26	0.23	0.00
CEPA Z; T588; D1826-34	59.14	7.61	0.57	0.25	0.22	0.05
Cntrl CEPA Z pH 7	57.81	7.15	0.59	0.19	0.04	0.06
Cntrl CEPA Z pH 5	58.23	6.70	0.58	0.18	0.05	0.06

Tabla 58. Perfil de ácidos grasos insaturados en CEPA Z y líneas transgénicas derivadas representativas transformadas con ADN pSZ3069 (BnFAE2). No se detectaron picos de ácido erúico (22: 1) para estas líneas transgénicas.

Muestra ID	C18:1	C18:2	C18:3a	C20:1	C22:2n6	C22:5
CEPA Z; T588; 3; D1827-6	60.59	8.20	0.57	0.34	0.00	0.07
CEPA Z; T588; D1827-42	59.62	6.44	0.52	0.30	0.07	0.00
CEPA Z; T588; D1827-48	59.71	7.99	0.59	0.30	0.06	0.00
CEPA Z; T588; D1827-43	60.66	8.21	0.59	0.29	0.04	0.00
CEPA Z; T588; D1827-3	60.26	7.99	0.57	0.28	0.04	0.00
Cntrl CEPA Z pH 7	57.81	7.15	0.59	0.19	0.04	0.06
Cntrl CEPA Z pH 5	58.23	6.70	0.58	0.18	0.05	0.06

**EJEMPLO 55: Elevación de nivel total de ácidos grasos insaturados mediante la expresión de genes de desaturasas heterólogas**

[0458] Uno de los enfoques para generar una cepa "cero SAT FAT" (por ejemplo, objetivo total de ácidos grasos

insaturados en el 97% o más/menos de o igual a 3% de grasa saturada) es para expresar genes de desaturasa en una alta cepa oleica tales como la cepa N, que nos pareció producir alrededor de 85% de C18: 1 con un total de insaturados de alrededor de 93% en varias ejecuciones de fermentación. Esperamos que los saturados totales se reducirán aún más por que expresan genes de desaturasas en la cepa N.

**[0459]** En los ejemplos siguientes, hemos demostrado la capacidad de reducir los niveles de ácido esteárico y palmítico en cepa UTEX1435 de tipo salvaje por sobreexpresión de genes de desaturasa de heterólogos de estearoil-ACP, incluyendo desaturasas de *Olea europaea*, *Ricinus communis*, y *Chlorella protothecoides*.

**[0460] Constructo utilizado para la expresión de *Olea europaea* desaturasa de estearoil-ACP:** Para introducir *O. europaea* desaturasa de estearoil-ACP (nº de acceso: AAB67840,1) en UTEX1435, la cepa A, el gen *Saccharomyces cerevisiae* de la invertasa se utilizó como el marcador seleccionable para conferir la capacidad de crecer en medios de sacarosa. El constructo que se ha expresado en UTEX1435, cepa A se puede escribir como 6SA::CrTUB2: ScSUC2: CvNR::CrTUB2: CpSADtp: OeSAD: CvNR::6SB y se denomina pSZ1377.

**[0461]** Sitios de restricción relevantes en el constructo pSZ1377 se indican en minúsculas, en negrita y subrayado y son 5'-3' *BspQ* 1, *KPN*I, *Xba* I, *MFE* I, *Bam*H I, *Eco*R I, *Spe* I, *Asc* I, *Cla* I, *Sac* I, *Bsp*Q I, respectivamente. Sitios *BspQ*I delimitan el 5' y 3' del ADN transformante, secuencias minúsculas en negrita representan ADN genómico que permiten integración dirigida en el locus 6s a través de recombinación homóloga. Procediendo en la dirección 5' a 3', *C. reinhardtii* promotor  $\beta$ -tubulina que dirige la expresión del gen de la invertasa de levadura sacarosa se indica mediante texto en caja. El iniciador ATG y el terminador TGA para la invertasa se indican con mayúsculas, negrita y cursiva, mientras que la región de codificación está indicada en minúsculas en cursiva. *Chlorella vulgaris* nitrato reductasa 3' UTR se indica mediante letras minúsculas con texto subrayado seguido por *C. reinhardtii* segundo promotor  $\beta$ -tubulina que conduce a la expresión de la OeSAD, indicado por texto cursiva en caja. Los codones ATG iniciador y terminador TGA de la OeSAD se indican con mayúsculas, negrita y cursiva, mientras que el resto de la región codificante de desaturasa de estearoil-ACP se indica mediante negrita y cursiva. *Chlorella protothecoides* péptido de tránsito desaturasa de estearoil-ACP está situado entre el iniciador ATG y el sitio *Asc* I. *C. vulgaris* nitrato reductasa 3' UTR se indica de nuevo por minúsculas texto subrayado seguido por la región genómica 6S indicado por, texto minúsculas en negrita.

**[0462]** Secuencia de nucleótidos de la transformación de ADN contenido en PSZ 1377:

5 gctcttcgcccgcgccaactcctgctcgagcgcgcccgcggtgcccgcgagcgcttggccttttcgcccgcgctgctgctgctgatgtcca  
 tcaccagggtccatgagggtctgccttgcccggctgagccaactgcttcgctccgggcccgaaggagcatgaggaggactcctgggtccaggg  
 tcctgacgtggtcgcggtctgggagcgggcccagcatcatctggctctgcccaccgaggccgctccaactggctcctccagcagccgagtcg  
 ccgcccacccctggcagaggaagacagggtgaggggggtatgaattgtacagaacaaccacgagccttgtctaggcagaatccctaccagtcac  
 10 ggctttacctggatgacggcctggaacagctgtccagcgaccctcgctgcccgcgttctcccgcacgttcttccagcaccgtgatggcgcg  
 agccagcgccgcacgtggcgctgcttcgcccgatctgaggacagtcggggaactctgatcagtctaatacccccttgcgcttagttgttcca  
 15 tcctttgagaccgggtgagagccgactgttggcgccacccccacacacccctcctccagaccaattctgtcacctttttggcgaaggcatcgg  
 cctcggcctgcagagaggacagcagtgcccagccgctgggggtggcggtgacgctcaggtaccctttctgctatgacacttccagcaa  
 aaggtagggggcgctgagagcggcttcccggcgctgcatgcaacaccgatgatgcttcgacccccgaagtccttcggggctgcatggcgcg  
 20 tccgatgccgctccaggcgagcgctgtttaatatagccaggccccgattgcaaagacattatagcgagctaccaagccatattcaaacacct  
 agatcactaccacttctacagggcactcgagcttgtgatcgactccgctaagggggcgcttctcctcttcgttcagtcacaacccgcaaad  
 25 tctagaatatca**ATG**ctgctgcaggccttctgttctgctggtgcccgttcgcccgaagatcagcgctccatgacgaacgagacgtccga  
 ccgccccctggtgcacttcccccaacaagggctggatgaacgaccccaacggcctgtggtacgacgagaaggacgccaagtggcacc  
 tgtacttccagtacaacccgaacgacaccgtctgggggacgcccctgttctggggccacgccacgtccgacgacctgaccaactgggagg  
 30 accagcccatcgccatcgccccgaagcgcaacgactccggcgcccttctccggtccatggtggtggactacaacaacaccccggtcttctc  
 aacgacacccatcgacccgcgacgctgctggtgacctatcgacctacaacacccggagtcgaggagcagtcacatctctacagcctg  
 gacggcggtctacaccttaccgagtagcagaagaaccccgctgctggccgccaactccaccagttccgagacccgaaggcttcttggtacg  
 35 agccctcccagaagtggatcatgaccgcggccaagtcccaggactacaagatcgagatctactcctccgacgacctgaagtctggaagc  
 tggagtcggttcgccaacgaggggttctcctgggtaccagtagcaggtgccccggcctgatcgagggtccccaccgagcaggacccagca  
 agtctactgggtgatgttcatctccatcaacccggcgccccggcggtccttcaaccagtacttctgctggcagcttcaacggcacc  
 40 acttcgaggccttcgacaaccagtcgccggtggtgacttcggcaaggactactacgccctgcagaccttcttaacaccgacccgacctac  
 gggagcgccctgggcatcgctgggctccaactgggagtactccgcttctgcccaccaacccctggcgctcctccatgtcctcgctgcgc  
 aagttctcctcaacacccgagtagcaggccaacccggagacggagctgatcaacctgaaggccgagccgatcctgaacatcagcaacgc  
 45 cggccctggagccggttcgccaaccaacaccagttgacgaaggccaacagctacaacgtcgacctgtccaacagacccggcacccctgga  
 gttcgagctggtgtacgctgaacacacccagacgatctcaagtccgtgttcgaggacctctcctctggttcaagggcctggaggacc  
 50 ccgaggagtagctccgcatgggcttcgaggtgtccggtcctccttcttctggaccgcggaacagcaaggtgaagttcgtgaaggaga  
 acccctacttcaaccaaccgatgagcgtgaacaacagcccttcaagagcgagaacgacctgtcctactacaaggtgtacggcttctgga

55

60

65

ccagaacatcctggagctgtacttcaacgacggcgacgtcgtgtccaccaacacctaacttcatgaccaccgggaacgccttgggctccgtg  
 5 aacatgacgacgggggtggacaacctgttctacatcgacaagttccagggtgcgcgaggtcaag**TGA**caattggcagcagcagctcggat  
 agtatcgacacactctggacgctggtcgtgtgatggactgttgcgccacacttctgccttgacctgtgaatatccctgccgctttatcaaacag  
 cctcagtggtttgatcttctgtgtacgcgcttttgcgagttgctagctgcttctgtctatttgcgaataccacccccagcatcccttccctcgtttcat  
 10 atcgcttgcatccaaccgcaacttatctacgctgtcctgctatccctcagcgctgctcctgctcctgctcactgcccctcgacagccttggtttg  
 gctccgctgtatttctcctggtactgcaacctgtaaaccagcactgcaatgctgatgcacgggaagtagtgggatgggaacacaaatggag**gat**  
 ccgctgtcgaacagagcgcgagaggaaacgtgaaggtctgcctgtgcacctcagcgcgcatacaccacaataaccacctgacgaa  
 15 tgcgcttggttcttctgctcattagcgaagcgtccggtcacacacgtgccagttggcgaggtggcaggtgacaatgatcggtggagctgatggtc  
 gaaacgttcacagcctagggatatc**gaattc**cttcttgcgtatgacacttcagcaaaaggtagggcgggctgcgagacggcttccggc  
 20 gctgcatgcaacaccgatgatgcttcgacccccgaagctccttcggggctgcatgggcgctccgatgccgtccaggcgagcgctgttta  
aatagccaggcccccgattgcaaagacattatagcgagctaccaagccatattcaaacacctagatcactaccacttctacacaggcca  
ctcgagcttgatcgactccgctaaggggcgcttctccttctcgtttcagtcacaacccgcaaac**actag****TG**gccaccgcatccact  
 25 ttctcggcgttaatgcccgtgcggcgacctgcgtcgtcggcgggctccgggccccggcgcccagcgaggccctccccgtgcgcgggc  
gcgcggaggtgcacgtgcaggtgaccactccctggccccggagaagcgcgagatcttaactccctgaacaactgggccaggagaa  
 catcctggtgctgctgaaggacgtggacaagtgtggcagccctccgacttctgcccgactccgctccgagggcttcgacgagcaggt  
 30 gatggagctgcgaagcgtgcaaggagatccccgacgactacttcatcgtgctggtggcgacatgatcacggaggaggccctgcc  
 acctaccagacatgctgaacacctggacggcgtgcgcgacgagaccggcgctccctgacccctgggccatctggacccgcgctg  
 35 gaccgagggagaaaccgccacggcgacctgtgaacaagtacctgtacctgtccggccgctggacatgaagcagatcgagaagac  
 catccagtacctgatcggtccggcatggacccccgacccgagaaacacccctacctgggcttcatctacacctcctccaggagcgcgcc  
 accttcatctcccaggaacacccgcccgtggccaaggagcacggcgacctgaagctggcccagatctgcggcatcatcgccggga  
 40 cgagaagcgccacgagaccgctacaccaagatcgtggagaagctgttcgagatgacccccgagggaccgtgctggccctggccgac  
 atgatgcgaagaaggtgtccatgcccggccacctgatgtacgacggccaggacgacaacctgttcgagaacttctcctcgtggccca  
 gcgctgggctgtacaccgcaaggactacgccgacatcctggagttcctgggtggccgctgggacatcgagaagctgaccggcctgt  
 45 ccggcgagggccgcaaggccaggactacgtgtgacacctgccccccgcatccgcccgtggaggagcgcgcccagtcgccgctgaa  
 gaaggcctccgcaaccccttctcctggatcttcggccgagatcaacctgatggactacaaggaccacgacggcgactacaaggacc  
 50 acgacatcgactacaaggacgacgacgacaag**TGA**atcgatagatctcttaaggcagcagcagctcgatagtatcgacacactctggac  
 gctggtcgtgtgatggactgttgcgccacacttctgccttgacctgtgaatatccctgccgctttatcaaacagcctcagtggtttgatcttctg  
 tgtacgcgcttttgcgagttgctagctgcttctgtctatttgcgaataccacccccagcatcccttccctcgtttcatatcgcttgcatccaaccgca  
 55 acttatctaagctgtcctgctatccctcagcgctgctcctgctcctgctcactgcccctcgacagccttggtttgggctccgctgtattctcctggt  
 actgcaacctgtaaaccagcactgcaatgctgatgcacgggaagtagtgggatgggaacacaaatggaaagcttaattaag**agctctt****gtttt**  
 cagaaggagttgtccttgagcctttcattctcagcctcgataacctccaaagccgctctaattgtggaggggggttcgaatttaaagcttgaa  
 60 tgttggctcgtcgtctggaacaagcccagacttgttctcactgggaaaaggaccatcagctcaaaaaacttgcgctcaaacgcgtacct  
 ctgcttgcgcaatctgccctgtgaaatgccaccacattcatattgtgacgcttgagcagctgtgaattgcctcagaatgtggaatcatctgc  
 65 cccctgtgcgagccatgccaggcatgtcggggcaggacacccgccactgtacagcagaccattatgtactctcacaatagttcataaca

gtgaccatatttctgaagctccccaacgagcacctccatgctctgagtggccacccccggccctggcttgcgaggggcagggtcaaccggc  
 atggggctaccgaaatccccgaccggatcccaccacccccgcgatgggaagaatctctcccgggatgtgggcccaccaccagcacaacctgc  
 tggcccaggcgagcgtcaaaccataccacacaaatatccttggcatcgccctgaattccttctgcccgtctgctacccgggtgcttctgtccgaa  
 gcagggggtgctagggatcgctccgagtcgcaaaccttgcgctggcggggcttgcgagcttgaagagc (SEQ ID NO:108)

**[0463] Construcción utilizada para la expresión de la *Ricinus communis* desaturasa estearoil-ACP:** Para introducir *Ricinus communis* desaturasa de estearoil-ACP (nº de acceso: AAA74692,1) en UTEX1435, la cepa A, *Saccharomyces cerevisiae* gen de la invertasa se utilizó como el marcador seleccionable para conferir la capacidad de crecer en medios de sacarosa. El constructo que se ha expresado en UTEX1435, cepa A se puede escribir como 6SA::CrTUB2: ScSUC2: CvNR::PmAMT03: CpSADtp: RcSAD: CvNR::6SB y se denomina pSZ1454.

**[0464] Sitios de restricción relevantes en el constructo pSZ1454 se indican en minúsculas, en negrita y subrayado y son 5'-3' BspQ 1, KPN I, Xba I, MFE I, BamH I, EcoR I, Spe I, Asc I, Cla I, Sac I, BspQ I, respectivamente. Sitios BspQ I delimitan el 5' y 3' del ADN transformante, secuencias minúsculas en negrita representan ADN genómico que permiten integración dirigida en el locus 6s a través de la recombinación homóloga. Procediendo en la dirección 5' a 3', *C. reinhardtii* promotor  $\beta$ -tubulina que dirige la expresión del gen de la invertasa de levadura sacarosa se indica mediante texto en caja. El iniciador ATG y el terminador TGA para la invertasa se indican con mayúsculas, negrita y cursiva, mientras que la región de codificación está indicada en minúsculas en cursiva. *Chlorella vulgaris* nitrato reductasa 3' UTR se indica mediante letras minúsculas texto subrayado seguido por el promotor AMT03 endógeno dirige la expresión de la RcSAD, indicado por texto cursiva en caja. Los codones de ATG iniciador y terminador TGA de la RcSAD se indican con mayúsculas, negrita y cursiva, mientras que el resto de la región de codificación de desaturasa de estearoil-ACP se indica mediante negrita y cursiva. *Chlorella protothecoides* péptido de tránsito desaturasa de estearoil-ACP está situado entre el iniciador ATG y el sitio Asc I. *C. vulgaris* nitrato reductasa 3' UTR se indica de nuevo por minúsculas texto subrayado seguido por la región genómica 6S indicado por, texto minúsculas en negrita.**

**[0465] Secuencia de nucleótidos de la transformación de ADN contenido en pSZ1454:**

gctcttcgcccgcgccaactcctgctcgagcgcgcccgcgctgcccgcagcgcttggccttttcgcccgcgctcgctcgctgatgtcca  
 tcaccagggtccatgaggtctgccttgcgcccggctgagccactgcttgcggggcgccaagaggagcatgagggaggactcctgggtccaggg  
 tcctgacgtggctcgccgctctgggagcggggccagcatcatctggctctgcccaccgaggccgctccaactggctcctccagcagccgcagtcg  
 ccgccaccctggcagaggaagacaggtgaggggggtatgaattgtacagaacaaccacgagccttgcctaggcagaatccctaccagtcac  
 ggctttacctggatgacggcctgcgaacagctgtccagcgaccctgcgcccgttctcccgacgcttctccagcaccgtgatggcgcg

agccagcgccgcacgctggcgctgcgcttcgcatctgaggacagctggggaactctgatcagtctaaaccccttgcgcttagtggtcca  
 tcctttgcagaccgggtgagagccgacttggtgctgccacccccacaccacctctccagaccaattctgtcaccttttggcgaaggcatcgg  
 5 cctcggcctgcagagaggacagcagtgcccagccgctgggggtggcggatgcacgctcaggtacccttcttgctatgacactccagcaa  
 aaggtaggcgggctgcgagacggcttccggcgctgcatgcaacacccgatgatgcttcgacccccgaagctcctcggggctgcatggcg  
 tccgatgccgctccagggcgagcgtgttaaatagccagggccccgattgcaaagacattatagcgagctaccaaagccatattcaaacct  
 10 agatcactaccactttacacaggccactcgagcttgatgcactccgctaaggggcgctcttctcttctggttcagtacaaacccgcaaac  
 tctagaatatcaATGctgtgcaggccttctgttctgctggtggcggttcgcccgaagatcagcgctccatgacgaacgagacgtccga  
 15 ccgccccctggtgacttcaaccccaacaagggtggatgaacgaccccaacggcctgtggtacgacgagaaggacgccaagtggcacc  
 tgtacttccagtacaacccgaacgacacccgtctgggggacgacctgttctggggccacgccacgtccgacgacctgaccaactgggagg  
 accagcccatcgccatcgccccgaagcgcaacgactccggcgcttctccggtccatggtggtgactacaacaacacctccggttcttc  
 20 aacgacaccatcgacccgcgccagcgctgcgtggccatctggacctacaacacccggagtccgaggagcagtacatctctacagcctg  
 gacggcggtacaccttaccgagtaccagaagaacccgtgctggcgccaactccaccagttccgacccgaaggcttctggtacg  
 agccctcccagaagtggatcatgaccgcgccaagtccaggactacaagatcgagatctactctccgacgacctgaagtctggaagc  
 25 tggagtccgcttcgccaacgagggtctctcggtaccagtacgagtccccggcctgatcgagggtccccaccgagcaggacccagca  
 agtctactgggtgatgttcatctccatcaaccccgcgccccggcgggctcttcaaccagtaattctgctggcagcttcaacggacccc  
 acttcgaggccttcgacaaccagtcgccggtggtgacttcggcaaggactactacgacctgcagaccttctcaacaccgacccgacctac  
 30 gggagcgccctggcatcgctgggctccaactgggagtactccgcttctgcccaccaacccctggcgctctccatgtctctcgctgcgc  
 aagttctccctcaacaccgagtaccaggccaacccggagacggagtcatcaacctgaaggccgagccgatcctgaacatcagcaacgc  
 35 cggccctggagccggttcgccaccaacaccagttgacgaaggccaacagctacaacgtcgacctgtccaacgacccggcacccctgga  
 gttcgagctggtgtacgccgtcaacacacccagacgatctcaagtccgtgttcgaggacctctcccttggttaagggtcggaggacc  
 ccgaggagtacctccgatgggttcgaggtgtccgctctcttcttctgaccggggaacagcaagggtgaagttctgaaggaga  
 40 accctacttcaacaacccgatgagcgtgaacaaccagccctcaagagcgagaacgacctgtctactacaagggtgtacggcttctgga  
 ccagaacatctggagctgtacttcaacgacggcgacgtcgtgtccaccaacacctacttcatgaccacgggaacgccttgggtcgtg  
 aacatgacgacgggggtggacaacctgtttacatcgacaagttccagggtgcgaggtcaagTGAcaattggcagcagcagctcggat  
 45 agtatcgacacactctggacgtggtcgtgatggactgttccgccacacttgctgccttgacctgtgaataccctgcccgtttatcaaacag  
 cctcagtggtttgatcttctgtgtacgcgttttgcgagttgtagctgcttctgtctatttgcgaataccaccccccagcatccccttccctcgtttcat  
 atcgcttgcatccaaccgcaacttatctacgctgtcctgctatccctcagcgctgctcctgctcctgctcactgcccccgacagccttggttgg  
 50 gctccgctgtattctcctgtactgcaacctgtaaacccagcactgcaatgctgatgcacgggaagtagtgggatgggaacacaaatggaggat  
 cccgctctcgaacagagcgcgagaggaacgctgaaggtctgcctctgctgcacctcagcgcgccatacaccacaataaccacctgacgaa  
 55 tgcgcttggttcttctgctcattagcgaagcgtccggttcacacagtgccacgttggcgaggtggcaggtgacaatgatcggtggagctgatggtc  
 gaaacgttcacagcctagggatatgaattcggccgacaggacgcgctcaaagggtgctggtcgtgtatgccttggccggcagggtcgttgc  
 tgtcgtggttagtgattccgaacctgattttggcgtctattttggcgtggcaaacgctggcgcccgagacggggcgcgcgatgc  
 60 ggtgccccacggctgccggaatccaagggaggcaagagcgccgggtcagttgaagggtttacgcgaagggtacagccgctcctgca  
 aggtgcgtggtggaattggacgtgcaggtcctgctgaagtctccaccgctcaccagcggacaagaacacccggtgtatcaggtccgtgt

catccactctaagaactcgactacgactactgatggccctagatttctcatcaaaaacgcctgagacacttgccaggattgaaactccc  
 tgaagggaccaccagggccctgagttgttcttccccctggtggcagctgcagccaggctgtacctgtgatcgaggctggcgggaaaa  
 5 taggcttcgtgtgctcaggtcatgggaggtgcaggacagctcatgaacgccacaatcgcacattcatgtcaagctaatacagctatttc  
 ctcttcacgagctgtaattgtccaaaattctggctaccgggggtgatccttcgtgtacgggcccttcctcaaccctaggtatgcgcgcatg  
 10 cggtcgccgcgaactcgcgagggccgaggggttggtgacgggccgtcccgaaatgcagttgcacccggatgcgtggcacctttttgc  
 gataatttatgcaatggactgctctgcaaaattctggctctgtcgcaaccctaggtacagcgcgtaggatttcgtaatacttcgtcctgat  
 ggggagctaccgactaccctaataatcagcccgactgcctgacgccagcgtccacttttgtgcacacattccattcgtgccaaagacatttcac  
 15 tgtggtgcgaagcgtccccagttacgtcacctgtttcccgacctccttactgttctgtcgacagagcggggccacaggccggtgcgagc  
 tagtATGgccaccgcatccactttctcggcggttaatgcccgtgcggcgacctgcgtcgtcggcgggtccgggccccggcgcccagc  
 gaggccccccccgtgcgcgggcgccgctccaccctgaagtccggctccaaggaggtggagaacctgaagaagcccttcagtccccc  
 20 ccgcgaggtgcacgtgcaggtgaccactccatgccccccagaagatcgagatcttcaagtcctggacaactgggccgaggagaac  
 atcttggtgcacctgaagcccgtggagaagtgtggcagccccaggacttctgcccgaacccgctccgacggcttcgacgagcaggt  
 25 gcgcgagctgcgcgagcgcgccaaggagatccccgacgactacttcgtggtgctggtggcgacatgatcaccgaggaggccctgccc  
 acctaccagaccatgctgaacacctggacggcgtgcgcgacgagacggcgccctccccacctcctggccatctggacccgcgctgg  
 accgcccaggagaaccgcacggcgacctgtgaacaagtacctgtacctgtccggccgctggacatgcgccagatcgagaagacc  
 30 atccagtaacctgatcggctccggcatggacccccgaccgagaactccccctacctgggcttcactacacctccttcaggagcgcgccac  
 ctctatctcccacggcaacaccgcccgcaggccaaggagcagggcagacatcaagctggcccagatctgcggcaccatcgccgcccagc  
 agaagcgccacgagaccgctacaccaagatcgtggagaagctgttcgagatcgaccccgacggcaccgtgtgaccttcgccgacat  
 35 gatgcgcaagaagatctccatgcccgcacactgatgtacgacggccgcgacgacaacctgttcgaccacttctccgctggcccagcg  
 cctgggctgtacaccgccaaggactacgccgacatcctggagtctcgtggtggccgctggaaggtggacaagctgaccggcctgtccg  
 ccgaggggcagaaggcccaggactacgtgtgcccctgccccccgcatccgcccctggaggagcgcgcccaggccgccaagg  
 40 agggccccaccatgcccttctcctggatcttcgaccgacgggtgaagctgatggactacaaggaccacgacggcgactacaaggaccac  
 gacatcgactacaaggacgacgacgacaagTGAatcgaatagatctcttaaggcagcagcagctcggatagtatcgacacactctggacgc  
 45 tggctcgtgatggactgttgcgccacactgtcgcctgacctgtaatatccctgccgctttatcaaacagcctcagtggtttgatcttgtg  
 tacgcgcttttcgagttgctagctgcttgtgctatttgcgaataccacccccagcatcccttccctcgtttcatatcgcttgcacccaaccgcaa  
 ctatctacgctgtcctgctatccctcagcgtcgtcctcgtcctcgtcactgcccctcgacagccttggtttggctccgctgtattctcctggtac  
 50 tgcaacctgtaaacacgactgcaatgctgatgcacgggaagttagtgggatgggaacacaaaatggaaagcttaattaagagctcttgtttcca  
 gaaggagttgctccttgagcctttcattctcagcctcgataacctccaaagccgctctaattgtggagggggttcgaatttaaaagcttggaatg  
 ttggtcgtgcgtctggaacaagcccagactgttgctcactgggaaaaggaccatcagctccaaaaaacttgccgctcaaacccgctacctct  
 55 gctttcgcaatctgcctgttgaaatgccaccacattcatattgtgacgcttgagcagctgtaattgcctcagaatgtggaatcatctgccc  
 cctgtgcgagcccatgccaggcatgtcgggcgaggacacccgcaactcgtacagcagaccattatgtacctcacaatagttcataacagt  
 60 gaccatatttctgaagctcccaacgagcacctccatgctctgagtgccacccccggccctggtgcttgccggaggcgaggtcaaccggcat  
 ggggctaccgaaatccccgaccgatccaccacccccgcgatgggaagaatctctcccgggatgtgggcccaccaccagcacaacctgctg  
 gccagggcagcgtcaaacataccacacaaaatatccttggcatcggccctgaattccttctgccgctgctacccgggtgcttctgtccgaagc  
 65 aggggttgctaggatcgtccgagtcgcaaaccttctgcgtggcggggcttcttcgagcttgaagagc (SEQ ID NO: 109)



**[0466] Construcción utilizada para la expresión de *Chlorella protothecoides* desaturasa de estearoil-ACP:** Para introducir *Chlorella protothecoides* desaturasa de estearoil-ACP en UTEX1435, Cepa Z, la *Saccharomyces cerevisiae* gen de la invertasa se utilizó como el marcador seleccionable para conferir la capacidad de crecer en medios de sacarosa. El constructo que se ha expresado en UTEX1435, Cepa Z se puede escribir como 6SA::CrTUB2: ScSUC2: CvNR::PmAMT03: CpSAD1: CvNR::6SB y se denomina pSZ3144.

**[0467]** Sitios de restricción relevantes en el constructo pSZ3144 se indican en minúsculas, en negrita y subrayado y son 5'-3' *BspQ* I, *KPN* I, *Xba* I, *MFE* I, *BamH* I, *EcoR* I, *Spe* I, *cl* I, *Sac* I, *BspQ* I, respectivamente. Sitios *BspQ* I delimitan el 5' y 3' del ADN transformante., secuencias minúsculas en negrita representan ADN genómico que permiten dirigido integración en el locus 6s a través de recombinación homóloga. Procediendo en la dirección 5' a 3', *C. reinhardtii* promotor  $\beta$ -tubulina que dirige la expresión del gen de la invertasa de levadura sacarosa se indica mediante texto en caja. El iniciador ATG y el terminador TGA para la invertasa se indican con mayúsculas, negrita y cursiva, mientras que la región de codificación está indicado en minúsculas en cursiva. *Chlorella vulgaris* nitrato reductasa 3' UTR se indica mediante letras minúsculas texto subrayado seguido por el promotor AMT03 endógeno dirige la expresión de la CpSAD1, indicado por texto cursiva en caja. Los codones ATG iniciador y terminador TGA de la CpSAD1 se indican con mayúsculas, negrita y cursiva, mientras que el resto de la región de codificación de desaturasa de estearoil-ACP se indica mediante negrita y cursiva. *C. vulgaris* nitrato reductasa 3' UTR se indica de nuevo por minúsculas con texto subrayado seguido por la región genómica 6S indicada por texto minúsculas en negrita.

**[0468]** Secuencia de nucleótidos de la transformación de ADN contenido en pSZ3144:

```

gctcttcgccgcccactcctgctcgagcgcccgcgctgcccagcgcttgccctttcgcgcgctcgcgctgatgtcca
tcaccagggtccatgaggtctgccttgccgggctgagccactgcttcgctccggcgcccaagaggagcatgagggaggactcctggtccaggg
tcctgacgtggtcgccgctctgggagcgggccagcatcatctggctctgccgaccgaggccgctccaactggtcctccagcagccgcagtcg
ccgccgaccttgccagaggaagacaggtgaggggggtatgaattgtacagaacaaccagagccttgctaggcagaatccctaccagtcac
ggctttacctggatgacggcctgcgaacagctgtccagcgaccctcgctgccgcttctccgcacgcttcttccagaccgtgatggcgcg
agccagcgccgcacgctggcgctgcgcttgcgcatctgaggacagtcggggaaactctgatcagtcctaaaccccttgcgcttagtgttcca
tccttgcagaccggtgagagccgacttgtgtgccccccccacaccacctctccagaccaattctgtcacctttttggcgaaggcatcgg
cctcggcctgcagagaggacagcagtgcccagccgctgggggttgccggatgcacgctcaggtacccttcttgcgctatgacacttccagcaa
aaggtagggcgggctgcgagacggcttccggcgctgcatgcaacaccgatgatgcttcgacccccgaagctccttcggggctgcatgggcg

```

tccgatgccgctccagggcgagcgtgtttaatagccaggccccgattgcaaagacattatagcgagctaccaaagccatattcaaacact  
 5 agatcactaccacttctacacaggccactcgagcttgatgcactcgctaagggggcgctcttctcttcttcagtcacaaaccgcaaac  
tctagaatatca**ATG**ctgtgcaggccttctgttctgtgtgcccgttcgcccgaagatcagcgctccatgacgaacgagacgtccga  
 ccgccccctggtgcacttcacccccaaacagggtggtgaacgaccccaacggcctgtggtacgacgagaaggacgccaagtggcacc  
 10 tgtacttccagtacaacccgaacgacaccgctctgggggacgccttggttctggggccacgccacgtccgacgacctgaccaactgggagg  
 accagcccatcgccatcgccccgaagcgcaacgactccggcgcttctccggctccatggtggtgactacaacaacacctccggcttcttc  
 aacgacaccatcgacccgcccagcgctgctgtggcatctggacctacaacacccggagtcggaggagcagtacatctctacagcctg  
 15 gacgggggtacaccttcaccgagtaccagaagaaccccgctgtgtggccgaactccacccagttccgacccgaaggcttcttggtacg  
 agccctcccagaagtggatcatgaccgggccaagtcacaggactacaagatcgagatctactctccgacgacctgaagtctggaagc  
 tggagtcgctgccaacgagggcttctcggtaccagtacgagtgccccggcctgatcgaggtccccaccgagcaggacccccagca  
 20 agtcctactgggtgatgttcatctccatcaacccggcgccccggcgggccttcaaccagtactctgctggcagcttcaacggcacc  
 acttcgagggccttcgacaacagtcgccggtggtgacttcggcaaggactactacgcctgcagaccttctcaacaccgacccgacctac  
 gggagcgccctgggcatcggtgggctccaactgggagtactccgcttcgtgcccaccaacccctggcgctctccatgtccctcgctgcg  
 25 aagtctccctcaacaccgagtaccaggccaacccggagacggagctgatcaacctgaaggccgagccgatcctgaacatcagcaacgc  
 cggccccctggagccggttcgccaccaacaccacgttgacgaaggccaacagctacaacgtcgacctgtccaacagcaccggcacctgga  
 gttcagagctggtgtagccgtcaacaccaccagacgacttccaagtcggttcgaggacctctccctctggtcaaggcgctggaggacc  
 30 ccgaggagtacctccgatgggcttcgaggtgctcgctctcttcttctggaaccgcggaacagcaaggtgaagttcgtgaaggaga  
 acccctacttcaccaaccgatgagcgtgaacaaccagccctcaagagcgagaacgacctgtctactacaagggtgtagcgcttgctgga  
 35 ccagaacatcctggagctgtacttcaacgacggcgacgtcgtgtccaccaacacctacttcatgaccacgggaacgcctgggctccgtg  
 aacatgacgacgggggtggacaacctgttctacatcgacaagttccaggtgctgcgaggtcaag**TGA**caattggcagcagcagctcgat  
 40 agtatcgacacactctggacgctggtcgtgtgatggactgttccgccacacttctgcttcctgacctgtaatatccctgccgttttatcaaacag  
cctcagtggtttgatcttgtgtacgcgttttgcgagttgctagctgcttgtgctatttgcgaataccacccccagcatcccttccctcgttcat  
atcgcttgatccaaccgcaacttatctacgctgtcctgctatccctcagcgctgctcctgctcctgctcactgcccctcgacagccttggttgg  
 45 gctccgcctgtatttctcctggtactgcaacctgaaaccagcactgcaatgctgatgcacgggaagtagtgggatgggaacacaaatggagga  
cccgctctgaacagagcgcgagaggaaacgtgaaggtctgcctctgtcgacctcagcgcgccatacaccacaataaccacctgacgaa  
 tgcgcttggttcttctccattagcgaagcgtccggttcacacacgtgccagttggcgaggtggcaggtgacaatgatcggtggagctgatggtc  
 50 gaaacgttcacagcctagggatatcgaattcggccgacaggacgcgcgtcaaaaggtgctggtcgtgtatgcctggccggcaggtcgttgc  
tgtctgtggttagtgattccgcaaccctgattttggcgtcttattttggcgtggcaaacgctggcgcccgcgagccggggccggcgcgatgc  
 55 ggtgccccacggctgccgaatccaaggagggaagagcgccgggtcagttgaagggttttacgcgaaggtacagccgctcctgca  
aggctgcgtggtggaattggacgtgcaggtcctgtgaagttcctccaccgcctcaccagcgggcaaaagcaccggtgtatcaggtccgtgt  
catccactctaagaactcgactacgacctactgatggcctagattcttcatcaaaaacgcctgagacacttggcaggattgaaactccc  
 60 tgaagggaaccacagggggcctgagttgttcttccccctggcgagctgccagccaggtgtacctgtgatcaggtggcggggaaaa  
taggcttcgtgtgctcaggtcatgggaggtgcaggacagctcatgaaacgccaacaatcgacaattcatgtaagctaatacagctatttc  
 65 ctttcacgagctgtaattgtccaaaattctggtctaccgggggtgatccttctgtgtacgggcccttccctcaaccctaggtatgcgcgatg

5 cggtcgccgcgaactcgcgagggccgaggggttgggacgggcccgtcccgaatgcagttgcacccggatgcgtggcacctttttgc  
gataatttatgcaatggactgctctgcaaaattctggctctgtcgcaaacctaggatcagcggcgtaggatttcgtaatcattcgtcctgat  
ggggagctaccgactacctaataatcagcccgaactgcctgacgccagcgtccacttttgtgcacacattccattcgtgccaaagacatttcac  
 10 tgtggtgcgaagcgtccccagttacgctcacctgtttccgacctcttactgttctgtcgacagagcgggcccacaggccggtcgagccac  
tagtATGgccaccgcctccaccttctccgccttcaacgcccgtgcggcgacctgcgcgctccgcgggtccggcccccgccccgcc  
gccccctgcccgtgcgcgcccgcctccgaggtgcccgtggccaccacctccccgccccggccccaccgtgtactccaagctggac  
 15 aaggccccacacctgacccccgagcgcgtggagctgatcaacggcatgtccgccttcgaggagcgcacacctgcccgtgctgcagccc  
gtggagaagctgtggcagccccaggacctgtgcccgaacccgagtcacccgacttctggaccaggtggccgagctgcgcgccccgcgc  
cgcaacgtgcccgcgactacttctgtgtgtgtggcgacatgatcaccgaggaggccctgccacctacatggccatgctgaaca  
 20 ccctggacggcgtgcgcgacgagaccggcgccgcccaccacctggggccgctggaccgccagtgggtggcgaggagaaccgcc  
acggcgacctgctgaacaagtactgtggtgacggccgctgaacatgaaggccatcgaggtgaccatccagaacctgatcggtc  
cggcatgaaccccaagaccgagaacaacccctacctgggtctgtgtacacctcttccaggagcgcgccaccaagtactcccacggca  
 25 acaccgccccgctggccgcccagtagggcgacgccacctgtccaaggtgtgcgcgctgatcgccgacgagggccgcccacgagat  
cgcctacacccgcatcgtggaggagtcttccgcctggaccccgaggcgccatgtccgcctacgccgacatgatgcgaagcagatcac  
 30 catgcccggccacctgatggacgaccagcagcagccgcaacacccggccgaacctgttcgagcttctccgcgtgaccgaga  
agctggacgtgtacgacgcccaggactactgcaagatcctggagcacctgaactcccgtggaagatcgccgaccgacacgtgtccgg  
cgacgcccggcgccgaccaggagtacgtgctgcgcctgcctcccgcttcgcaagctggccgagaagtccgcgccaagcgcgcaag  
 35 accaagcccaagcccgtggccttctcctggctgtccggccgaggtgatggtgTGAatcgatagatctcttaaggcagcagcagctcgga  
tagtatcgacacactctggacgctggtcgtgtgatggactgttgcgccacacttgctgccttgacctgtgaatatccctgccgcttttatcaaca  
 40 gcctcagtggtttgatcttgtgtgtacgcgcttttgcgagttgctagctgcttgtgtatttgcgaataccacccccagcatccccttccctgcttca  
tatcgcttgcacccaaccgcaacttatctacgctgtcctgctatccctcagcgctgctcctgctcctgctcactgcccctcgacagccttggttgg  
gctccgctgtattctctggtactgcaacctgtaaacccagcactgcaatgctgatgcacgggaagtagtgggatgggaacacaaatggaaagc  
 45 ttaattaagagctcttgttttccagaaggagttgctccttgagccttctattctcagcctcgataacctccaagccgctctaattgtggaggggg  
ttcgaatttaaagcttggaatgttggttcgtgcgttggaacaagcccagactgttgctcactgggaaaaggaccatcagctccaaaaaact  
tgccgctcaaaccgctacctctgcttgcgcaatctgcctgtgaaatcgccaccacattcatattgtgacgcttgagcagctgtaattgcc  
 50 tcagaatgtggaatcatctgcccctgtgcgagccatgacaggcatgtcgggcgaggacacccgcactcgtacagcagaccattatgct  
acctcacaatagttcataacagtaccatatttctgaagctcccaacgagcacctcatgctctgagtgccacccccggccctggtgcttg  
cggagggcaggtcaaccggcatggggctaccgaaatccccgaccggatcccaccaccccccgatgggaagaatctctccccgggatgtggg  
 55 cccaccaccagcacaacctgtggcccaggcgagcgtcaaacataccacacaaatatccttgcatcgccctgaattccttctgccgctctg  
ctacccggtgcttctgtccgaagcaggggttctagggatcgctccgagtcgcaaaccttgcgcgtggcggggcttgttcgagcttgaaga  
 60 gc (SEQ ID NO:110)

**[0469] Resultados:** Los transformantes primarios fueron purificados clonalmente y cultivados bajo condiciones de producción de lípidos bajo nitrógeno, ya sea en pH 5,0 o pH 7,0, en función de los promotores que dirigen la expresión de los genes de desaturasa. Las líneas transgénicas derivadas de las transformaciones con pSZ1377 (D583) se ensayaron en los medios de producción de lípidos en pH 5,0, debido a la naturaleza de los promotores y el hecho de que *P. moriformis* produce más de lípidos en pH 5,0. Las líneas transgénicas generadas a partir de la transformación

de pSZ1454 (D648) y pSZ3144 (D1923) se someten a ensayo a pH 7,0 para permitir la expresión del gen desaturasa máxima cuando dirigido por el promotor PmAMT3 regulado por pH. Los perfiles resultantes de clones representativos derivados de transformaciones con D583, D648, D1923 y se muestran en las Tablas 59, 60 y 61, respectivamente, a continuación. La expresión de genes OeSAD y CpSAD1 es una clara disminución de C18: 0 longitudes de cadena con un aumento de C18: 1. También nos dimos cuenta de que hay un leve aumento en el nivel de C16: 1, lo que indica estas desaturasas de estearoil-ACP pueden tener una amplia especificidad. Los transformantes que resultaron de la expresión del gen RcSAD también disminuyen en el nivel de C18: 0, y la elevación en C16: 1. Sin embargo, también hay una caída en el nivel de C18: ácido 1 graso y aumento de C18: 2, que puede ser causado por el defecto de crecimiento de estas líneas transgénicas. El impacto de estos genes de desaturasa en el alto cepa oleico S5587 será determinado.

Tabla 59. Perfil de lípido de clones representativos derivados de la transformación con ADN D583 (pSZ1377)

Muestra ID	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2
D583-25	19.20	1.53	1.15	64.08	11.76
D583-10	21.86	0.99	1.77	61.43	11.42
D583-3	21.94	0.95	1.85	62.22	10.53
D583-33	20.76	0.95	1.85	61.76	12.17
D583-26	20.18	0.92	1.89	62.56	11.97
D583-1	21.28	0.95	1.90	62.63	10.94
S1331	25.48	0.71	3.23	59.70	8.25

Tabla 60. Perfil de lípido de clones representativos derivados de la transformación con ADN D648 (pSZ1454)

Muestra ID	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2
D648-9	26.92	2.30	1.12	54.27	11.30
D648-28	26.54	2.50	1.32	52.58	12.90
D648-15	29.47	1.68	1.48	51.74	11.48
D648-12	27.39	1.41	1.66	54.45	11.58
D648-43	29.74	1.52	1.68	52.59	10.85
D648-7	26.98	1.62	1.69	54.51	11.39
S1331-pH7	25.86	0.96	2.84	58.33	9.16

Tabla 61. Perfil de lípido de clones representativos derivados de la transformación con ADN D1923 (pSZ3144)

Muestra ID	C14:0	C14:1	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2
Bloque 2; E2; pH7; CEPA Z; T613; D1923-2	1.46	0.11	20.74	2.54	0.86	63.99	9.03
Bloque 2; G12; pH7; CEPA Z; T613; D1923-36	1.52	0.10	25.20	1.97	1.67	61.10	7.38
Bloque 2; E8; pH7; CEPA Z; T613; D1923-8	1.48	0.09	26.41	1.78	1.54	60.54	7.01
Bloque 2; F3; pH7 CEPA Z; T613; D1923-15	1.50	0.07	25.87	1.75	1.62	61.25	6.94
Bloque 2; F9; pH7; CEPA Z; T613; D1923-21	1.47	0.07	27.02	1.73	1.84	60.15	6.55
Bloque 2; F4; pH7; CEPA Z; T613; D1923-16	1.44	0.07	24.30	1.71	1.41	62.79	7.29
pH7 CEPA Z;	1.47	0.00	28.25	0.82	3.16	58.27	6.72

**[0470]** Las realizaciones descritas de la invención están destinadas a ser variaciones y modificaciones meramente ejemplares y numerosas dentro del alcance de las reivindicaciones y serán evidentes para los expertos en la técnica. Todas estas variaciones y modificaciones están destinadas a estar dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, los diversos aceites de triglicéridos pueden ser adaptados por una mezcla de cadena media y ácidos grasos de cadena larga con el fin de ajustar parámetros como la polaridad, la solvencia, y espuma de altura de los aceites o productos químicos elaborados a partir de los aceites. Además, cuando un knockout de un gen que se pide, un resultado equivalente puede ser alcanzado usando técnicas desmontables incluyendo la mutación y la expresión de sustancias inhibitoras tales como ARNi o antisentido.

## LISTADO DE SECUENCIAS

### [0471]

SEQ ID NO: 1

6S secuencia 5' donante genómica

```
GCTCTTCGCCGCCGCGCCACTCCTGCTCGAGCGCGCCCGCGCGTGCGCCGCCAGCGCCTTGGCCTTTTCG
CCGCGCTCGTGCGCGTCTGCTGATGTCCATCACCAGGTCCATGAGGTCTGCCTTGCGCCGGCTGAGCCA
CTGCTTCGTCCGGGCGGCCAAGAGGAGCATGAGGGAGGACTCCTGGTCCAGGGTCTGACGTGGTCGC
GGCTCTGGGAGCGGGCCAGCATCATCTGGCTCTGCCGCACCGAGGCCGCCTCCAAGTGGTCTCCAGC
AGCCGCAGTCGCCGCCGACCTGGCAGAGGAAGACAGGTGAGGGGGGTATGAATTGTACAGAACAACC
ACGAGCCTTGTCTAGGCAGAATCCCTACCAGTCATGGCTTTACCTGGATGACGGCCTGCGAACAGCTG
TCCAGCGACCCTCGCTGCCGCCGCTTCTCCCGCACGCTTCTTTCCAGCACCGTGATGGCGCGAGCCAG
CGCCGCACGCTGGCGCTGCGCTTCGCCGATCTGAGGACAGTCGGGGAAGTCTGATCAGTCTAAACCCC
CTTGCGCGTTAGTGTTGCCATCCTTTGCAGACCGGTGAGAGCCGACTTGTTGTGCGCCACCCCCACA
CCACCTCCTCCAGACCAATTCTGTACCTTTTTGGCGAAGGCATCGGCCTCGGCCTGCAGAGAGGAC
AGCAGTGCCCGAGCCGCTGGGGGTGGCGGATGCACGCTCAGGTACC
```

SEQ ID NO: 2

6S secuencia 3' genómica donante

```
GAGCTCCTTGTTCAGAAAGGAGTTGCTCCTTGAGCCTTTTCATTCTCAGCCTCGATAAACCTCCAAAG
CCGCTCTAATTGTGGAGGGGGTTTGAATTTAAAGCTTGGAATGTTGGTTTCGTGCGTCTGGAAACAAGC
CCAGACTTGTGCTCACTGGGAAAAGGACCATCAGCTCCAAAAAAGTTCGCCGCTCAAACCGGTACCT
CTGCTTTCGCGCAATCTGCCCTGTTGAAATCGCCACCACATTCATATTGTGACGCTTGAGCAGTCTGT
AATTGCCCTCAGAAATGTGAATCATCTGCCCCCTGTGCGAGCCCATGCCAGGCATGTGCGGGGCGAGGA
CACCCGCCACTCGTACAGCAGACCATTATGCTACCTCACAATAGTTCATAACAGTGACCATATTTCTC
GAAGCTCCCCAACGAGCACCTCCATGCTCTGAGTGCCACCCCCCGGCCCTGGTGCTTGCGGAGGGCA
GGTCAACCGGCATGGGGCTACCGAAATCCCCGACCGGATCCCACCACCCCCGCGATGGGAAGAATCTC
TCCCCGGGATGTGGGCCACCACCAGCACAACTGCTGGCCCAGGCGAGCGTCAAACCATAACCACACA
AATATCCTTGGCATCGGCCCTGAATTCCTTCTGCCGCTCTGCTACCCGGTGCTTCTGTCCGAAGCAGG
GGTTGCTAGGGATCGCTCCGAGTCCGAAACCCTTGTCGCGTGCGGGGGCTTGTTGAGCTTGAAGAG
C
```

SEQ ID NO: 3

*S. cerevisiae* secuencia de la proteína de la invertasa

```
MLLQAFLELLAGFAAKISASMTNETSDRPLVHFTPNKGWMNDPNGLWYDEKDAKWHLYFQYNPNDTVW
GTPLFWGHATSDDL TNWEDQPIAIAPKRND SGAFSGSMVVDYNN TSGFFNDTIDPRQRCVAIWYNT P
ESEEQYISYSLDGGYTFTEYQKNPVLAANSTQFRDPKVFWEPSQKWIMTAAKSQDYKIEIYSSDDLK
SWKLESAFANEGFLGYQYECPLIEVPTEQDPSKSYWVMFISINPGAPAGGSFNQYFVGSFNGTHFEA
FDNQSRVVD FGKDYALQTFNTDPTYGSALGIAWASNWEYS AFVPTNPWRSSMSLVLRKFS LNTEYQA
NPETELINLKAEPILNISNAGPWSRFATNTTLTKANSYNVDLSNSTGTLEFELVYAVNTTQTISKSVF
ADLSLWFKGLEDP EYLRMGFEVSASSFFLDRGNSKV KVFVENPYFTNRMSVNNQPFKSENDLSYKYV
YGLLDQNI LELYFNDGDVVSNTYFMTTGNALGSVNMTTGVDNLFYIDKFQVREVK
```

SEQ ID NO: 4

*S. cerevisiae* proteína invertasa secuencia de codificación de codón optimizado para la expresión en *P. moriformis* (UTEX 1435)

5 ATGctgctgcaggccttcctgttcctgctggccggcttcgcccgaagatcagcgccctccatgacgaa  
cgagacgtccgaccgccccctgggtgcacttcaccccccaacaagggctggatgaacgaccccaacggcc  
tgtggtagcagcagagaaggacgccaagtggcacctgtacttccagtacaaccgacgacaccgtctgg  
10 gggacgccccttggtctggggccacgccacgtccgacgacctgaccaactgggaggaccagcccatcgc  
catcgccccgaagcgcaacgactccggcgcccttctccggctccatgggtgggtggactacaacaacacct  
ccggcttcttcaacgacaccatcgacccgcgccagcgctgctgggcatctggacctacaacaccccg  
gagtcggaggagcagtagatctcctacagcctggacggcggtacaccttcaccgagtagaccagaagaa  
ccccgtgctggccgccaactccacccagttccgcgacccgaagggtcttctggtagagccctcccaga  
15 agtggatcatgaccgcgcccaagtcccaggactacaagatcgagatctactcctccgacgacctgaag  
tcctggaagctggagtcgcgcttcgccaacgagggcttcctcggtaccagtagagtgccccggcct  
gatcgaggtccccaccgagcaggacccccagcaagtcctactgggtgatgttcatctccatcaaccccg  
gcgccccggcgcggtccttcaaccagtagcttcgctcgccagcttcaacggcaccacattcgaggcc  
ttcgacaaccagtcgcgctgggtggaacttcggcaaggactactacgcccgcagaccttcttcaaac  
20 cgaccgacctaaggagcgccctgggcatcgctgggctcccaactgggagtagctccgccttcgtgc  
ccaccaacccctggcgctcctccatgtcctcgtgcgcaagttctccctcaacaccgagtagaccggcc  
aaccgggagacggagctgatcaacctgaaggccgagccgatcctgaacatcagcaacgcccggccctg  
gagccggttcgccaccaacaccacgttgacgaaggccaacagctacaacgtcgacctgtccaacagca  
25 ccggcacccctggagttcgagctgggtgtagcgcgtcaacaccacccagacgatctccaagtcggtgttc  
gcgacctctcctctggttcaaggccctggaggacccccgaggagtagctccgcgatgggcttcgaggt  
gtccgcgtcctccttcttctcctggaccgcgggaacagcaaggtgaagttcgtgaaggagaacccctact  
tcaccaaccgcatgagcgtgaacaaccagcccttcaagagcgagaacgacctgtcctactacaaggtg  
30 taggcttgctggaccagaacatcctggagctgtacttcaacgacggcgacgtcgtgtccaccaaac  
ctacttcatgaccacgggaacgcctgggctccgtgaacatgacgacgggggtggacaacctgttct  
acatcgacaagttccaggtgcgcgaggtcaagTGA

SEQ ID NO: 5

35 *Chlamydomonas reinhardtii* TUB2 (B-bañera) promotor/5' UTR

40 CTTTCTTGCCTATGACACTTCCAGCAAAAAGGTAGGGCGGGCTGCGAGACGGCTTCCCGGCGCTGCAT  
GCAACACCGATGATGCTTCGACCCCCGAAGCTCCTTCGGGGCTGCATGGGCGCTCCGATGCCGCTCC  
AGGGCGAGCGCTGTTTAAATAGCCAGGCCCCCGATTGCAAAGACATTATAGCGAGCTACCAAAGCCAT  
ATTCAAACACCTAGATCACTACCACTTCTACACAGGCCACTCGAGCTTGTGATCGCACTCCGCTAAGG  
GGGCGCCTCTTCCTCTTCGTTTCAGTCACAACCCGCAAAC

45 SEQ ID NO: 6 *Chlorella vulgaris* nitrato reductasa 3'UTR

50 GCAGCAGCAGCTCGGATAGTATCGACACACTCTGGACGCTGGTCGTGTGATGGACTGTTGCCGCCACA  
CTTGCTGCCTTGACCTGTGAATATCCCTGCCGCTTTTATCAAACAGCCTCAGTGTGTTTGATCTTGTG  
TGTACGCGCTTTTTCGAGTTGTAGCTGTCTGTGCTATTTGCGAATACCACCCCGAGCATCCCTTCC  
CTCGTTTCATATCGCTTGCATCCCAACCGCAACTTATCTACGCTGTCTGCTATCCCTCAGCGCTGCT  
CCTGCTCCTGCTCACTGCCCCTCGCACAGCCTTGGTTTGGGCTCCGCCTGTATTCTCCTGGTACTGCA  
55 ACCTGTAAACCAGCACTGCAATGCTGATGCACGGGAAGTAGTGGGATGGGAACACAAATGGAAAGCTT

SEQ ID NO: 7

Secuencia de nucleótidos del casete de expresión de codones optimizados de *S. cerevisiae* gen *suc2* con *C. reinhardtii* promotor de  $\beta$ -tubulina/5'UTR y *C. vulgaris* nitrato reductasa 3' UTR8

60

65

5 CTTTCTTGCGCTATGACACTTCCAGCAAAAAGGTAGGGCGGGCTGCGAGACGGCTTCCCGGCGCTGCAT  
 GCAACACCGATGATGCTTCGACCCCCGAAGCTCCTTCGGGGCTGCATGGGCGCTCCGATGCCGCTCC  
 AGGGCGAGCGCTGTTTAAATAGCCAGGCCCCCGATTGCAAAGACATTATAGCGAGCTACCAAAGCCAT  
 ATTCAAACACCTAGATCACTACCACCTTCTACACAGGCCACTCGAGCTTGTGATCGCACTCCGCTAAGG  
 10 GGGCGCCTCTTCCTCTTCGTTTCAGTCAACAACCCGCAAACGGCGCGCCATGCTGCTGCAGGCCTTCCT  
 GTTCCTGCTGGCCGGCTTCGCCGCCAAGATCAGCGCCTCCATGACGAACGAGACGTCCGACCGCCCCC  
 TGGTGCACCTTCACCCCCAACAAGGGCTGGATGAACGACCCCAACGGCCTGTGGTACGACGAGAAGGAC  
 GCCAAGTGGCACCTGTACTTCCAGTACAACCCGAACGACACCGTCTGGGGGACGCCCTTGTTCTGGGG  
 CCACGCCACGTCCGACGACCTGACCAACTGGGAGGACCAGCCCATCGCCATCGCCCCGAAGCGCAACG  
 15 ACTCCGGCGCCTTCTCCGGCTCCATGGTGGTGGACTACAACAACACCTCCGGCTTCTTCAACGACACC  
 ATCGACCCGCGCCAGCGCTGCGTGGCCATCTGGACCTACAACACCCCGGAGTCCGAGGAGCAGTACAT  
 CTCCTACAGCCTGGACGGCGGCTACACCTTCACCGAGTACCAGAAGAACCCCGTGCTGGCCGCCAACT  
 CCACCCAGTTCGCGACCCGAAGGTCTTCTGGTACGAGCCCTCCCAGAAGTGGATCATGACCGCGGCC  
 AAGTCCCAGGACTACAAGATCGAGATCTACTCCTCCGACGACCTGAAGTCTGGAAGCTGGAGTCCGC  
 20 GTTCGCCAACGAGGGCTTCCTCGGCTACCAGTACGAGTGCCCCGGCCTGATCGAGGTCCCCACCGAGC  
 AGGACCCAGCAAGTCTTACTGGGTGATGTTTCATCTCCATCAACCCCGGCGCCCCGGCCGGCGGCTCC  
 TTCAACCAGTACTTCGTCGGCAGCTTCAACGGCACCCACTTCGAGGCCTTCGACAACAGTCCCAGCT  
 GGTGGACTTCGGCAAGGACTACTACGCCCTGCAGACCTTCTTCAACACCGACCCGACCTACGGGAGCG  
 25 CCCTGGGCATCGCGTGGGCCTCCAACCTGGGAGTACTCCGCCTTCGTGCCACCAACCCCTGGCGCTCC  
 TCCATGTCCCTCGTGCGAAGTTCTCCCTCAACACCGAGTACCAGGCCAACCCGGAGACGGAGCTGAT  
 CAACCTGAAGGCCGAGCCGATCCTGAACATCAGCAACGCCGGCCCCCTGGAGCCGTTTCGCCACCAACA  
 CCACGTTGACGAAGGCCAACAGCTACAACGTCGACCTGTCCAACAGCACCGGCACCCCTGGAGTTCGAG  
 CTGGTGTACGCCGTCAACACACCCAGACGATCTCCAAGTCCGTGTTTCGCGGACCTCTCCCTCTGGTT  
 30 CAAGGGCCTGGAGGACCCCGAGGAGTACCTCCGCATGGGCTTCGAGGTGTCCGCGTCTCCTTCTTCC  
 TGGACCGCGGGAACAGCAAGGTGAAGTTCGTGAAGGAGAACCCCTACTTCACCAACCGCATGAGCGTG  
 AACACCCAGCCCTTCAAGAGCGGAGAACGACCTGTCCTACTACAAGGTGTACGGCTTGCTGGACCAGAA  
 CATCCTGGAGCTGTACTTCAACGACGGCGACGTGCTGTCCACCAACACCTACTTCATGACCACCGGGA  
 35 ACGCCCTGGGCTCCGTGAACATGACGACGGGGTGGACAACCTGTTCTACATCGACAAGTTCCAGGTG  
 CGCGAGGTCAAGTGACAATTGGCAGCAGCAGCTCGGATAGTATCGACACACTCTGGACGCTGGTCTGTG  
 TGATGGACTGTTGCCGCCACACTTGCTGCCTTGACCTGTGAATATCCCTGCCGCTTTTATCAAACAGC  
 CTCAGTGTGTTTGATCTTGTGTGTACGCGCTTTTTCGAGTTGCTAGCTGCTTGTGCTATTTGCGAATA  
 40 CCACCCCCAGCATCCCCTTCCCTCGTTTTCATATCGCTTGATCCCAACCGCAACTTATCTACGCTGTC  
 CTGCTATCCCTCAGCGCTGCTCCTGCTCCTGCTCACTGCCCTCGCACAGCCTTGTTTTGGGCTCCGC  
 CTGTATTCTCCTGGTACTGCAACCTGTAAACCAGCACTGCAATGCTGATGCACGGGAAGTAGTGGGAT  
 45 GGGAACACAAATGGAGGATCC

SEQ ID NO: 8

*Prototheca moriformis* (UTEX 1435) promotor Amt03

50

55

60

65

GGCCGACAGGACGCGCGTCAAAGGTGCTGGTGTATGCCCTGGCCGGCAGGTGCTTGCTGCTGCTG  
 GTTAGTGATTCCGCAACCCTGATTTTGGCGTCTTATTTTGGCGTGGCAAACGCTGGCGCCCCGCGAGCC  
 5 GGGCCGGCGGCGATGCGGTGCCCCACGGCTGCCGGAATCCAAGGGAGGCAAGAGCGCCCCGGGTCAGTT  
 GAAGGGCTTTACGCGCAAGGTACAGCCGCTCCTGCAAGGTGCGTGGTGAATTGGACGTGCAGGTCC  
 TGCTGAAGTTTCTCCACCGCCTCACCAGCGGACAAAGCACCAGGTGTATCAGGTCCGTGTATCCACTC  
 TAAAGAGCTCGACTACGACCTACTGATGGCCCTAGATTCTTCATCAAAAACGCCTGAGACACTTGCCC  
 10 AGGATTGAACTCCCTGAAGGGACCACCAGGGGCCCTGAGTTGTTTCTTCCCCCGTGGCGAGCTGCC  
 AGCCAGGCTGTACCTGTGATCGAGGCTGGCGGGAAAATAGGCTTCGTGTGCTCAGGTTCATGGGAGGTG  
 CAGGACAGCTCATGAAACGCCAACAATCGCACAAATTCATGTCAAGCTAATCAGCTATTTCTCTTCAC  
 GAGCTGTAATTGTCCAAAATTCTGGTCTACCGGGGGTGATCCTTCGTGTACGGGCCCCCTCCCTCAAC  
 15 CCTAGGTATGCGCGCATGCGGTGCGCGCGCAACTCGCGCGAGGGCCGAGGGTTTGGGACGGGCGTCC  
 CGAAATGCAGTTGCACCCGGATGCGTGGCACCTTTTTTGCATAATTTATGCAATGGACTGCTCTGCA  
 AAATTCTGGCTCTGTGCGCAACCCTAGGATCAGCGGCGTAGGATTTCTGTAATCATTTCGTCTGATGGG  
 GAGCTACCGACTACCCTAATATCAGCCCCGACTGCCTGACGCCAGCGTCCACTTTTGTGCACACATTCC  
 20 ATTCGTGCCCAAGACATTTTCATTGTGGTGCAGCGTCCCCAGTTACGCTCACCTGTTTCCCGACCTC  
 CTTACTGTTCTGTGACAGAGCGGGCCACAGGCCGGTTCGAGCC

SEQ ID NO: 9

*Chlorella protothecoides* (UTEX 250) de péptido de tránsito de desaturasa secuencia estearoil ACP cDNA codón optimizado para la expresión en *P. moriformis*.

ACTAGTATGGCCACCGCATCCACTTTCTCGGCGTTCAATGCCCGCTGCGGCGACCTGCGTCGCTCGGC  
 GGGCTCCGGGGCCCCGGCGCCAGCGAGGCCCTCCCCGTGCGCGGGCGCGCC

SEQ ID NO: 10

*Cuphea wrightii* FatB2 tioesterasa secuencia de ácido nucleico; Gen Bank Nº de Acceso U56104

ATGGTGGTGGCCGCCGCGCCAGCAGCGCCTTCTTCCCCGTGCCCGCCCCCGCCCCACCCCCAAGCC  
 CGGCAAGTTCGGCAACTGGCCCAGCAGCCTGAGCCAGCCCTTCAAGCCCAAGAGCAACCCCCAACGGCC  
 GCTTCCAGGTGAAGGCCAACGTGAGCCCCACGGGCGCGCCCCAAGGCCAACGGCAGCGCCGTGAGC  
 CTGAAGTCCGGCAGCCTGAACACCCTGGAGGACCCCCCAGCAGCCCCCCCCCGCACCTTCTGAA  
 35 CCAGCTGCCGACTGGAGCCGCCTGCGCACCGCCATCACCACCGTGTTCGTGGCCGCGGAGAAGCAGT  
 TCACCCGCCTGGACCGCAAGAGCAAGCGCCCCGACATGCTGGTGGACTGGTTTCGGCAGCGAGACCATC  
 GTGCAGGACGGCCTGGTGTTCGCGAGCGCTTCAGCATCCGCAGCTACGAGATCGGCGCCGACCGCAC  
 CGCCAGCATCGAGACCCTGATGAACCACCTGCAGGACACCAGCCTGAACCACTGCAAGAGCGTGGGCC  
 40 TGCTGAACGACGGCTTCGGCCGACCCCCGAGATGTGCACCCGCGACCTGATCTGGGTGCTGACCAAG  
 ATGCAGATCGTGGTGAACCGCTACCCACCTGGGGCGACACCGTGGAGATCAACAGCTGGTTTCAGCCA  
 GAGCGGCAAGATCGGCATGGGCCGCGAGTGGCTGATCAGCGACTGCAACACCGGCGAGATCCTGGTGC  
 GCGCCACCAGCGCCTGGGCCATGATGAACCAGAAGACCCGCGCTTCAGCAAGCTGCCCTGCGAGGTG  
 45 CGCCAGGAGATCGCCCCCACTTCGTGGACGCCCCCCCCCGTGATCGAGGACAACGACCGCAAGCTGCA  
 CAAGTTCGACGTGAAGACCGGCGACAGCATCTGCAAGGGCCTGACCCCGGCTGGAACGACTTCGACG  
 TGAACCAGCACGTGAGCAACGTGAAGTACATCGGCTGGATTCTGGAGAGCATGCCACCGAGGTGCTG  
 50 GAGACCCAGGAGCTGTGCAGCCTGACCCTGGAGTACCGCCGCGAGTGCAGGCGGAGAGCGTGGTGA  
 GAGCGTGACCAGCATGAACCCAGCAAGGTGGGCGACCGCAGCCAGTACCAGCACCTGCTGCGCCTGG

AGGACGGCGCCGACATCATGAAGGGCCGCACCGAGTGGCGCCCCAAGAACGCCGGCACCAACCGCGCC  
 ATCAGCACCTGA

SEQ ID NO: 11

*Cuphea wrightii* FatB2 tioesterasa secuencia de aminoácidos; Gen Bank Nº de Acceso U56104



5 MVVAAAASSAFFFPVAPRPTPKPGKFGNWFPSSLSQPFKPKSNPNGRFQVKANVSPHPKANGSAVSLKS  
 GSLNTLEDPPSSPPPTFLNQLPDWSRLRTAITTVFVAAEKQFTRLDRKSKRPDMLVDWFGSETIVQD  
 GLVFRERFSIRS YEIGADRTAS IETLMNHLQD TSLNHCKSVGLLNDGFGRTPEMCTRD LIWVLT KMQI  
 VVNRYPTWGD TVEINSWF SQSGKIGMGREW LISDCNTGEILVRATSAWAMMNQKTRRF SKLPCEVRQE  
 IAPHFVDAPPVIEDNDRKLHKFDVKTGDSICKGLTPGWNDFDVNQHVS NVKYIGWILESMPTEVLETQ  
 10 ELCSLTLEYRRECGRESVSVTSMNPSKVGDRSQYQHLLRLEDGADIMKGRTEWRPKNAGTNRAIST

SEQ ID NO: 12

Región de codificación con optimizada por codones *Cocus nucifera* LPAAT que prefiere C12: 0 de pSZ2046

15 ATGGACGCCTCCGGCGCCTCCTCCTTCCTGCGCGGCCGCTGCCTGGAGTCTTGCTTCAAGGCCTCCTT  
 CGGCTACGTAATGTCCCAGCCCAAGGACGCCGCCGGCCAGCCCTCCCGCCGCCCCGCCGACGCCGACG  
 ACTTCGTGGACGACGACCGCTGGATCACCGTGATCCTGTCCGTGGTGCGCATCGCCGCCTGCTTCCTG  
 20 TCCATGATGGTGACCACCATCGTGTGGAACATGATCATGCTGATCCTGCTGCCCTGGCCCTACGCCCG  
 CATCCGCCAGGGCAACCTGTACGGCCACGTGACCGGCCGCATGCTGATGTGGATTCTGGGCAACCCCA  
 TCACCATCGAGGGCTCCGAGTTCTCCAACACCCGCGCCATCTACATCTGCAACCACGCCCTCCCTGGTG  
 GACATCTTCCTGATCATGTGGCTGATCCCCAAGGGCACCCTGACCATCGCCAAGAAGGAGATCATCTG  
 GTATCCCCTGTTTCGGCCAGCTGTACGTGCTGGCCAACCACCAGCGCATCGACCGCTCCAACCCCTCCG  
 25 CCGCCATCGAGTCCATCAAGGAGGTGGCCCCGCGCCGTGGTGAAGAAGAACCTGTCCCTGATCATCTTC  
 CCCGAGGGCACCCGCTCCAAGACCGGCCGCCTGCTGCCCTTCAAGAAGGGCTTCATCCACATCGCCCT  
 CCAGACCCGCTGCCCATCGTGCCGATGGTGTGACCGGCACCCACCTGGCCTGGCGCAAGAACTCCC  
 TGCGCGTGCGCCCCGCCCCATCACCGTGAAGTACTTCTCCCCATCAAGACCGACGACTGGGAGGAG  
 30 GAGAAGATCAACCACTACGTGGAGATGATCCACGCCCTGTACGTGGACCACCTGCCCGAGTCCCAGAA  
 GCCCTGGTGTCCAAGGGCCGCGACGCCTCCGGCCGCTCCAACCTCCTGA

SEQ ID NO: 13

pLoop secuencia 5' donante genómica

35 gctcttcgctaacggaggtctgtcaccaaatggaccccgctctattgcgggaaaccacggcgatggcac  
 gtttcaaaaacttgatgaaatacaatattcagtatgtcgcgggcgggcgacggcggggagctgatgtcg  
 40 gctgggtattgcttaatcgccagcttcgcccccgcttggtgcgagggcgtgaacaagccgaccgatgt  
 gcacgagcaaatcctgacactagaagggctgactcgccggcgacggctgaattacacaggttgcaaa  
 aataaccagaatttgacgcacacgtatttcgcggtattttgttgacagtgaatagcgatgcggcaatgg  
 cttgtggcggttagaaggtgcgacgaaggtgggtgccaccactgtgccagccagtcctggcggtcccag  
 45 ggccccgatcaagagccaggacatccaaactacccacagcatcaacgccccggcctatactcgaaccc  
 cacttgcaactctgcaatggtatgggaaccacggggcagtccttggtgtgggtcgcgccctatcgcggtcgg  
 cgaagaccgggaaggtacc

SEQ ID NO: 14

pLoop secuencia 3' genómica donante

50 gagctcagcggcgacgggtcctgctaccgtacgacgttgggcacgcccattgaaagtttgtataccgagc  
 ttgttgagcgaactgcaagcgcggtcaaggatacttgaaactcctggattgatatcggtccaataatg  
 gatggaaaatccgaacctcgtgcaagaactgagcaaacctcgttacatggatgcacagtcgccagtc  
 55 aatgaacattgaagtgagcgaactgttcgcttcggtggcagtaactactcaaagaatgagctgctgta  
 aaaatgcactctcgttctctcaagtgagtggcagatgagtgctcacgccttgcaacttcgctgcccgtg  
 60 tcatgccctgcgccccaaaatttgaaaaaagggatgagattattgggcaatggacgacgtcgtcgctc  
 cgggagtcaggaccggcggaataagagggaacacactccgcttcttagctcttcc

SEQ

ID NO: 15

Casete de expresión NeoR incluyendo *C. reinhardtii* promotor  $\beta$ -tubulina/5'UTR y *C. vulgaris* nitrato reductasa 3' UTR

65

5 ctttcttgcgctatgacacttccagcaaaaggtagggcgggctgagagacggcttcccggcgctgcat  
gcaacaccgatgatgcttcgacccccgaagctccttcggggctgcatgggcgctccgatgccgctcc  
agggcgagcgctgtttaaatagccaggcccccgattgcaaagacattatagcgagctaccaaagccat  
attcaaacacctagatcactaccacttctacacaggccactcgagcttgtgatcgactccgctaagg  
10 gggcgcttcttcttctcgtttcagtcacaacccgcaaadtctagaatatcaATGatcgagcaggacg  
gcctccacgcgcggtccccgcgcctgggtggagcgctgttcggctacgactgggccagcagacc  
atcggtgctccgacgcccgtgttcgcctgtccgcccaggccgcccgtgctgttcgtgaagac  
cgacctgtccggcgccctgaacgagctgcaggacgaggccgcccgcctgtcctggctggccaccaccg  
15 gcgtgccctgcgcccgcctgctggacgtggtgaccgaggccgcccgcgactggctgctgctgggagag  
gtgcccggccaggacctgctgtcctcccacctggcccccgccgagaaggtgtccatcatggccgacgc  
catgcgcccgcctgcacaccctggaccccgccacctgccccttcgaccaccaggccaagcaccgcatcg  
agcgcgcccgcacccgcatggaggccgcccgtggtggaccaggacgacctggacgaggagcaccagggc  
ctggcccccgccgagctgttcgcccgcctgaaggcccgcctgcccgcgagcaggacctggtggtgac  
20 ccaggcgacgcctgcctgcccaacatcatggtggagaacggccgcttctccggcttcatcgactgcg  
gccgcctgggctggccgaccgctaccaggacatcgccctggccacccgcgacatcgccgaggagctg  
ggcgcgagtgggccgaccgcttctggtgctgtacggcatcgccgccccgactcccagcgcatcgc  
cttctaccgcctgctggacgagttcttcTGACaattggcagcagcagctcgatagtatcgacacact  
25 ctggacgctggtcgtgtgatggactgttgcggccacacttgctgccttgacctgtgaatatccctgcc  
gcttttatcaaacagcctcagtggtgttgatcttgtgtgtacgcgcttttgagagttgctagctgctt  
gtgctatttgcgaataaccaccccagcatccccttccctcgtttcataatcgcttgcatcccaaccgca  
acttatctacgctgtcctgctatccctcagcgctgctcctgctcctgctcactgcccctcgacagcc  
30 ttggtttgggctccgcctgtattctcctggtactgcaacctgtaaacagcactgcaatgctgatgca  
cgggaagttagtgggatgggaacacaaatggagatcc

SEQ ID NO: 16

*Cocos nucifera* aciltransferasa de 1-acil-sn-glicerol-3-fosfato (LPAAT)

35 MDASGASSFLRGRCLSECFKASFGYVMSQPKDAAGQPSRRPADADDFVDDDRWITVILSV  
VRIAACFLSMMVTTIVWNMIMLILLPWPYARIRQGNLYGHVTGRMLMWILGNPITIEGSE  
40 FSNTRAIYICNHASLVDIFLIMWLIPKGTVTIAKKEIIWYPLFGQLYVLANHQRIDRSNP  
SAAIESIKEVARAVVKNLSLIIFPEGTRSKTGRLLPFKKGFIIHALQTRLPIVPMVLTG  
THLAWRKNSLRVPAPITVKYFSPIKTDDWEEEEKINHYVEMIHALYVDHLPESQKPLVSK  
GRDASGRSNS

45 SEQ ID NO: 17

pSZ1500

50 GGGCTGGTCTGAATCCTTCAGGCGGGTGTACCCGAGAAAGAAAGGGTGCCGATTTCAAAGCAGACCC  
ATGTGCCGGGCCCTGTGGCCTGTGTTGGCGCCTATGTAGTCACCCCCCTCACCAATTGTCGCCAGT  
TTGCGCACTCCATAAACTCAAAACAGCAGCTTCTGAGCTGCGCTGTTCAAGAACACCTCTGGGGTTTG  
CTCACCCGCGAGGTCGACGCCAGCATGGCTATCAAGACGAACAGGCAGCCTGTGGAGAAGCCTCCGT  
TCACGATCGGGACGCTGCGCAAGGCCATCCCCGCGCACTGTTTCGAGCGCTCGGCGCTTCGTAGCAGC  
55 ATGTACCTGGCCTTTGACATCGCGGTATGTCCCTGCTCTACGTGCGGTGACGTACATCGACCCTGC  
ACCGTGCCTACGTGGGTCAAGTACGGCATCATGTGGCCGCTCTACTGGTTCTTCCAGGTGTGTTTGA  
GGGTTTTGGTTGCCCGTATTGAGGTCTGGTGGCGCGCATGGAGGAGAAGGCGCCTGTCCCGCTGACC  
CCCCGGCTACCTTCCCGGCACCTTCCAGGGCGCCTTCGGCACGGGTGTCTGGGTGTGCGCGCACGAG  
60 TGCGGCCACAGGCCTTTTCTCCAGCCAGGCCATCAACGACGGCGTGGGCCTGGTGTTCACAGCCT

5 GCTGCTGGTGCCCTACTACTCCTGGAAGCACTCGCACCGGGTACCCTTTCTTGCGCTATGACACTTCC  
 AGCAAAAGGTAGGGCGGGCTGCGAGACGGCTTCCGCGCTGCATGCAACACCGATGATGCTTCGACC  
 CCCCGAAGCTCCTTCGGGGCTGCATGGGCGCTCCGATGCCGCTCCAGGGCGAGCGCTGTTTAAATAGC  
 CAGGCCCCCGATTGCAAAGACATTATAGCGAGCTACCAAAGCCATATTCAAACACCTAGATCACTACC  
 ACTTCTACACAGGCCACTCGAGCTTGTGATCGCACTCCGCTAAGGGGGCGCCTCTTCTCTTCGTTTC  
 AGTCACAACCCGCAAACCTCTAGAATATCAATGCTGCTGCAGGCCTTCTGTTCTGCTGGCCGGCTTC  
 10 GCCGCCAAGATCAGCGCCTCCATGACGAACGAGACGTCCGACCGCCCCCTGGTGCACCTTACCCCCAA  
 CAAGGGCTGGATGAACGACCCCCAACGGCCTGTGGTACGACGAGAAGGACGCCAAGTGGCACCTGTACT  
 TCCAGTACAACCCGAACGACACCGTCTGGGGGACGCCCTTGTCTGGGGCCACGCCACGTCCGACGAC  
 CTGACCAACTGGGAGGACCAGCCCATCGCCATCGCCCCGAAGCGCAACGACTCCGGCGCCTTCTCCGG  
 CTCCATGGTGGTGGACTACAACAACACCTCCGGCTTCTTCAACGACACCATCGACCCGCGCCAGCGCT  
 15 GCGTGGCCATCTGGACCTACAACACCCCGGAGTCCGAGGAGCAGTACATCTCCTACAGCCTGGACGGC  
 GGCTACACCTTACCGAGTACCAGAAGAACCCCGTGTGCGGCCAACTCCACCCAGTTCCGCGACCC  
 GAAGGTCTTCTGGTACGAGCCCTCCAGAAGTGGATCATGACCGCGGCCAAGTCCCAGGACTACAAGA  
 TCGAGATCTACTCCTCCGACGACCTGAAGTCTGGAAGCTGGAGTCCGCGTTCGCCAACGAGGGCTTC  
 CTCGGCTACCAGTACGAGTGCCCCGGCCTGATCGAGGTCCCCACCGAGCAGGACCCAGCAAGTCTTA  
 20 CTGGGTGATGTTTCATCTCCATCAACCCCGGCGCCCCGGCCGGCGGCTCCTTCAACCAGTACTTCGTCG  
 GCAGCTTCAACGGCACCCACTTCGAGGCCTTCGACAACCAAGTCCGCGTGGTGGACTTCGGCAAGGAC  
 TACTACGCCCTGCAGACCTTCTTCAACACCGACCCGACCTACGGGAGCGCCCTGGGCATCGCGTGGGC  
 CTCCAACTGGGAGTACTCCGCCTTCGTGCCACCAACCCCTGGCGCTCCTCCATGTCCCTCGTGCGCA  
 AGTTCTCCCTCAACACCGAGTACCAGGCCAACCCGGAGACGGAGCTGATCAACCTGAAGGCCGAGCCG  
 25 ATCCTGAACATCAGCAACGCCGGCCCCCTGGAGCCGGTTCGCCACCAACACCACGTTGACGAAGGCCAA  
 CAGCTACAACGTGACCTGTCCAACAGCACCGGCACCCCTGGAGTTCGAGCTGGTGTACGCCGTCAACA  
 CCACCCAGACGATCTCCAAGTCCGTGTTGCGCGACCTCTCCCTCTGGTTCAAGGGCCTGGAGGACCCC  
 GAGGAGTACCTCCGATGGGCTTCGAGGTGTCCGCGTCTCCTTCTTCTTGACCGCGGGAACAGCAA  
 30 GGTGAAGTTCTGTGAAGGAGAACCCTACTTCACCAACCGCATGAGCGTGAACAACCAGCCCTTCAAGA  
 GCGAGAACGACCTGTCTACTACAAGGTGTACGGCTTGTCTGGACCAGAACATCCTGGAGCTGTACTTC  
 AACGACGGCGACGTCTGTGCCACCAACACCTACTTTCATGACCACCGGGAACGCCCTGGGCTCCGTGAA  
 CATGACGACGGGGGTGGACAACCTGTTCTACATCGACAAGTTCCAGGTGCGCGAGGTCAAGTGACAAT  
 TGGCAGCAGCAGCTCGGATAGTATCGACACACTCTGGACGCTGGTCGTGTGATGGACTGTTGCCGCCA  
 35 CACTTGCTGCCTTGACCTGTGAATATCCCTGCCGCTTTTATCAAAACAGCCTCAGTGTGTTTGATCTTG  
 TGTGTACGCGCTTTTGCGAGTTGTAGCTGCTTGTGCTATTTGCGAATACCACCCCCAGCATCCCCCTT  
 CCCTCGTTTCATATCGCTTGCATCCCAACCGCAACTTATCTACGCTGTCTGTCTATCCCTCAGCGCTG  
 CTCTGTCTCTGTCTCACTGCCCCCTCGCACAGCCTTGGTTTGGGCTCCGCCTGTATTCTCTCTGGTACTG  
 40 CAACCTGTAAACCAGCACTGCAATGCTGATGCACGGGAAGTAGTGGGATGGGAACACAAATGGAGGAT  
 CCCGCGTCTCGAACAGAGCGCGCAGAGGAACGCTGAAGGTCTCGCCTCTGTGCGACCTCAGCGCGGCA  
 TACACCACAATAACCACCTGACGAATGCGCTTGGTTCTTCGTCCATTAGCGAAGCGTCCGGTTCACAC  
 ACGTGCCACGTTGGCGAGGTGGCAGGTGACAATGATCGGTGGAGCTGATGGTTCGAAACGTTTCACAGCC  
 45 TAGGGATATCGAATTCCGCCGACAGGACGCGCGTCAAAGGTGCTGGTCTGTATGCCCTGGCCGGCAG  
 GTCGTTGCTGCTGCTGGTTAGTGATTCCGCAACCCTGATTTTGGCGTCTTATTTTGGCGTGGCAAACG  
 CTGGCGCCCGCGAGCCGGGCGCGCGGCGATGCGGTGCCCCACGGCTGCCGGAATCCAAGGGAGGCAAG  
 AGCGCCCGGGTCAGTTGAAGGGCTTTACGCGCAAGGTACAGCCGCTCCTGCAAGGCTGCGTGGTGGAA  
 TTGGACGTGCAGGTCTGCTGAAGTTCCTCCACCGCCTACCCAGCGGACAAAGACCCGTGTATCAGG  
 50 TCCGTGTCTACTTCTAAAGAACTCGACTACGACTACTGATGGCCCTAGATTCTTCATCAAAAACG  
 CCTGAGACACTTGCCAGGATTGAAACTCCCTGAAGGGACACCAGGGGCCCTGAGTTGTTTCCCTTCCC  
 CCGTGGCGAGCTGCCAGCCAGGCTGTACCTGTGATCGAGGCTGGCGGGAAAATAGGCTTCGTGTGCT  
 CAGGTTCATGGGAGGTGCAGGACAGCTCATGAAACGCCAACAAATCGCACAAATTCATGTCAAGCTAATCA  
 55 GCTATTTTCTCTTACGAGCTGTAATTGTCCAAAATTCTGGTCTACCGGGGGTGATCCTTCGTGTAC  
 GGGCCCTTCCCTCAACCCTAGGTATGCGCGCATGCGGTGCGCGCAACTCGCGCGAGGGCCGAGGGT  
 TTGGGACGGGCGCTCCCGAAATGCAGTTGCACCCGGATGCGTGGCACCTTTTTTGGGATAATTTATGC  
 AATGGACTGCTCTGCAAAATTCTGGCTCTGTGCGCAACCCTAGGATCAGCGGCGTAGGATTTTCGTAAT  
 60 CATTCGTCTGATGGGGAGCTACCGACTACCCTAATATCAGCCCGACTGCCTGACGCCAGCGTCCACT  
 TTTGTGCACACATTCCATTCTGTGCCAAGACATTTTATTGTGGTGCGAAGCGTCCCCAGTTACGCTCA  
 CCTGTTTCCCGACCTCCTTACTGTTCTGTGACAGAGCGGGCCACAGGCCGCTCGCAGCCACTAGTA  
 TGGCCACCGCATCCACTTTCTCGGCGTTCAATGCCCGCTGCGGCGACCTGCGTCTGCTGGCGGGCTCC  
 65

5 GGGCCCCGGCGCCCAGCGAGGCCCCCTCCCCGTGCGCGGGCGCGCCGCCACCGGCGAGCAGCCCTCCGG  
CGTGCCCTCCCTGCGCGAGGCCGACAAGGAGAAGTCCCTGGGCAACCGCCTGCGCCTGGGCTCCCTGA  
CCGAGGACGGCCTGTCTACAAGGAGAAGTTCGTGATCCGCTGCTACGAGGTGGGCATCAACAAGACC  
GCCACCATCGAGACCATCGCCAACCTGCTGCGAGGAGTGGGCGGCAACCACGCCAGGGCGTGGGCTT  
CTCCACCGACGGCTTCGCCACCACCACCACCATGCGCAAGCTGCACCTGATCTGGGTGACCGCCCGCA  
TGCACATCGAGATCTACCGCTACCCCGCCTGGTCCGACGTGATCGAGATCGAGACCTGGGTGCAGGGC  
10 GAGGGCAAGGTGGGCACCCGCCGCGACTGGATCCTGAAGGACTACGCCAACGGCGAGGTGATCGGCCG  
CGCCACCTCCAAGTGGGTGATGATGAACGAGGACACCCGCCGCTGCGAGAGGTGTCCGACGACGTGC  
GCGAGGAGTACCTGGTGTCTGCCCCCGCACCTGCGCCTGGCCTTCCCCGAGGAGAACAACAACCTCC  
ATGAAGAAGATCCCCAAGCTGGAGGACCCCGCCGAGTACTCCCGCCTGGGCCTGGTGCCCCGCCGCTC  
CGACCTGGACATGAACAAGCACGTGAACAACGTGACCTACATCGGCTGGGCCCTGGAGTCCATCCCCC  
15 CCGAGATCATCGACACCCACGAGCTGCAGGCCATCACCTGGACTACCGCCGCGAGTGCCAGCGCGAC  
GACATCGTGGACTCCCTGACCTCCCCGCGAGCCCCCTGGGCAACGCCGCCGGCGTGAAGTTCAAGGAGAT  
CAACGGCTCCGTGTCCCCCAAGAAGGACGAGCAGGACCTGTCCCGCTTCATGCACCTGCTGCGCTCCG  
CCGGCTCCGGCCTGGAGATCAACCGCTGCCGACCGAGTGGCGCAAGAAGCCCCGCCAAGCGCATGGAC  
20 TACAAGGACCACGACGGCGACTACAAGGACCACGACATCGACTACAAGGACGACGACGACAAGTGAAT  
CGATAGATCTCTTAAGGCAGCAGCAGCTCGGATAGTATCGACACACTCTGGACGCTGGTCTGTGATG  
GACTGTTGCCGCCACACTTGCTGCCTTGACCTGTGAATATCCCTGCCGCTTTTATCAAACAGCCTCAG  
TGTGTTTGATCTTGTGTGTACGCGCTTTTGCAGTTGCTAGCTGCTTGTGCTATTTGCGAATACCACC  
CCCAGCATCCCCCTTCCCTCGTTTCATATCGCTTGATCCCAACCGCAACTTATCTACGCTGTCCTGCT  
25 ATCCCTCAGCGCTGCTCCTGCTCCTGCTCACTGCCCCCTCGCACAGCCTTGGTTTGGGCTCCGCCTGTA  
TTCTCCTGGTACTGCAACCTGTAAACCAGCACTGCAATGCTGATGCACGGGAAGTAGTGGGATGGGAA  
CACAAATGGAAAGCTTAATTAAGAGCTCCCGCCACCACTCCAACACGGGGTGCTGGACAAGGACGAG  
GTGTTTGTGCCGCCGACCGCGCAGTGGCGCACGAGGGCCTGGAGTGGGAGGAGTGGCTGCCCATCCG  
30 CATGGGCAAGGTGCTGGTCACCTGACCTGGGTGGCCGCTGTACCTCATGTTCAACGTCGCCTCGC  
GGCGTACCCGCGCTTCGCCAACCACTTTGACCCGTGGTTCGCCCATCTTCAGCAAGCGCGAGCGCATC  
GAGGTGGTCATCTCCGACCTGGCGCTGGTGGCGGTGCTCAGCGGGCTCAGCGTGTGGGCCGACCAT  
GGGCTGGGCCTGGCTGGTCAAGACCTACGTGGTGCCCTACCTGATCGTGAACATGTGGCTCGTGCTCA  
TCACGCTGCTCCAGCACACGCACCCGGCGCTGCCGCACTACTTCGAGAAGGACTGGGACTGGCTGCGC  
35 GCGCCATGGCCACCGTGGACCGCTCCATGGGCCGCCCTTCATGGACAACATCCTGCACCACATCTC  
CGACACCCACGTGCTGCACCACCTCTTCAGCACCATCCCGCACTACCACGCCGAGGAGGCCTCCGCCG  
CCATCAGGCCCATCTGGGCAAGTACTACCAGTCCGACAGCCGCTGGGTGCGCCGCGCCCTGTGGGAG  
GACTGGCGCGACTGCCGCTACGTGCTCCCGGACGCGCCCCGAGGACGACTCCGCGCTCTGGTTCCACAA  
40 GTGAGTGAGTGA

SEQ ID NO: 18

5' FADC región donante de ADN genómica

45 GGGCTGGTCTGAATCCTTCAGGCGGGTGTTACCCGAGAAAAGAAAGGGTGCCGATTTCAAAGCAGACCC  
ATGTGCCGGGCCCTGTGGCCTGTGTTGGCGCCTATGTAGTCACCCCCCTCACCCAATTGTCGCCAGT  
TTGCGCACTCCATAAACTCAAAACAGCAGCTTCTGAGCTGCGCTGTTCAAGAACACCTCTGGGGTTTG  
50 CTCACCCGCGAGGTGACGCCCCAGCATGGCTATCAAGACGAACAGGCAGCCTGTGGAGAAGCCTCCGT  
TCACGATCGGGACGCTGCGCAAGGCCATCCCCGCGCACTGTTTCGAGCGCTCGGCGCTTCGTAGCAGC  
ATGTACCTGGCCTTTGACATCGCGGTGATGTCCCTGCTCTACGTCGCGTGCAGCTACATCGACCCTGC  
ACCGGTGCCTACGTGGGTCAAGTACGGCATCATGTGGCCGCTCTACTGGTTCTTCCAGGTGTGTTTGA  
55 GGGTTTTGGTTGCCCGTATTGAGGTCTGTTGGCGCGCATGGAGGAGAAGGCGCCTGTCCCGCTGACC  
CCCCCGCTACCTCCCGGCACCTTCCAGGGCGCCTTCGGCACGGGTGTCTGGGTGTGCGCGCACGAG  
TGCGGCCACCAGGCCTTTTCTCCAGCCAGGCCATCAACGACGGCGTGGGCCTGGTGTTCACAGCCT  
GCTGCTGGTGCCCTACTACTCCTGGAAGCACTCGCACCG

60 SEQ ID NO: 19

3' FADC región donante de ADN genómica

65 CCGCCACCACTCCAACACGGGGTGCTGGACAAGGACGAGGTGTTTGTGCCGCCGACCGCGCAGTGG  
CGCACGAGGGCCTGGAGTGGGAGGAGTGGCTGCCCATCCGATGGGCAAGGTGCTGGTCAACCTGACC

5

CTGGGCTGGCCGCTGTACCTCATGTTCAACGTCGCCCTCGCGGCCGTACCCGCGCTTCGCCAACCCTT  
TGACCCGTGGTCGCCCATCTTCAGCAAGCGCGAGCGCATCGAGGTGGTCATCTCCGACCTGGCGCTGG  
TGGCGGTGCTCAGCGGGCTCAGCGTGCTGGGCCGACCATGGGCTGGGCCTGGCTGGTCAAGACCTAC  
GTGGTGCCCTACCTGATCGTGAACATGTGGCTCGTGCTCATCACGCTGCTCCAGCACACGCACCCGGC  
GCTGCCGCACTACTTCGAGAAGGACTGGGACTGGCTGCGCGGCCCATGGCCACCGTGGACCGCTCCA  
TGGGCCCCGCCCTTCATGGACAACATCCTGCACCACATCTCCGACACCCACGTGCTGCACCACCTCTTC  
AGCACCATCCCGCACTACCACGCCGAGGAGGCCTCCGCCGCCATCAGGCCCATCCTGGGCAAGTACTA  
CCAGTCCGACAGCCGCTGGGTGCGCCGCGCCCTGTGGGAGGACTGGCGCGACTGCCGCTACGTCGTCC  
CGGACGCGCCCGAGGACGACTCCGCGCTCTGGTTCCACAAGTGAGTGAGTGA

10

15

SEQ ID NO: 20

Secuencia de ADN 5' donante de *Prototheca moriformis* FATA1 knockout constructo de recombinación homóloga

20

GCTCTTCGGAGTCACTGTGCCACTGAGTTCGACTGGTAGCTGAATGGAGTCGCTGCTCCACTAAACGA  
ATTGTCAGCACCGCCAGCCGCGCCGAGGACCCGAGTCATAGCGAGGGTAGTAGCGCGCCATGGCACCGA  
CCAGCCTGCTTGCCAGTACTGGCGTCTCTTCCGCTTCTCTGTGGTCCTCTGCGCGCTCCAGCGCGTGC  
GCTTTTCCGGTGGATCATGCGGTCCGTGGCGCACCCGCGGTCGCTCCGTAACCCGCCCCAAGAGTTTGGG  
CCGAACAGTGGCGGTGAGGCGCCGACCCGCGGTAGCCGTCCGTCCGGAACCCGCCCCAAGAGTTTGGG  
AGCAGCTTGAGCCCTGCAAGATGGCGGAGGACAAGCGCATCTTCTGGAGGAGCACCGGTGCGTGGAG  
GTCCGGGGCTGACCGGCCGTCGCATTCAACGTAATCAATCGCATGATGATCAGAGGACACGAAGTCTT  
GGTGGCGGTGGCCAGAAACACTGTCCATTGCAAGGGCATAGGGATGCGTTCCTTCACCTCTCATTCTT  
CATTTCTGAATCCCTCCCTGCTCACTCTTCTCCTCCTCCTTCCCGTTACGCAGCATTCGGGGTACC

25

30

35

SEQ ID NO: 21

Secuencia de ADN 3' donante de *Prototheca moriformis* FATA1 knockout constructo de recombinación homóloga

40

45

GACAGGGTGGTTGGCTGGATGGGGAAACGCTGGTCGCGGGATTGATCCTGCTGCTTATATCCTCCCT  
GGAAGCACACCCACGACTCTGAAGAAGAAAACGTGCACACACACAACCCAACCGGCCGAATATTTGCT  
TCCTTATCCCGGGTCCAAGAGAGACTGCGATGCCCCCTCAATCAGCATCCTCCTCCCTGCCGCTTCA  
ATCTTCCCTGCTTGCTGCGCCCGCGGTGCGCCGTCTGCCCGCCAGTCAGTCACTCCTGCACAGGCC  
CCTTGTGCGCAGTGCTCCTGTACCCCTTTACCGCTCCTTCCATTCTGCGAGGCCCCCTATTGAATGTAT  
TCGTTGCCGTGTGTGGCCAAGCGGGCTGCTGGGCGCGCCGCGTCCGGGCAGTGCTCGGCGACTTTGGCG  
GAAGCCGATTGTTCTTCTGTAAGCCACGCGCTTGCTGCTTTGGGAAGAGAAGGGGGGGGGTACTGAAT  
GGATGAGGAGGAGAAGGAGGGGTATTGGTATTATCTGAGTTGGGTGAAGAGC

SEQ ID NO: 22 *Chlorella protothecoides* promotor de la actina/5'UTR

50

55

60

65

## ES 2 744 868 T3

5 agtttaggtccagcgtccgtggggggggacgggctgggagcttgggcccgggaagggcaagacgatgca  
gtccctctggggagtcacagccgactgtgtgtgttgactgtgcggcccgcagcactcacacgcaaaa  
tgcttgccgacaggcaggccctgtccagtgcacatccacgggccctctcatcaggetcaccttget  
cattgacataaacggaatgcgtaccgctctttcagatctgtccatccagagaggggagcaggctcccca  
ccgacgctgtcaaaacttgcttcctgcccaaccgaaaacattattgtttgaggggggggggggggggc  
10 agattgcatggcgggatatctcgtgaggaacatcactgggacactgtggaacacagtgagtgcagtat  
gcagagcatgtatgctaggggtcagcgcaggaagggggcctttcccagctctcccatgccactgcaccg  
tatccacgactcaccaggaccagcttcttgatcggcttcctcgtcccgtggacaccagtgtgtagcctc  
tggactccagggtatgcgtgcaccgcaaaggccagccgatcgtgccgattcctgggggtggaggatatga  
gtcagccaacttggggctcagagtgcacactggggcacgatacgaaacaacatctacaccgtgtcctc  
15 catgctgacacaccacagcttcgctccacctgaatgtgggcgcatgggcccgaatcacagccaatgtc  
gctgctgccataatgtgatccagaccctctcgcgccagatgccgagcggatcgtgggcgctgaataga  
ttcctgtttcgatcactgtttgggtcctttcctttcgtctcggatgcgcgtctcgaaacaggctgcg  
tcgggctttcggatcccttttgctccctccgtcaccatcctgcgcgcgggcaagttgcttgaccctgg  
20 gctgtaccaggggttgagggtattaccgcgtcaggccattcccagcccggattcaattcaaagtctgg  
  
gccaccacctccgcgcgtctgtctgatcactccacattcgtgcatacactacgttcaagtcctgatc  
caggcgtgtctcgggacaagggtgtgcttgagtttgatctcaaggaccactccagcacagctgctgg  
25 ttgaccccgcctcgcga

SEQ ID NO: 23

Casete de expresión AtTHIC que comprende *Chlorella protothecoides* promotor de la actina/5'UTR, *Arabidopsis thaliana* secuencia de codificación de la proteína THIC optimizada por codones para la expresión en *Prototheca moriformis*, y *Chlorella vulgaris* nitrato reductasa 3' UTR

5 agtttaggttcagcgtccgtgggggggacgggcttgggagcttgggcccgggaaggggcaagacgatgca  
gtccctctggggaggtcacagccgactgtgtgtgttgcactgtgcgggcccgagcactcacacgcaaaa  
tgcttggccgacagggcagggccctgtccagtgaacatccacgggtccctctcatcagggtcaccttgct  
cattgacataaacggaatgcgtagccgtctttcagatctgtccatccagagaggggagcagggtcccca  
ccgacgctgtcaaacttgcttccgtgcccaaccgaaaacattattgtttgagggggggggggggggggg  
10 agattgcatggcgggatctcgtgaggaacatcactgggacactgtggaacacagtgagtgcagtat  
gcagagcatgtatgctaggggtcagcgcaggaagggggcccttccagctctccatgccactgcaccg  
tatccacgactcaccaggaccagcttcttgatcgggttccgctcccggtggacaccagtggtgagcctc  
tggactccaggtatgcgtagcccgcaaaggccagccgatcgtgccgattcctgggggtggaggatatga  
gtcagccaacttgggggtcagagtgacactggggcacgatacgaacaacatctacaccgtgtcctc  
15 catgctgacacaccacagcttccgtccacctgaatgtgggcgcatggggccgaatcacagccaatgtc  
gctgctgccataatgtgatccagaccctctccgcccagatgccgagcggatcgtgggcgctgaataga  
ttcctgtttcgatcactgtttgggtcccttcccttttcgtctcggatgcgcgtctcgaaacagggtgcg  
tcgggctttcggatcccttttgctccctccgtcaccatcctgcgcgcggggcaagttgcttgaccctgg  
20 gctgtaccaggggttggaggggtattaccgcgtcaggccattcccagcccggattcaattcaaagtctgg  
gccaccaccctccgcgctctgtctgatcactccacattcgtgcatacactacgttcaagtcctgatc  
caggcgtgtctcgggacaagggtgtgcttgagtttgaatctcaaggacccactccagcacagctgctgg  
ttgaccccgccctcgcaatctagaATGgcgcgctccgtccactgcaccctgatgtccgtgggtctgcaa  
25 caacaagaaccactccgcccggcccaagctgcccaactcctccctgctgcccggttcgacgtggtgg  
tccaggccgcggccacccgcttcaagaaggagacgacgacaccccgccacgctgacgttcgacccc  
cccacgaccaactccgagcgcgccaagcagcgcgaagcacaccatcgacccctcctccccgacttcca  
gcccattccctccttcgaggagtgttccccaagtccacgaaggagcacaaggaggtggtgcacgagg  
agtccggccacgtcctgaagggtgcccttccgcgcgctgcacctgtccggcggcgagcccgccttcgac  
30 aactacgacacgtccggcccccagaacgtcaacgcccacatcggcctggcgaagctgcgaaggagtgc  
gatcgaccgcgcgagaagctgggcacgcccgcctacacgcagatgtactacgcgaagcagggcatca  
tcacggaggagatgctgtactgcgcgacgcgcgagaagctggaccccaggttcgtccgctccgaggtc  
cgcgggggcgcccatcatccctccaacaagaagcacctggagctggagcccagatgatcgtgggcgcg  
35 caagtccctggtgaagggtgaacgcgaacatcggcaactccgcgctggcctcctccatcgaggaggagg  
tctacaagggtgcagtggggcccattgtggggcgccgacaccatcatggacctgtccacggggccac  
atccacgagacgcgcgagtggtcctgcgcaactccgcggtccccgtgggcaccgtccccatctacca  
ggcgctggagaagggtggacggcatcgcgagaaactgaactgggaggtgttccgcgagacgctgatcg  
40 agcaggccgagcagggcggtgactacttcacgatccacgcgggcgtgctgctgcgctacatccccctg  
accgccaagcgctgacgggcatcgtgtccgcggcggtccatccacgcgaagtgggtgcctggccta  
ccacaaggagaacttcgcctacgagcactgggacgacatcctggacatctgcaaccagtagcagctcg  
ccctgtccatcggcgaaggcctgcgccccgggtccatctacgacgccaacgacacggcccagttcgcc  
45 gagctgctgacccagggcgagctgacgcgcgcgcgtgggagaaggacgtgcaggtgatgaacgaggg  
ccccggccacgtgcccatgcacaagatccccgagaacatgcagaagcagctggagtgggtgcaacgagg  
cgcccttctacaccctgggccccctgacgacccgacatcgcgcccggctacgaccacatcacctccgcc  
atcggcgcggccaacatcggcgccttgggcaccgcctgctgtgctacgtgacgcccaggagcacct  
gggcctgcccaaccgcgacgacgtgaaggcgggcgtcatcgctacaagatcgccgcccacgcggccg  
50 acctggccaagcagcacccccacgcccaggcgtgggacgacgcgctgtccaaggcgcgcttcgagttc  
cgctggatggaccagttcgcgctgtccctggaccccatgacggcgatgtccttcacgacgagacgct  
gcccgcggacggcggaagggtcgccacttctgctccatgtgcggcccccaagttctgctccatgaaga  
tcacggaggacatccgcaagtacgcccaggagaacggctacggctccgcccaggaggccatccgcccag  
ggcatggacgccatgtccgaggagtcaacatcgccaagaagacgatctccggcgagcagcacggcga  
55 ggtcgggcgagatctacctgcccgagtctacgtcaaggccgcgcagaagTGAcattggcagcag  
cagctcgatagtatcgacacactctggacgctggctcgtgtgatggactgttgccgccacacttgctg  
ccttgacctgtgaatatccctgccgcttttatcaaacagcctcagtggtgtttgatcttgtgtgtagcg  
60 gcttttgcgagttgctagctgcttgtgctatttgcgaataaccacccccagcatcccttccctcgttt  
catatcgcttgcatcccaaccgcaacttatctacgctgtcctgctatccctcagcgctgctcctgctc  
ctgctcactgcccctcgacagccttggtttgggctccgctgtattctcctggtagtgaacctgta  
aaccagcactgcaatgctgatgcacgggaagtagtgggatgggaacacaaatggaggatcc

SEQ ID NO: 24

5

10

15

20

25

30

[illegible]

SEQ ID NO: 25

35

40

45

MATASTSAFNARCGDLRRSAGSGPRRPARPLPVRGRAAAAADANPARPERRVITGQGVVTSLGQTI  
 EQFYSSLLEGVSGISQIQKFDTTGYTTTTIAGEIKSLQLDPYVPKRWAKRVDDVIKYVYIAGKQALESA  
 GLPIEAAAGLAGAGLDPALCGVLIGTAMAGMTSFAAGVEALTRGGVRKMNPFCIPFSISNMGGAMLAMD  
 IGFMGPNYSISTACATGNYCILGAADHIRRGDANVMLAGGADAAIIPSGIGGFIACKALSKRNDEPER  
 ASRPWDADRDGFVMGEGAGVLVLEELEHAKRRGATILAEVLGGAATSDAHMTEPDQPQGRGVRCLCLER  
 ALERARLAPERVGYVNAHGTSTPAGDVAEYRAIRAVIPQDSLRLNSTKSMIGHLLGGAGAVEAVAAIQ  
 ALRTGWLHPNLNLENPAPGVDPVVLVGPRKERAEDLDVVLNSNFGFGGHNSCVIFRKYDEMDYKDHDG  
 DYKDHDIDYKDDDDK

SEQ ID NO 26:

Secuencia codificante de la proteína FAD2 optimizada por codones *Protetheca moriformis* (UTEX 1435)

50

55

60

65

ATGgcatcaagaccaaccgccagcccggtggagaagcccccttcaccatcggcaccctgcgcaaggc  
catccccgccactgcttcgagcgctccgccctgcgctcctccatgtacctggccttcgacatcgccg  
tgatgtccctgctgtacgtggctccacctacatcgaccccgccccgtgccacctgggtgaagtac  
ggcgtgatgtggccctgtactggttcttcaggggcgcttcggcaccggcgtgtgggtgtgcgccca  
cgagtgcggccaccaggccttctcctcctccaggccatcaacgacggcgtgggcctggtgttccact  
ccctgctgctgggtgccctactactcctggaagcactccaccgcgcgccaccactccaacaccggctgc  
ctggacaaggacgaagtgcttcgtgccccccaccgcgcgcctggcccacgagggcctggagtggaagga



## ES 2 744 868 T3

gtggctgcccacccgatgggcaaggtgctggtgaccctgaccctgggctggccctgtacctgatgt  
tcaacgtggcctcccgccctacccccgcttcgccaaccacttcgacccctggcccccatcttctcc  
aagcgcgagcgcacatcgaggtggtgatctccgacctggcctggtggcctgctgtccggcctgtccgt  
5 gctgggcccgcacatgggctgggctggctggtgaagacctacgtggtgccctacctgatcgtgaaca  
tgtggctggtgctgatcaccctgctgcagcacaccccgccctgccccactacttcgagaaggac  
tgggactggctgcgcggcgccatggccaccgtggaccgctccatgggcccccccttcatggacaacat  
cctgcaccacatctccgacacccacgtgctgcaccacctgttctccaccatccccactaccacgccc  
10 aggaggcctccgcccgcacatccgccccatcctgggcaagtactaccagtccgactcccgctgggtggc  
cgcgccctgtgggaggactggcgcgactgccgctacgtggtgcccgcgcccccgaggacgactccgc  
cctgtggttccacaagTAG

SEQ ID NO: 27

Secuencia de aminoácidos FAD2 de *Prototheca moriformis*

MAIKTNRQPEKPPFTIGTLRKAIPAHCFERSALRSSMYLAFDIAVMSLLYVASTYIDPAPVPTWVKY  
20 GVMWPLYWFFQGAFTGVVCAHECGHQAFSSSQAINDGVLVHSLLLVPYYSWKHSHRRHHSNTGC  
LDKDEVFVPPHRAVAHEGLEWEEWLPIRMGKVLVTLTLGWPLYLMFNVASRPYPRFANHFDPWSPIFS  
KRERIEVVISDLALVAVLSGLSVLGRMTGWAWLVKTYVVPYLVNMMWLVLITLLQHTHPALPHYFEKD  
WDWLRGAMATVDRSMGPPFMDNILHHISDTHVLHHLFSTIPHYHAEASAAIRPILGKYYQSDSRWVG  
25 RALWEDWRDCRYVVPDAPEDDSALWFK

SEQ ID NO 28:

Región de codificación optimizada por codón de *Brassica napus* tioesterasa que prefiere C18: 0 de pSZ1358

ACTAGTATGCTGAAGCTGTCCTGCAACGTGACCAACAACCTGCACACCTTCTCCTTCTTCTCCGACTC  
CTCCCTGTTTCATCCCCGTGAACCGCCGCACCATCGCCGTGTCCTCCGGGCGCGCCTCCCAGCTGCGCA  
AGCCCCGCCCTGGACCCCCCTGCGCGCCGTGATCTCCGCCGACCAGGGCTCCATCTCCCCCGTGAACCTC  
30 TGCACCCCCGCCGACCGCCTGCGCGCCGCGCCGTGATGGAGGACGGCTACTCCTACAAGGAGAAGTT  
CATCGTGCGCTCCTACGAGGTGGGCATCAACAAGACCGCCACCGTGGAGACCATCGCCAACCTGCTGC  
35 AGGAGGTGGCCTGCAACCACGTGCAGAAGTGCGGCTTCTCCACCGACGGCTTCGCCACCACCCTGACC  
ATGCGCAAGCTGCACCTGATCTGGGTGACCGCCCGCATGCACATCGAGATCTACAAGTACCCCGCCTG  
GTCCGACGTGGTGGAGATCGAGACCTGGTGCCAGTCCGAGGGCCGCATCGGCACCCGCCGCGACTGGA  
40 TCCTGCGCGACTCCGCCACCAACGAGGTGATCGGCCGCGCCACCTCCAAGTGGGTGATGATGAACCAG  
GACACCCGCCGCTGCAGCGCTGACCGACGAGGTGCGCGACGAGTACCTGGTGTTCTGCCCCCGCGA  
GCCCCGCTGGCCTTCCCCGAGGAGAACTCCTCCCTGAAGAAGATCCCCAAGCTGGAGGACCCCG  
CCAGTACTCCATGCTGGAGCTGAAGCCCCGCCGCGCCGACCTGGACATGAACCAGCACGTGAACAAC  
45 GTGACCTACATCGGCTGGGTGCTGGAGTCCATCCCCAGGAGATCATCGACACCCACGAGCTGCAGGT  
GATCACCTGGACTACCGCCGCGAGTGCCAGCAGGACGACATCGTGGACTCCCTGACCACCTCCGAGA  
TCCCCGACGACCCCATCTCCAAGTTACCGGCACCAACGGCTCCGCCATGTCTCCATCCAGGGCCAC  
AACGAGTCCAGTTCTTGCACATGCTGCGCCTGTCCGAGAACGGCCAGGAGATCAACCGCGGCCGCAC  
50 CCAGTGGCGCAAGAAGTCTCCCGCATGGACTACAAGGACCACGACGGCGACTACAAGGACCACGACA  
TCGACTACAAGGACGACGACGACAAGTGAATCGAT

SEQ ID NO: 29

Secuencia de aminoácidos de *Brassica napus*: tioesterasa que prefiere C18: 0 (Nº de Acceso CAA52070.1)

MLKLSCNVTNNLHTFSFFSDSSLFIPVNRRTIAVSSSQLRKPALDPLRAVISADQGSISPVNSCTPAD  
RLRAGRLMEDGYSYKEKFIVRSYEVGINKTATVETIANLLQEVACNHVQKCGFSTDGFATTLTMRKLH  
LIWVTARMHIEIYKPAWSDVVEIETWCQSEGRIGTRRDWILRDSATNEVIGRATSKWMMNQDTRRL  
QRVTDEVREYLVFCPREPRLAFPEENNSSLKIPKLEDPAQYSMLELKPRRADLDMNQHVNNVTYIG  
60 WVLESIPQEIIDTHELQVITLDYRRECQDDIVDSLTTSEIPDDPISKFTGTNGSAMSSIQGHNESQF  
LHMLRLSENGQEINRGRTQWRKKSSR

SEQ ID NO: 30

5' región donante de homología FATA1 alelo 1 *Prototheca moriformis*

GGAGTCACTGTGCCACTGAGTTCGACTGGTAGCTGAATGGAGTCGCTGCTCCACTAAACGAATTGTCA  
GCACCGCCAGCCGGCCGAGGACCCGAGTCATAGCGAGGGTAGTAGCGCGCCATGGCACCGACCAGCCT  
GCTTGCCAGTACTGGCGTCTCTTCCGCTTCTCTGTGGTCCCTCTGCGCGCTCCAGCGCGTGCGCTTTTC  
5 CGGTGGATCATGCGGTCCGTGGCGCACCCGAGCGGCCGCTGCCCATGCAGCGCCGCTGCTTCCGAACA  
GTGGCGGTGAGGGCCGACCCGCGGTAGCCGTCCGTCCGGAACCCGCCCAAGAGTTTTGGGAGCAGCT  
TGAGCCCTGCAAGATGGCGGAGGACAAGCGCATCTTCTGGAGGAGCACCGGTGCGTGGAGGTCCGGG  
GCTGACCGGCCGTCGCATTCAACGTAATCAATCGCATGATGATCAGAGGACACGAAGTCTTGGTGGCG  
10 GTGGCCAGAAACACTGTCCATTGCAAGGGCATAGGGATGCGTTCCTTCACCTCTCATTTCTCATTTCT  
GAATCCCTCCCTGCTCACTCTTTCTCCTCCTTCCCCTTACGCAGCATTTCGG

SEQ ID NO: 31

3' región donante de homología FATA1 alelo 1 *Prototheca moriformis*

GACAGGGTGGTTGGCTGGATGGGGAACGCTGGTTCGCGGGATTTCGATCCTGCTGCTTATATCCTCCCT  
GGAAGCACACCCACGACTCTGAAGAAGAAAACGTGCACACACACAACCCAACCGGCCGAATATTTGCT  
20 TCCTTATCCCGGGTCCAAGAGAGACTGCGATGCCCCCTCAATCAGCATCCTCCTCCCTGCCGCTTCA  
ATCTTCCCTGCTTGCCGTGCGCCCGCGGTGCGCCGTCTGCCCGCCCAGTCAGTCACTCCTGCACAGGCC  
CCTTGTGCGCAGTGCTCCTGTACCCCTTTACCGCTCCTTCCATTCTGCGAGGCCCCCTATTGAATGTAT  
TCGTTGCCTGTGTGGCCAAGCGGGCTGCTGGGCGCGCCGCGTTCGGGCAGTGCTCGGCGACTTTGGCG  
GAAGCCGATTGTTCTTCTGTAAGCCACGCGCTTGCTGCTTTGGGAAGAGAAGGGGGGGGGTACTGAAT  
25 GGATGAGGAGGAGAAGGAGGGGTATTGGTATTATCTGAGTTGGGT

SEQ ID NO: 32

5' región donante de homología FATA1 alelo 2 *Prototheca moriformis*

AATGGAGTCGCTGCTCCACTAATCGAATTGTGAGCACCGCCAGCCGGCCGAGGACCCGAGTCATAGCG  
AGGGTAGTAGCGCGCCATGGCACCGACCAGCCTGCTTGCCCGTACTGGCGTCTCTTCCGCTTCTCTGT  
GCTCCTCTACGCGCTCCGGCGCGTGCGCTTTTCCGGTGGATCATGCGGTCCGTGGCGCACCCGAGCGG  
35 CCGCTGCCCATGCAGCGCCGCTGCTTCCGAACAGTGGCTGTGAGGGCCGACCCGAGTAGCCGTCCG  
TCCGGAACCCGCCAAGAGTTTTGGGAGCAGCTTGAGCCCTGCAAGATGGCGGAGGACAAGCGCATCT  
TCCTGGAGGAGCACCGGTGCGCGGAGGTCCGGGGCTGACCGGCCGTGCGATTCAACGTAATCAATCGC  
ATGATGATCACAGGACGCGACGTCTTGGTGGCGGTGGCCAGGGACACTGCCCATTGCACAGGCATAGG  
AATGCGTTCCCTTCTCATTTCTCAGTTTTCTGAGCCCCCTCCCTCTTCACTCTTTCTCCTCCTCCCC  
40 TCTCACGCAGCATTCGTGG

SEQ ID NO: 33

3' región donante de homología FATA1 alelo 2 *Prototheca moriformis*

CACTAGTATCGATTTTGAACAGAGGAGAGGGTGGCTGGTAGTTGCGGGATGGCTGGTTCGCCCCGTCGAT  
CCTGTGCTGCTATTGTCTCCTCCTGCACAAGCCACCCACGACTCCGAAGAAGAAGAAAACGCG  
CACACACACAACCCAACCGGCCGAATATTTGCTTCTTATCCCGGGTCCAAGAGAGACGGCGATGCCC  
50 CCCTCAATCAGCCTCCTCCTCCCTGCCGCTCCAATCTTCCCTGCTTGATGCGCCCGCGAGAGGCTGT  
CTGCGCGCCCCGTCAGTCACTCCCCGTGCAGACGCCCTCGTGCTCGGTGCTCCTGTATCCTTTACCGCT  
CCTTTTCAATTCTGCGAGGCCCCCTGTTGAATGTATTTCGTTGCCTGTGTGGCCAAGCGCGTGTGGGCG  
CGCCGCCGTGCGGCGGTGCTCGGCGACTCTGGCGGAAGCCGGTTGTTCTTCTGTAAGCCACGCGCTTG  
CTGCTTTTGGAAAAGAGGGGGGTTTACTGAATGGAGGAGGAGCAGGATAATTGGTAGTATCTGAGTTG  
55 TTG

SEQ ID NO: 34

Horquilla C de SAD2

## ES 2 744 868 T3

actagtGCGCTGGACGCGGCAGTGGGTGGCCGAGGAGAACCGGCACGGCGACCTGCTGAACAAGTACT  
GTTGGCTGACGGGGCGCGTCAACATGCGGGCCGTGGAGGTGACCATCAACAACCTGATCAAGAGCGGC  
ATGAACCCGCGAGACGGACAACAACCCCTTACTTGGGCTTCGTCTACACCTCCTTCCAGGAGCGCGCGAC  
5 CAAGTACAGCCACGGCAACACCGCGCGCCTTGC GGCCGAGCAGTGTGTTTGAGGGTTTTGGTTGCCCG  
TATCGAGGTCCTGGTGGCGCGCATGGGGGAGAAGGCGCCTGTCCCCTGACCCCCCGGCTACCTCC  
CGGCACCTTCCAGGGCGCGTACGg gatccTGCTCGGCCGCAAGGCGCGCGGTGTTGCCGTGGCTGTAC  
TTGGTCGCGCGCTCCTGGAAGGAGGTGTAGACGAAGCCCAAGTAAGGGTTGTTGTCCGTCTGCGGGTT  
10 CATGCCGCTCTTGATCAGGTTGTTGATGGTCACCTCCACGGCCCGCATGTTGACGCGCCCCGTCAGCC  
AACAGTACTTGTTCAGCAGGTGCGCGTGCCGTTCTCCTCGGCCACCCACTGCCGCGTCCAGCGCaag  
ctt

SEQ ID NO: 35

MSIQFALRAAYIKGTCQRLSGRGAALGLSRDWTGWTLPWCWPASAAATAPPRARHQERAIHLTSGRR  
RHSALASDADERALPSNAPGLVMASQANYFRVRLLEPEEEGELESWSPNVRHTTLLCKPRAMLSKLQM  
RVMVGDRVIVTAIDPVNMTVHAPPFDPLPATRFLVAGEAADMDITVVLNKADLVPEEESAALAEVAS  
20 WGPVVLSTLTGRGLQELERQLGSTTAVLAGPSGAGKSSIINALARAARERPSDASVSNVPEEQVVG  
DGRALANPPFTLADIRNAIPKDCFRKSAKSLAYLGDLSITGMAVLAYKINSPWLWPLYWFAQGTMF  
WALFVVGHDCHGQSFSTSKRLNDALAWLGALAAGTWTWALGVLPMNLNLYLAPYVWLLVTYLHHHGPSD  
PREEMPWYRGREWSYMRGGLTTIDRDYGLFNKVHHDIGTHVVHH

SEQ ID NO: 36

MFWALFVVGHDCHGQSFSTSKRLNDVGLFVHSIIIGVPYHGWRISHRTHHNNHGHVENDESWYPPTES  
GLKAMTDMGRQGRFHFPSMLFVYFYLFWRSPGKTGSHFSPATDLFALWEAPLIRTSNACQLAWLGAL  
30 AAGTWALGVLPMNLNLYLAPYVISVAWLDLVTYLHHHGPSDPREEMPWYRGREWSYMRGGLTTIDRDY  
GFNKVHHDIGTHVVHHLFPQIPHYNLCRATKAACKVLGPYYREPERCPLGLLPVHLLAPLLRSLGQDH  
FVDDAGSVLFYRRAEGINPWIQKLLPWLGGARRGADAQRDAAQ

SEQ ID NO: 37

Camelina sativa omega-3 FAD7-2

MANLVLSECGIRPLPRIYTTTPRSNFVSNNNKPIFKFRPFTSYKTSSSPLACSRDGFGNWSLNVSVPL  
TTTTPIVDESPLKEEEEEKQRFDPGAPPPFNADIRAAIPKHCWVKNPWKSMSYVLRDVAIVFALAAG  
40 ASYLNWVWPLYWLAQGTMFWALFVLGHDCGHGSFSNNPRLNNVVGHLHSSILVPYHGWRISHRTH  
HQNHGHVENDESWHPMSEKIYQSLDKPTRFFRFTLPLVMLAYPFYLVARSFGKKGSHYHPESDLFLPK  
EKTDVLTSTACWTAMAALLICLNFVVGVPQMLKLYGIPYWINVMWLDVFTYLHHHGHEDKLPWYRGKE  
WSYLRGGLTTLD RDYGVINNIHHDIGTHVIHHLFPQIPH YHLVEATEAVKPVLGKYYREPDKSGPLPL  
45 HLLGILAKSIKEDHYVSDEGDV VYYKADPNMYGEIKVGAD

SEQ ID NO: 38

Prototheca moriformis delta 12 desaturasa alelo 2

MAIKTNRQPVKEPPFTIGTLRKAIPAHCFERSALRSSMYLAFDIAVMSLLYVASTYIDPAPVPTWVKY  
GIMWPLYWFFQGAFTGVWVCAHECGHQA FSSSQAIN DGVGLVFHSLLLVPYYSWKHSHRRHHSNTGC  
LDKDEVFVPPHRAVAHEGLEWEELPIRMGKVLVTLTLGWPLYLMFNVASRPYPRFANHFDWPSPIFS  
55 KRERIEVVISDLALVAVLSGLSVLGRTMGAWLVKTYVVPYMIWNMWLVLTLLQHTHPALPHYFEKD  
WDWLRGAMATVDRSMGPPFMD SILHHISDTHVLHHLFSTIPHYHAE EASAAIRPILGKYYQSDSRWVG  
RALWEDWRDCRYVVPDAPEDDSALWFHK

SEQ ID NO: 39

Camelina sativa omega-3 FAD7-1

MANLVLSECGIRPLPRIYTTTPRSNFVSNNNKPIFKFRPLTSYKTSSPLFC SRDGFGRNWSLNVSVPLA  
TTTTPIVDESPL EEEEEEEKQRFDPGAPPPFNADIRAAIPKHCWVKNPWKSMSYVLRDVAIVFALAAG

## ES 2 744 868 T3

AAYLNNWIVWPLYWLAQGTMFWALFVLGHDCGHGSFSNNPRLNNVVGHLLHSSILVPYHGWRI SHRTH  
HQN HGHVENDESWHPMSEKIYQSLDKPTRFFRFTLPLVMLAYPFYLVARS PGKKGSHYHPESDLFLPK  
EKT DVL TSTACWTAMAALLICLN FVVGPVQMLKLYGIPYWINVMWLD FVTY LHHHGHEDKLPWYRGKE  
WSYLRGGLTTLD RDYGVINNIHHDIGTHVIHHLFPQIPHYHLVEATEAVKPV LGKY YREPDKSGPLPL  
HLLGILAKSIKEDHYVSDEGDV VYYKADPNMYGEIKVGAD

SEQ ID NO: 40  
PmFATA-HPB

actagtCATTCGGGGCAACGAGGTGGGCCCCCTCGCAGCGGCTGACGATCACGGCGGTGGCCAACATCC  
TGCAGGAGGCGGCGGGCAACCACGCGGTGGCCATGTGGGGCCGGAGCGTGTGTTTGAGGGTTTTGGTT  
GCCCGTATTGAGGTCCTGGTGGCGCGCATGGGGGAGAAGGCGCCTGTCCCGCTGACCCCCCGGCTAC  
CCTCCCGGCACCTTCCAGGGCGCGTACGg gatccGCTCCGGCCCCACATGGCCACCGCGTGGTTGCC  
GCCGCTCCTGCAGGATGTTGGCCACCGCCGTGATCGTCAGCCGCTGCGAGGGGCCACCTCGTTGCC  
CCGAATGaagctt

SEQ ID NO: 41  
PmFATA-HPC

actagtGGAGGGTTTCGCGACGGACCCGGAGCTGCAGGAGGCGGGTCTCATCTTTGTGATGACGCGCA  
TGCAGATCCAGATGTACCGCTACCCGCGCTGGGGCGACCTGATGCAGGTGGAGACCTGGTTCCAGAGT  
GTGTTTGAGGGTTTTGGTTGCCCCGATTGAGGTCTGGTGGCGCGCATGGGGGAGAAGGCGCCTGTCC  
CGCTGACCCCCCGGCTACCCTCCCGGCACCTTCCAGGGCGCGTACGg gatccTCTGGAACCAGGTCT  
CCACCTGCATCAGGTGCCCCAGCGCGGGTAGCGGTACATCTGGATCTGCATGCGCGTCATCACAAAG  
ATGAGACCCGCTCCTGCAGCTCCGGGTCCGTCGCGAAACCTCCaagctt

SEQ ID NO: 42  
PmFATA-HPD

actagtCGGCGGGCAAGCTGGGCGCGCAGCGCGAGTGGGTGCTGCGCGACAAGCTGACCGGCGAGGCG  
CTGGGCGCGGCCACCTCGAGCTGGGTGATGATCAACATCCGCACGCGCCGGCCGTGCCGCATGCCGGG  
TGTGTTTGAGGGTTTTGGTTGCCCCGATCGAGGTCTGGTGGCGCGCATGGGGGAGAAGGCGCCTGTTC  
CCGCTGACCCCCCGGCTACCCTCCCGGCACCTTCCAGGGCGCGTACGg gatccCCGGCATGCGGCAC  
GGCCGGCGCGGTGCGGATGTTGATCATGACCCAGCTCGAGGTGGCCGCGCCCAGCGCCTCGCCGGTCAG  
CTTGTCGCGCAGCACCCACTCGCGCTGCGCGCCCAGCTTGCCCGCCGaagctt

SEQ ID NO: 43  
PmFATA-HPE

actagtGTCCGCGTCAAGTCGGCCTTCTTCGCGCGCGAGCCCGCGCCTGGCGCTGCCGCCCGCGGT  
CACGCGTGCCAAGCTGCCCAACATCGCGACGCCGGCGCCGCTGCGCGGGCACCGCCAGGTGCGCGGCC  
GCACCGACATGGACATGAACGGGCACGTGAACAACGTGGCCTACCTGGCCTGGTGCCTGGAGTGTGTT  
TGAGGGTTTTGGTTGCCCCGATTGAGGTCCTGGTGGCGCGCATGGGGGAGAAGGCGCCTGTCCCGCTG  
ACCCCCCGGCTACCCTCCCGGCACCTTCCAGGGCGCGTACGg gatccTCCAGGCACCAGGCCAGGTA  
GGCCACGTTGTTACGTGCCCGTTTCATGTCCATGTGCGGTGCGGCGCGGACCTGGCGGTGCCCGCGCA  
GCGGCGCCGGCGTTCGCGATGTTGGGCAGCTTGGCACGCGTGACCGCGGGCGGCAGCGCCAGGCGCGGC  
GGCTCGCGCGCGAAGAAGGCCGACTTGACGCGGACaagctt

SEQ ID NO: 44  
PmFATA-HPF

actagtCCGTGCCCCGAGCACGTCTTCAGCGACTACCACCTCTACCAGATGGAGATCGACTTCAAGGCC  
GAGTGCCACGCGGGCGACGTATCTCCTCCAGGCCGAGCAGATCCCGCCCCAGGAGGCGCTCACGCA  
CAACGGCGCCGGCCGCAACCCCTCCTGCTTCGTCCATAGCATTCTGCGCGCCGAGACCGAGCGTGTGT  
TTGAGGGTTTTGGTTGCCCGTATCGAGGTCTGGTGGCGCGCATGGGGGAGAAGGCGCCTGTCCCGCT

GACCCCCCGGCTACCCTCCCGGCACCTTCCAGGGCGCGTACGggatccGCTCGGTCTCGGCGCGCAG  
AATGCTATGGACGAAGCAGGAGGGGTTGCGGCCGGCGCCGTTGTGCGTGAGCGCCTCCTGGGGCGGGA  
TCTGCTCGGCCTGGGAGGAGATGACGTGCGCCGCGTGGCACTCGGCCTTGAAGTCGATCTCCATCTGG  
TAGAGGTGGTAGTCGCTGAAGACGTGCTCGGGCACGGaagctt

SEQ ID NO: 45 PmFATA-hpG

actagtTCGTCCGCGCGCGAACCACATGGTTCGGCCCCATCGACGCGCCCGCCGCCAAGCCGCCCAAG  
GCGAGCCACTGAGGACAGGGTGGTTGGCTGGATGGGGAAACGCTGGTTCGCGGGATTTCGATCCTGCTGC  
TTATATCCTCGTGTGTTTTGAGGGTTTTGGTTGCCCGTATTGAGGTCTTGGTGGCGCGCATGGGGGAGA  
AGGCGCCTGTCCCGCTGACCCCCCGGCTACCCTCCCGGCACCTTCCAGGGCGCGTACGggatccGAG  
GATATAAGCAGCAGGATCGAATCCCGCGACCAGCGTTTCCCCATCCAGCCAACCACCTGTCTCTAGT  
GGCTCGCCTTGGGCGGCTTGGCGGCGGGCGCGTCGATGGGGGCCGACCATGTGGTTTCGCGCGCGGACG  
Aaagctt

SEQ ID NO: 46

*Cuphea wrightii* KASAI optimizada por codones

ATGGCCGCCGCCGCCAGCATGGTGGCCAGCCCCCTTCTGCACCTGGCTGGTGGCCAGCTGCATGAGCAC  
CAGCTTCGACAACGACCCCCGCAGCCCCAGCGTGAAGCGCTTCCCCCGCCGCAAGCGCGTGCTGAGCC  
AGCGCGGCAGCACCTACGTATTCAGTGCCTGGTGGCCAGCTGCATCGACCCCTGCGACCAGTACCGC  
AGCAGCGCCAGCCTGAGCTTCCTGGGCGACAACGGCTTCGCCAGCCTGTTTCGGCAGCAAGCCCTTCAT  
GAGCAACCGCGGCCACCGCCGCCTGCGCCGCGCCAGCCACAGCGGCGAGGCCATGGCCGTGGCCCTGC  
AGCCCGCCCAGGAGGCCGGCACCAAGAAGAAGCCCGTGATCAAGCAGCGCCGCGTGGTGGTGACCGGC  
ATGGGCGTGGTGACCCCCCTGGGCCACGAGCCCGACGTGTTCTACAACAACCTGCTGGACGGCGTGAG  
CGGCATCAGCGAGATCGAGACCTTCGACTGCACCCAGTTCCCCACCCGCATCGCCGGCGAGATCAAGA  
GCTTCAGCACCGACGGCTGGGTGGCCCCCAAGCTGAGCAAGCGCATGGACAAGTTCATGCTGTACCTG  
CTGACCGCCGGCAAGAAGGCCCTGGCCGACGGCGGCATCACCGACGAGGTGATGAAGGAGCTGGACAA  
GCGCAAGTGCGGCGTGCTGATCGGCAGCGGCATGGGCGGCATGAAGGTGTTCAACGACGCCATCGAGG  
CCCTGCGCGTGAGCTACAAGAAGATGAACCCCTTCTGCGTGCCCTTCGCCACCACCAACATGGGCAGC  
GCCATGCTGGCCATGGACCTGGGCTGGATGGGCCCCAACTACAGCATCAGCACCGCCTGCGCCACCAG  
CAACTTCTGCATCCTGAACGCGCCAACCACATCATCCGCGGCGAGGCCGACATGATGCTGTGCGGCG  
GCAGCGACGCCGTGATCATCCCCATCGGCCTGGGCGGCTTCGTGGCCTGCCCGCCCTGAGCCAGCGC  
AACAGCGACCCCAACCAAGGCCAGCCGCCCTGGGACAGCAACCGCGACGGCTTCGTGATGGGCGAGGG  
CGCCGGCGTGCTGCTGCTGGAGGAGCTGGAGCACGCCAAGAAGCGCGGCCACCATCTACGCCGAGT  
TCCTGGGCGGCAGCTTCACCTGCGACGCCTACCACATGACCGAGCCCCACCCCGAGGGCGCCGGCGTG  
ATCCTGTGCATCGAGAAGGCCCTGGCCCAGGCCGGCGTGAGCAAGGAGGACGTGAACTACATCAACGC  
CCACGCCACCAGCACCGAGCGCGGCGACATCAAGGAGTACCAGGCCCTGGCCCCGTGCTTCGGCCAGA  
ACAGCGAGCTGCGCGTGAACAGCACCAAGAGCATGATCGGCCACCTGCTGGGCGCCGCCGGCGGCGTG  
GAGGCCGTGACCGTGGTGCAGGCCATCCGCACCGGCTGGATTACCCCAACCTGAACCTGGAGGACCC  
CGACAAGGCCGTGGACGCCAAGCTGCTGGTGGGCCCCAAGAAGGAGCGCCTGAACGTGAAGGTGGGCC  
TGAGCAACAGCTTCGGCTTCGGCGGCCACAACAGCAGCATCCTGTTGCCCCCTGCAACGTGTGA

SEQ ID NO: 47

*Cuphea wrightii* KASAI optimizada por codones con péptido de tránsito SAD P.moriformis

ATGGGCCGCGGTGTCTCCCTTCCCCGGCCCCAGGGTCGCGGTGCGCGCCCCAGTCGGCGAGTCAGGTTTT  
GGAGAGCTGTATTCCAGTGCCTGGTGGCCAGCTGCATCGACCCCTGCGACCAGTACCGCAGCAGCGCC  
AGCCTGAGCTTCTGGGCGACAACGGCTTCGCCAGCCTGTTTCGGCAGCAAGCCCTTCATGAGCAACCG  
5 CGGCCACCGCCGCTGCGCCGCGCCAGCCACAGCGGCGAGGCCATGGCCGTGGCCCTGCAGCCCGCCC  
AGGAGGCCGGCACCAGAAGAAGCCCGTGATCAAGCAGCGCCGCGTGGTGGTGACCGGCATGGGCGTG  
GTGACCCCTTGGGCCACGAGCCCGACGTGTTCTACAACAACCTGCTGGACGGCGTGAGCGGCATCAG  
CGAGATCGAGACCTTCGACTGCACCCAGTTCCCCACCCGCATCGCCGGCGAGATCAAGAGCTTCAGCA  
10 CCGACGGCTGGGTGGCCCCCAAGCTGAGCAAGCGCATGGACAAGTTTCATGCTGTACCTGCTGACCGCC  
GGCAAGAAGGCCCTGGCCGACGGCGGCATACCGACGAGGTGATGAAGGAGCTGGACAAGCGCAAGTG  
CGGCGTGCTGATCGGCAGCGGCATGGGCGGCATGAAGGTGTTCAACGACGCCATCGAGGCCCTGCGCG  
TGAGCTACAAGAAGATGAACCCCTTCTGCGTGCCCTTCGCCACCACCAACATGGGCAGCGCCATGCTG  
15 GCCATGGACCTGGGCTGGATGGGCCCCAACTACAGCATCAGCACCGCCCTGCGCCACCAGCAACTTCTG  
CATCCTGAACGCCGCCAACCACATCATCCGCGGCGAGGCCGACATGATGCTGTGCGGCGGCAGCGACG  
CCGTGATCATCCCCATCGGCCTGGGCGGCTTCGTGGCCTGCGCGCCCTGAGCCAGCGCAACAGCGAC  
CCCACCAAGGCCAGCCGCCCTGGGACAGCAACC GCGACGGCTTCGTGATGGGCGAGGGCGCCGCGT  
20 GCTGCTGCTGGAGGAGCTGGAGCAGCGCAAGAAGCGCGGCCACCATCTACGCCGAGTTCTTGGGCG  
GCAGCTTCACCTGCGACGCTACCACATGACGAGCCCCACCCCGAGGGCGCCGGCGTGATCCTGTGC  
ATCGAGAAGGCCCTGGCCAGGCCGCGGTGAGCAGGAGGACGTGAACCTACATCAACGCCACGCCAC  
CAGCACCAGCGCCGCGGACATCAAGGAGTACCAGGCCCTGGCCGCTGCTTCGGCCAGAACAGCGAGC  
25 TGGCGGTGAACAGCACCAAGAGCATGATCGGCCACCTGCTGGGCGCCGCGGCGGTGGAGGCCGTG  
ACCGTGCTGAGGCCATCCGCACCGGCTGGATTACCCCAACCTGAACCTGGAGGACCCCGACAAGGC  
CGTGAGCGCAAGCTGCTGGTGGGCCCCAAGAAGGAGCGCCTGAACGTGAAGGTGGGCGCTGAGCAACA  
GCTTCGGCTTCGGCGGCCACAACAGCAGCATCCTGTTTCGCCCCCTGCAACGTGTGA

SEQ ID NO: 48

*Cuphea pulcherrima* KASIV optimizada por codones

ATGCCCCGCGGCCAGCTCGCTGCTGGCGTCCCCCTGTGCACCTGGCTGCTGGCCGCGTGTCATGAGCAC  
CTCGTTCCACCCCTCCGACCCCTGCCCCCAGCATCTCGTCCCCCGCCGCCGCTGAGCCGCCGCC  
35 GCATCCTGTGCGAGTGCGCCCTTGCCTTCGCGAGCTCGGCCCTGCGCGGCTCCAGCTTCCACACC  
CTGGTGACCTCGTATCTGGCGTGCTTCGAGCCCTGCCACGACTATTATACCAGCGCCTCCCTGTTTCGG  
CTCGCGCCCCATCCGCACCACCCGCCGCCACCGCCGCTGAACCGCGCGAGCCCTTCGCGCGAGGCGA  
TGGCGGTGCGCCTGCAGCCCGAGCAGGAGGTGACCACCAAGAAGAAGCCCTCCATCAAGCAGCGCCGC  
40 GTCGTGGTCACCGGCATGGGCGTGGTCACCCCTTGGGCCACGACCCCGACGTGTTCTATAACAACCT  
GCTGGACGGCACCAGCGGCATCTCGGAGATCGAGACCTTCGACTGCGCGCAGTTCCCCACCCGCATCG  
CCGCGGAGATCAAGTCTTCAGCACCGACGGCTGGGTGCGGCCAAGCTGTCAAGCGCATGGACAAG  
TTCATCTGTATATGCTGACCGCCGGCAAGAAGGCGCTGACCGACGGCGGCATCACCAGGACGTGAT  
45 GAAGGAGCTGGACAAGCGCAAGTGGCGCTCCTGATCGGCTCCGCGATGGGCGGCATGAAGGTGTTCA  
ACGACGCGATCGAGGCCCTGCGCATCAGCTATAAGAAGATGAACCCCTTCTGCGTGCCCTTCGCGACC  
ACCAACATGGGCTCGGCCATGCTGGCGATGGACCTGGGCTGGATGGGCCCCAACTATTCCATCAGCAC  
CGCCTGCGCGACCTCGAACTTCTGCATCATGAACGCGGCCAACCACATCATCCGCGGCGAGGCGGACG  
TCATGCTGTGCGGCGGCTCCGACGCCGTGATCATCCCCATCGGCATGGGCGGCTTCGTGCGGTGCCGC  
50 GCCCTGAGCCAGCGCAACTCGGACCCCAACAAGGCGTCCCGCCCCCTGGGACAGCAACCGCGACGGCTT  
CGTGATGGGCGAGGGCGCGGCGCTCCTGCTGCTGGAGGAGCTGGAGCACGCGAAGAAGCGCGGCCA  
CCATCTATGCGGAGTTCTTGGGCGGCTCGTTACCTGCGACGCCTATCACATGACCGAGCCCCACCCC  
GACGGCGCCGGCGTGATCCTGTGCATCGAGAAGGCGCTGGCCCAGTCCGGCGTCAGCCGCGAGGACGT  
55 GAACTATATCAACGCGCACGCCACCTCGACCCCGCGGGCGACATCAAGGAGTATCAGGCCCTGATCC  
ACTGCTTCGGCCAGAACC GCGAGCTGAAGGTCAACTCCACCAAGAGCATGATCGGCCACCTGCTGGGC  
GCGGCGGGCGGCGTGAGGCGGTCTCGGTGGTCCAGGCCATCCGCACCGGCTGGATCCACCCCAACAT  
CAACCTGGAGAACCCCGACGAGGGCGTGACACCAAGCTGCTGGTGGGCCCCAAGAAGGAGCGCCTGA  
ACGTCAAGGTGGGCTGTCCAACAGCTTCGGCTTCGGCGGCCACAACCTCGTCCATCCTGTTTCGCGCCC  
60 TATATCTGA

SEQ ID NO: 49

*Cuphea hookeriana* KASIV optimizada por codones

## ES 2 744 868 T3

ATGGTGGCCGCCGCCGCTCCAGCGCCTTCTTCCCCGTGCCCGCCCCCGGCGCCTCCCCCAAGCCCGG  
CAAGTTTCGGCAACTGGCCCTCCAGCCTGAGCCCCCTCCTTCAAGCCCAAGTCCATCCCCAACGGCGGCT  
TCCAGGTGAAGGCCAACGACAGCGCCACCCCAAGGCCAACGGCTCCGCCGTGAGCCTGAAGAGCGGC  
5 AGCCTGAACACCCAGGAGGACACCTCCTCCAGCCCCCCCCCGCACCTTCCTGCACCAGCTGCCCGA  
CTGGAGCCGCTGCTGACCGCCATCACCACCGTGTTCGTGAAGTCCAAGCGCCCCGACATGCACGACC  
GCAAGTCCAAGCGCCCCGACATGCTGGTGGACAGCTTCGGCCTGGAGTCCACCGTGCAGGACGGCCTG

GTGTTCCGCCAGTCCTTCTCCATCCGCTCCTACGAGATCGGCACCGACCGCACCGCCAGCATCGAGAC  
10 CCTGATGAACCACCTGCAGGAGACCTCCCTGAACCACTGCAAGAGCACCGGCATCCTGCTGGACGGCT  
TCGGCCGCACCTTGGAGATGTGCAAGCGCGACCTGATCTGGGTGGTGATCAAGATGCAGATCAAGGTG  
AACCGCTACCCCGCTGGGGCGACACCGTGGAGATCAACACCCGCTTCAGCCGCTGGGCAAGATCGG  
CATGGGCCGCGACTGGCTGATCTCCGACTGCAACACCGGCGAGATCCTGGTGCAGGCCACCAGCGCCT  
15 ACGCCATGATGAACCAGAAGACCCGCGCCTGTCCAAGCTGCCCTACGAGGTGCACCAGGAGATCGTG  
CCCCTGTTCGTGGACAGCCCCGTGATCGAGGACTCCGACCTGAAGGTGCACAAGTTCAAGGTGAAGAC  
CGGCGACAGCATCCAGAAGGGCCTGACCCCCGGCTGGAACGACCTGGACGTGAACCAGCACGTGTCCA  
ACGTGAAGTACATCGGCTGGATCCTGGAGAGCATGCCACCGAGGTGCTGGAGACCCAGGAGCTGTGC  
20 TCCCTGGCCCTGGAGTACCGCCGCGAGTGGCGCCGCGACTCCGTGCTGGAGAGCGTGACCGCCATGGA  
CCCCAGCAAGGTGGGCGTGCGCTCCAGTACCAGCACCTGCTGCGCCTGGAGGACGGCACCGCCATCG  
TGAACGGCGCCACCGAGTGGCGCCCCAAGAAGCGCGGCCAACGGCGCCATCTCCACCGGCAAGACC  
AGCAACGGCAACTCCGTGTCCATGTGA

SEQ ID NO: 50

*Prothea moriformis* (UTEX 1435) 5' Secuencia donante KAS1 alelo 1

gctcttcctcaccgcgtgaattgctgtcccaaacgtaagcatcatcgtggctcggtcacgcgatcctg  
gatccgggggatcctagaccgctggtggagagcgtgccgtcggattggtggcaagtaagattgcgag  
gttggcgaagggagagaccaaaccggaggtggaagcgggcacaacatcgtattattgctatagta  
gagcagtggcagtcgcatttcgaggtccgcaacgatctcgcaagctcgctacgctcacagtaggaga  
35 aaggggaccactgccccctgccagaatggtcgcgaccctctccctcgccggccccgcctgcaacacgca  
gtgctatccggcaagcgggctgtcgccctcaaccgcccccatgttggcgtccgggctcgatcaggtg  
cgctgaggggggttttggtgtgcccgcgcctctggggcccggtgctggccgtgcggaagtggggccctggg  
cagtggtatcagcaggggtttgctgcaaatgcctataccggcgattgaatagcgatgaacgggatacgg  
40 ttgctcactccatgccatgcgaccccggtttctgtcgcgcagccgtggtcgccgggctgcgaagc  
gggaccccaccagcgcattgtgatcacgggaatgggcgtgggtacc

SEQ ID NO: 51

*Prothea moriformis* (UTEX 1435) 3' Secuencia donante KAS1 alelo 1

gagctccacctgcatccgcctggcgctcgaggacgcggcgctctcgcccgacgaggtcaactacgtca  
acgcgcacgccacctccaccctggtggcgacaaggccgaggtgcgcgcgggtcaagtgcgtctttggc  
gacatgaagggcatcaagatgaacgccaccaagtccatgatcgggcactgcctgggcgcgcggcg  
50 catggaggccgtcgccacgctcatggccatccgcacgggctgggtgcacccccaccatcaaccacgaca  
accccatcgccgaggtcgacggcctggacgtcgtcgccaacgccaaggcccagcacaaaatcaacgtc  
gccatctccaactccttcggcttcggcgggcacaactccgtcgtcgccctttgcgccttccgcgagta  
ggcggagcgcgcgcgttggtgagggagggagggggtgcgagccctttggctgcgcgcgatactct  
55 ccccgacgcagcagaactccacgcgcctgaatctacttgtcaacgcagcaaccgtgtgttttgcctgtg  
ccattcttatttttctccgactgtggccgtactctgtttggctgtgcaagcaccgaagagcc

SEQ ID NO: 52

*Prothea moriformis* (UTEX 1435) 5' Secuencia donante KAS1 alelo 2

gctcttcgcgcaagctcgctacgctcacagtaggagataggggaccactgccctgccagaatggctg  
cgaccctgtccctcgccggccccgcctgcaacacgcagtgcgatatccagcaagcgggttgctgccttc  
5 aaccgcccccatggtggcgctccgggctcgatcaggtgcgctgaggggggtttgggtgggccccgcgctc  
tgggcccgtgtcgccgctgcggaacgtggggccccgggtagtgatcagcaggggttgcatgcaaatgc  
ctataccggcgattgaatagcgatgaacgggatacggttgcgctcaactccatgcccatgcgaccccg  
10 ttctgtccgccagccgtggctcgcccgagctgcgaagcgggacccccaccagcgcatgtgatcaccgg  
aatgggctggcctccgtggttggcaacgatgtcgagaccttttacgacaagcttctggaaggaacga  
gcggcggtggacctgatttccaggtgcgtaggtccttgatgaatgcgtctaggttgcgaggtgactgg  
ccaggaagcagcaggttgggggttgggtgttctgatttctggtaatttgaggtttcattataagattc  
tgtacggtccttgtttcgggtacc

SEQ ID NO: 53 *Protheca moriformis* (UTEX 1435) 3' Secuencia donante KAS1 alelo 2

gagctccacctgcatccgcctggcgctcgaggacgcggcgctctcgcccgacgaggtcaactacgtca  
20 acgcgcacgccacctccacctgggtgggcgacaaggccgaggtgcgcgcggtcaagtcggtctttggc  
gacatgaaggcatcaagatgaacgccaccaagtccatgatcgggcaactgcctgggcgcgcggcg  
catggaggccgtcgccacgctcatggccatccgcaccggctgggtgcacccccaccatcaaccacgaca  
accccatcgccgaggtcgacggcctggacgtcgtcgccaacgccaaggccagcacaaaatcaacgtc  
25 gccatctccaactccttcggcttcggcgggcacaactccgtcgtcgcctttgcgcccttcgcgcgagta  
ggcgagcgagcgcgcttggctgaggaggaggcggggtgcgagcccttggctgcgcgcgatactct  
ccccgcacgagcagactccacgcgcctgaatctacttgtcaacgagcaaccgtgtgtttgtccgtgg  
ccattcttattatttctccgactgtggccgtactctgtttggctgtgcaagcaccgaagagcc

SEQ ID NO: 54  
*Prototheca moriformis* (UTEX 1435) KASI-horquilla B

actagtcaTGGTCGCCCCGGGCTGCGAAGCGGGACCCACCCAGCGCATTGTGATCACCGGAATGGGCG  
35 TGGCCTCCGTGTTTGGCAACGATGTGAGACCTTTTACAgtgtgtttgaggggttttgggtgccgcat  
tgaggctcctggtggcgcgcatggaggagaaggcgctgtcccgtgaccccccggtaccctcccg  
caccttccaggcgcgctacgggatccTGTAAGGTCTCGACATCGTTGCCAAACACGGAGGCCACGC  
40 CCATTCCGGTGATCACAATGCGCTGGGTGGGTCCCGCTTCGCAGCCCGGGCGACCAaagctt

SEQ ID NO: 55  
*Prototheca moriformis* (UTEX 1435) KASI-horquilla C

actagtcaTTGACATCTCCGAGTTCCCGACCAAGTTTGC GGCGCAGATCACCGGCTTCTCCGTGGAGG  
45 ACTGCGTGACAAAGAAGAACGCGCGGCGGTACGACGACGCGCTGTCGTACGCGATGGTGGCCTCCAAG  
AAGGCCCTGCGCCAGGCGGGACTGGAGAAGGACAAGTGCCCCGAGGGCTACGGAGgtgtgtttgaggg  
50 ttttgggtgcccgtattgaggtcctggtggcgcgcatggaggagaaggcgctgtcccgtgaccccc  
ccggtaccctcccgccaccttccaggggcgcgatcgggatccCTCCGTAGCCCTCGGGGCACTTGTCC  
TTCTCCAGTCCCGCCTGGCGCAGGGCCTTCTTGGAGGCCACCATCGCGTACGACAGCGCGTCGTCGTA  
CCGCCGCGCGTTCTTCTTGTCCACGCAGTCTCCACGGAGAAGCCGGTGATCTGCGCCGAAACTTGG  
55 TCGGGAACCTCGGAGATGTCAAaagctt

SEQ ID NO: 56  
*Prototheca moriformis* (UTEX 1435) KASI-horquilla D



## ES 2 744 868 T3

actagtcaTGGGCGTGAGCACCTGCATCCGCCTGGCGCTCGAGGACGCCGGCGTCTCGCCCGACGAGG  
TCAACTACGTCAACGCGCACGCCACCTCCACCCTGGTGGGCGACAAGGCCGAGGTGCGCGCGGTCAAG  
TCGGTCTTTGGCGACATGAAGGGCATCAAGATgtgtgtttgaggggttttggttgcccgtattgaggtc  
5 ctggtggcgcgcacatggaggagaaggcgccgtgtcccgtgaccccccggtaccctcccggcaccttc  
cagggcgcgtacgggatccATCTTGATGCCCTTCATGTGCGCAAAGACCGACTTGACCGCGCGCACCT  
CGGCCTTGTCGCCCACCAGGGTGGAGGTGGCGTGCGCGTTGACGTAGTTGACCTCGTCGGGCGAGACG  
CCGGCGTCCTCGAGCGCCAGGCGGATGCAGGTGCTCACGCCCAaagctt

SEQ ID NO: 57 *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) KASI-horquilla E

actagtcaCAACCATCAACCACGACAACCCCATCGCCGAGGTGACGGCCTGGACGTGTCGCGCAACG  
CCAAGGCCCAGCACAAAATCAACGTGCGCATCTCCAACCTCTCGgtgtgtttgaggggttttggttgcc  
ccgtattgaggtcctggtggcgcgcacatggaggagaaggcgccgtgtcccgtgaccccccggtaccct  
tcccggcaccttccagggcgcgtacgggatccCGAAGGAGTTGGAGATGGCGACGTTGATTTTGTGCT  
20 GGGCCTTGCGGTTGGCGACGACGTCCAGGCCGTCGACCTCGGCGATGGGGTTGTCGTGGTTGATGGTa  
agctt

SEQ ID NO: 58

*M. polymorpha* FAE3 optimizada por codones (GenBank Nº de acceso AAP74370)

**ATG**gactcccgcgcccagaaccgcgacggcgggcgaggacgtgaagcaggagctgctgtccgcggcgca  
cgacggcaaggtgccctgccccaccgtggccatcggcatccgccagcgccctgcccgaacttcctgcagt  
30 ccgtgaacatgaagtacgtgaagctgggctaccactacctgatcaccacgccatgttcctgctgacc  
ctgcccgccttcttctggtggcgccgagatcgccgcctggggccacgagcgcacatcaccgcgagct  
gtggaccacctgcacctgaacctggtgtccatcatggcctgctcctccgccctggtggccggcgcca  
ccctgtacttcatgtcccgcccccgccccgtgtacctggtggagttcgccctgctaccgccccgacgag  
35 cgccctgaaggtgtccaaggacttcttctgacatgtcccgcgcgaccggccctgttctcctcctcctc  
catggacttccagaccaagatcaccacgcgctccggcctgggcgacgagacctaccctgcccccgcca  
tccctggcctcccccccccaaccctgcatgcgcgaggcccgcgaggaggccgcatggtgatgttcggc  
gccctggacgagctgttcgagcagaccggcggtgaagcccaaggagatcggcgtgctggtggtgaactg  
40 ctccctgttcaacccccccccctccatgtccgccatgatcgtgaaccactaccacatgcgcgggaaca  
tcaagtccctgaacctggcgccgatgggctgctccgcggcctgatctccatcgacctggccgcgac  
ctgctgcaggtgcacggcaacacctacgccgtggtggtgtccaccgagaacatcaccctgaactggt  
cttcggcgacgaccgtccaagctgatgtccaactgcatcttcgcgatggcgggcgccgcccgtgctgc  
45 tgtccaacaagcgccgcgagcgccgcgcgccaagtacgagctgctgcacaccgtgcgcacccacaag  
ggcgccgacgacaagtgttccgctgctgtaccaggaggaggactccaccggctccctggcgctgtc  
cctgtcccgcgagctgatggcggtggcggaacgccctgaaggccaacatcaccacctgggcccc  
tggtgctgcccctgtccgagcagatcctgttcttcgcctccctggtggcccgcaagtccctgaacatg  
aagatgaagccctacatccccgacttcaagctggccttcgagcacttctgcatccacgcggcgccg  
50 cgccgtgctggacgagctggagaagaacctggacctgaccgagtgacacatggagccctcccgcacatga  
ccctgtaccgcttcggcaacacctcctcctcctcctgtggtacgagctggcctacaccgaggccag  
ggccgcgtgaagcgcgggcgaaccgctgtggcagatgccttcggctccggcttcaagtgaactccgc  
cgtgtggcgcgcgctgcgcacccgtgaagcccccggtgaacaacgcctggtccgacgtgatcgaccgct  
55 tccccgtgaagctgccccagttc**TGA**

SEQ ID NO: 59

*M. polymorpha* FAE3 (GenBank Nº de acceso AAP74370)

MDSRAQNDRDGGEDVKQELLSAGDDGKVPCTVAIGIRQRLPDFLQSVNMKYVKLGHYHLITHAMFLLT  
 LPAFFLVAAEIGRLGHERIYRELWTHLHLNLVSIACSSALVAGATLYFMSRPRPVYLVEFACYRPDE  
 RLKVS KDFFLDMSRRTGLFSSSSMDFQTKITQRSGLGDETYLPPAILASPPNPCMREAREEEAAMVMFG  
 5 ALDELFEQTGVKPKKEIGVLVNC SLFNPTSPMSAMIVNHYHMRGNIKSLNLGGMGCSAGLISIDLARD  
 LLQVHGNTYAVVVSTENITLNWYFGDDRSKLMSNCIFRMGGA AVL LSNKRRERRRAKYELLHTVRTHK  
 GADDKCFRCVYQEEDSTGSLGVSL SRELMAVAGNALKANITTLGPLVLPLSEQILFFASLVARKFLNM  
 10 KMKPYIPDFKLA FEHFCIHAGGRAVLDELEKNLDLTEWHMEPSRMTLYRFGNTSSSSSLWYELAYTEAQ  
 GRVKRGDRLWQIAFGSGFKCNSAVWRALRTVKPPVNNAWS DVIDRFPVKLPQF

SEQ ID NO: 60

*Trypanosoma brucei* ELO3 (GenBank N° de acceso AAX70673)

15 **ATG**ctgatgaacttcggcggctccta cga cgcctacatcaacaacttccagggcaccttcctggccga  
 gtggatgctggaccacccctccgtgccctacatcgccggcgtgatgtacctgatcctggtgctgtacg  
 tggccaa g tccatcatggcctcccagccccccctgaacctgcgcgcgcgccaacatcgtgtggaacctg  
 20 ttcttgacctgttctccatgtgcgggcgctactacacctggcctacctggtgaaggccttcatgaa  
 ccccgagatcgtgatggccgcctccggcatcaagctggacgccaacacctccccatcatcacccact  
 ccggcttctacaccaccacctgcgccttgccgactccttctacttcaacggcgacgtgggcttctgg  
 gtggccctgttcgccctgtccaagatccccgagatgatcgacaccgccttcctggtgttccagaagaa  
 gcccgatgatcttctgcactggtaccaccacctgacctgatgctgttctgctggttcgcctacgtgc  
 25 agaagatctcctccggcctgtggttcgcctccatgaactactccgtgcactccatcatgtacctgtac  
 tacttcgtgtgcgcctgcggccaccgcgcctggtgcgcccccttcgcccccatcatcaccttcgtgca  
 gatcttccagatggtggtgggcaccatcgtggtgtgctacacctacaccgtgaagcacgtgctgggcc  
 gctcctgcacctgaccttctccctgcacaccggcctggtgatgtacctgtcctacctgctgctg  
 30  
 ttctcccagctgttctaccgctcctacctgtcccccgcgacaaggcctccatccccacgtggccgc  
 cgagatcaagaagaaggag**TGA**

SEQ ID NO: 61 *Trypanosoma brucei* ELO3 (GenBank N° de acceso AAX70673)

40 MYPTHRDLILNNYS DIYRSPTCHYHTWHTLIHTPINELLFPNLPRECDFGYDIPYFRGQIDVFDGWSM  
 IHFTSSNWCIPITVCLCYIMMIAGLKKYMGPRDGGRAPIQAKNYIIAWNLF LSFFSFAGVYYTVPYHL  
 FDPENGLFAQGFYSTVCNNGAYYGNGNVGFFVWLF IYSKIFELVDTFLLIRKNPVIFLHWYHHLTVL  
 45 LYCWHAYSVRIGTGIWFATMNYSVHSVMYLYFAMTQYGPSTKKFAKKFSKFITTIQILQMVGIIIVTF  
 AAMLVYTFDVPCYTS LANSVLGLMMYASYFVLFVQLYVSHYVSPKHVKQE

SEQ ID NO: 62 optimizada por codones *Saccharomyces cerevisiae* ELO1 (GenBank n° de acceso P39540)

**ATG**gtgtccgactggaagaacttctgcctggagaaggcctcccgcttccgccccaccatcgaccgccc  
cttcttcaacatctacctgtgggactacttcaaccgcgcctgtgggtgggcccaccgcccgcgttcc  
agcccaaggacttcgagttcaccgtgggcaagcagcccctgtccgagccccgccccgtgctgctgttc  
5 atcgccatgtactacgtggtgatcttcggcgccgctccctggtgaagtctgcaagcccctgaagct  
gcgcttcatctcccaggtgcacaacctgatgctgacctccgtgtccttctgtgggtgatcctgatgg  
tggagcagatgctgcccacgtgtaccgccacggcctgtacttcgccgtgtgcaacgtggagtctgg  
10 acccagcccatggagaccctgtactacctgaactacatgaccaagttcgtggagttcgcccgaacccgt  
gctgatggtgctgaagcaccgcaagctgaccttctgcacacctaccaccacggcgccaccgcccgtg  
tgtgctacaaccagctggtgggtacaccgccgtgacctgggtgcccgtgacctgaacctggccgtg  
cacgtgctgatgtactggtactacttctgtccgcctccggcatccgctgtggtggaaggcctgggt  
gacccgcctgcagatcgtgcagttcatgctggacctgatcgtggtgtactacgtgctgtaccagaaga  
15 tctgtggccgctacttcaagaacgcctgacccccagtgcgaggactgcctgggtccatgaccgcc  
atcgccgcccggcgcccatcctgacctcctacctgttctgttcatctcttctacatcgaggtgta  
caaqcgcgcctccqccctccqcaaqaqaagatcaacaqaacaac**TGA**

SEQ ID NO: 63 *Saccharomyces cerevisiae* ELO1 (GenBank nº de acceso P39540)

MVSDWKNFCLEKASRFRPTIDRPFNNIYLWDYFNRAVGWATAGRFQPKDFEFTVGKQPLSEPRPVLLF  
IAMYVVFVGGRLVKSKPLKLRFI SQVHNLMLTSVSFLWLI LMVEQMLPIVYRHGLYFAVCNVESW  
25 TQPMETLYLNYMTKFVEFADTVLMVLKHKRLTFLHTYHHGATALLCYNQLVGYTAVTWVPVTLNLAV  
HVLMYWYFLSASGIRVWWKAWVTRLQIVQFMLDLIVVYVLYQKIVAAFYKNACTPQCEDCLGSMTA  
IAAGAAILTSYLFLFISFYIEVYKRGASGKKKINKNN

SEQ ID NO: 64

*Brassica napus* tioesterasa de acil-ACP optimizada por codones (GenBank Nº de acceso CAA52070) con 3X FLAG Tag

ATGctgaagctgtcctgcaacgtgaccaacaacctgcacaccttctccttcttctccgactcctccct  
gttcatccccgtgaaccgcccaccatcgccgtgtcctccggggcgccctcccagctgcgcaagcccg  
cctggacccccctgcgcgcctgatctccgccgaccagggctccatctccccgtgaactcctgcacc  
ccgcccagccgctgcgcgcggcgccgctgatggaggacggctactcctacaaggagaagttcatcgt  
35 gcgctcctacgaggtgggcatcaacaagaccgccaccgtggagaccatcgccaacctgctgcaggagg  
tggcctgcaaccacgtgcagaagtgcggcttctccaccgacggcttcgccaccacctgacctgcgc  
40 aagctgcacctgatctgggtgaccgcccgcacatcgagatctacaagtaccccgccctgggtccga  
cgtggtggagatcgagacctggtgccagtcgagggcgccatcggcacccgcccgcgactggatcctgc  
gcgactccgccaccaacgaggtgatcgccgcgcccacctccaagtgggtgatgatgaaccaggacacc  
45 cgccgctgcagcgctgaccgacgaggtgcgcgacgagtagctggtgttctgccccgcgagccccg  
cctggccttccccgaggagaacaactcctcctgaagaagatccccaaagctggaggaccccgcccagt

actccatgctggagctgaagccccgcgcgcccacctggacatgaaccagcacgtgaacaacgtgacc  
50 tacatcggtgggtgctggagtccatccccaggagatcatcgacaccacgagctgcaggtgatcac  
cctggactaccgcccgcgagtgccagcaggacgacatcgtggactcctgaccacctccgagatccccg  
acgaccccatctccaagttcaccggcaccaacggctccgccatgtcctccatccaggggccacaacgag  
tcccagttcctgcacatgctgcgcctgtccgagaacggccaggagatcaaccgcggccgcacccagtg  
55 gcgcaagaagtctcccgcATGGACTACAAGGACCACGACGGCGACTACAAGGACCACGACATCGACT  
ACAAGGACGACGACGACAAGTGA

SEQ ID NO: 65

*Brassica napus* tioesterasa de acil-ACP (Genbank Nº de acceso CAA52070) con 3X FLAG Tag

MLKLSCNVTNNLHTFSFFSDSSLFIPVNRRTIAVSS**GRA** SQLRKPALDPLRAVISADQGSISPVNSCT  
PADRLRAGRLMEDGYSYKEKFIVRSYEVGINKTATVETIANLLQEVACNHVQKCGFSTDGFATTLTMR  
KLHLIWVTARMHIEIYKYPAWSVDVVEIETWCQSEGRIGTRRDWILRDSATNEVIGRATSKWVMNQDT  
RRLQRTDDEVREYLVFCPREPRLAFPEENNSSLKKIPKLEDPAQYSMLELKPRRADLDMNQHVNNVT  
YIGWVLESIPQEIIDTHELQVITLDYRRECQQDDIVDSLTTSEIPDDPISKFTGTNGSAMSSIQGHNE  
SQFLHMLRLSENGQEINRGRTQWRKKSSR**MDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK**

SEQ ID NO: 66

*Brassica napus* tioesterasa de acil-ACP optimizada por codones (GenBank N° de acceso CAA52070), con péptido de tránsito al cloroplasto de desaturasa de estearoil-ACP UTEX 250 (SAD) y 3X FLAG Tag

ATGgccaccgcatccactttctcgggcgttcaatgcccgctgcgggcgacctgcgctcgctcgggcgggctc  
cgggcccccggcgcccagcgaggccccctccccgtgcgcgggcgcgccctcccagctgcgcaagcccgccc  
tggacccccctgcgcgccgtgatctccgcccagaccagggtccatctccccctggaactcctgcaccccc  
gcccagccgctgcgcgccggcgcgctgatggaggacggctactcctacaaggagaagttcatcggtgcg  
ctcctacgaggtgggcatcaacaagaccgcccacgtggagaccatcgccaacctgctgcaggaggtgg  
cctgcaaccacgtgcagaagtgcgggttctccaccgacggcttcgccaccaccctgaccatgcgcaag  
ctgcacctgatctgggtgaccgcccgcacatgcacatcgagatctacaagtacccccgctggtccgacgt  
gggtggagatcgagacctggtgccagtcgagggcgccatcggcacccgcccgcgactggatcctgcgcg  
actccgcccaccaacgaggtgatcgggccgcccacctccaagtgggtgatgatgaaccaggacacccgc  
cgctgacgcgctgaccgacgaggtgcgcgacgagtagctggtgttctgcccccgagagccccgcct  
ggccttccccgaggagaacaactcctccctgaagaagatccccaagctggaggacccccgcccagtagt  
ccatgctggagctgaagccccgcccgcgcccacctggacatgaaccagcacgtgaacaacgtgacctac  
atcggtcgggtgctggagtccatccccaggagatcatcgacaccacagagctgcaggtgatcacct  
ggactaccgcccgcgagtgccagcaggacgacatcgtagtccctgaccacctccgagatccccgacg  
accccatctccaagttcaccggcaccaacggctccgccatgtcctccatccaggggccacaacgagtcc  
cagttcctgcacatgctgcgctgtccgagaacggccaggagatcaaccgcccgcgacccagtggtg  
caagaagtccctccgcATGGACTACAAGGACCACGACGGCGACTACAAGGACCACGACATCGACTACA  
AGGACGACGACGACAAGTGA

SEQ ID NO: 67

*Brassica napus* tioesterasa de acil-ACP (GenBank N° de acceso CAA52070) con péptido de tránsito al cloroplasto de desaturasa de estearoil-ACP UTEX 250 (SAD) y 3X FLAG® Tag

MATASTFSAFNARCGDLRRSAGSGPRRPARPLPVR**GRA** SQLRKPALDPLRAVISADQGSISPVNSCTP  
ADRLRAGRLMEDGYSYKEKFIVRSYEVGINKTATVETIANLLQEVACNHVQKCGFSTDGFATTLTMRK  
LHLIWVTARMHIEIYKYPAWSVDVVEIETWCQSEGRIGTRRDWILRDSATNEVIGRATSKWVMNQDTR  
RLQRTDDEVREYLVFCPREPRLAFPEENNSSLKKIPKLEDPAQYSMLELKPRRADLDMNQHVNNVTY  
IGWVLESIPQEIIDTHELQVITLDYRRECQQDDIVDSLTTSEIPDDPISKFTGTNGSAMSSIQGHNES  
QFLHMLRLSENGQEINRGRTQWRKKSSR**MDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK**

SEQ ID NO: 68

*C. tinctorius* FATA optimizada por codones (GenBank N° de acceso AAA33019) con péptido de tránsito al cloroplasto de desaturasa de estearoil-ACP UTEX 250 y 3X FLAG® Tag

5 **ATG** gccaccgcatccactttctcggcgttcaatgcccgctgcggcgacctgcgtcgctcggcgggctc  
 cgggccccggcgcccagcgaggccccctccccgtgcgcg**ggcgcgccg**gccaccggcgagcagccctccg  
 gcgtggcctccctgcgcgagggccgacaaggagaagtccctgggcaaccgcctgcgcctgggctccctg  
 accgaggacggcctgtcctacaaggagaagttcgtgatccgctgctacgaggtgggcatcaacaagac  
 cgccaccatcgagaccatcgccaacctgctgcaggaggtgggcggcaaccacgcccaggcgctgggct  
 tctccaccgacggcttcgccaccaccaccaccatgcgcaagctgcacctgatctgggtgaccgcccgc  
 10 atgcacatcgagatctaccgctacccgcctgggtccgacgtgatcgagatcgagacctgggtgcaggg  
 cgagggcaaggtgggcacccgcccgcgactggatcctgaaggactacgccaacggcgaggtgatcggcc  
 gcgccacctccaagtgggtgatgatgaacgaggacacccgcccgcctgcagaaggtgtccgacgacgtg  
 cgcgaggagtacctgggtgttctgccccgcacctgcgcctggccttccccgaggagaacaacaactc  
 15 catgaagaagatcccccaagctggaggacccgcgagtagtactccgcctgggcctgggtccccgcgcgt  
 ccgacctggacatgaacaagcacgtgaacaacgtgacctacatcggtgggcctggagtccatcccc  
 cccgagatcatcgacacccacgagctgcaggccatcacctggactaccgcccgcgagtgccagcgca  
 cgacatcgtggactccctgacctccgcgagcccctgggcaacgcccgcggcgtgaagttcaaggaga  
 20 tcaacggctccgtgtcccccaagaaggacgagcaggacctgtcccgcttcatgcacctgctgcgctcc  
 gccggctccggcctggagatcaaccgctgccgcaccgagtgccgcaagaagcccgcgaagcgc**ATGGA**  
**CTACAAGGACCACGACGGCGACTACAAGGACCACGACATCGACTACAAGGACGACGACGACAAGTGA**

25 SEQ ID NO: 69  
*C. tinctorius* FATA (GenBank Nº de acceso AAA33019) con péptido de tránsito al cloroplasto de desaturasa de  
 estearoil-ACP UTEX 250

30 **MATASTFSAFNARCGDLRRSAGSGPRRPARPLPVR****GRA** ATGEQPSGVASLREADKEKSLGNRLRLGSL  
 TEDGLSYKEKFVIRCYEVGINKTATIIETIANLLQEVGGNHAQGVGFSTDGFATTTTMRKLHLIIVTAR  
 MHIEIYRYPAWSVDVIEIETWVQEGKVGTRRDWILKDYANGEVIGRATSKWMMNEDTRRLQKVSDDV  
 REEYLVFCPRTLRLAFPEENNNNSMKKIPKLEDPAEYSRLGLVPRRSDLDNMKHNVTYIGWALESI  
 35 PEIIDTHELQAITLDYRRECQRDDIVDSLTSREPLGNAAGVKFKEINGSVSPKKDEQDLSRFMHLIRS  
 AGSGLEINRCRTEWRKKPAKR**MDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK**

40 SEQ ID NO: 70  
*R. communis* FATA optimizada por codones (Genbank Nº de Acceso ABS30422) con una etiqueta de epitopo 3xFLAG

45 **ATG** ctgaaggtgccctgctgcaacgccaccgacccccatccagtccctgtcctcccagtgccgcttccct  
 gacccaacttcaacaaccgcccctacttcaccgcgcgcccctccatccccaccttcttctcctccaaga  
 actcctccgcctccctgcaggccgtgggtgtccgacatctcctccgtggagtccgcgcgctgcgactcc  
 ctggccaaccgcctgcgcctgggcaagctgaccgaggacggcttctcctacaaggagaagttcatcgt  
 ggggcgcgcccgcctcctacgaggtgggcatcaacaagaccgccaccgtggagaccatcgccaacctgc  
 tgcaggaggtgggctgcaaccacgcccagtcggtgggcttctccaccgacggcttcgccaccaccacc  
 50 tccatgcgcaagatgcacctgatctgggtgaccgcccgcgacatgcacatcgagatctacaagtaacccgc  
 ctggtccgacgtggtggaggtggagacctggtgccagtccgagggccgcacatcggcacccgcgcgact  
 ggatcctgaccgactacgccaccggccagatcatcgccgcgcccacctccaagtgggtgatgatgaac  
 caggacacccgcccgcctgcagaaggtgaccgacgacgtgcgcgaggagtagctgggtgttctgccccgc  
 cgagctgcgcctggccttccccgaggagaacaaccgctcctccaagaagatctccaagctggaggacc  
 55 ccgcccagtagtccaagctgggcctgggtccccgcgcgcccgcgacctggacatgaaccagcacgtgaac  
 aacgtgacctacatcggtgggtgctggagtccatccccaggagatcatcgacacccacgagctgca  
 gaccatcacctggactaccgcccgcgagtgccagcacgacgacatcgtggactccctgacctccgtgg  
 agccctccgagaacctggaggccgtgtccgagctgcgcggcaccaacggctccgccaccaccaccgccc  
 60 ggcgacgaggactgccgcaacttccctgcacctgctgcgcctgtccggcgacggcctggagatcaaccg

65 cggccgcaccgagtgccgcaagaagtccgcccgc**ATGGA**CTACAAGGACCACGACGGCGACTACAAGG  
 ACCACGACATCGACTACAAGGACGACGACGACAAG**TGA**

SEQ ID NO: 71

*R. communis* FATA (Genbank N° de Acceso ABS30422) con una etiqueta de epítipo 3xFLAG®

5            MLKVPCCNATDPIQSLSSQCRFLTHFNRRPYFTRRPSIPTFFSSKNSSASLQAVVSDISSVESAA  
CDSLANRLRLGKLTEDGFSYKEKFIV**GRA** RSYEVGINKTATVETIANLLQEVGCNHAQSVGFSTDGFATTT  
SMRKMHLIWVTARMHIEIYKYPAWSDVVEVETWCQSEGRIGTRRDWILTDYATGQII GRATSKWVMN  
QDTRRLQKVTDVREEYLVFCPRELRLAFPEENNRSSKKISKLEDPAQYSKLGVPRRADLDMNQHVN  
10           NVTYIGWVLESIPQEI IDTHELQTITLDYRRECQHDDIVDSLTSVEPSENLEAVSELRGTNGSATTTA  
GDEDCRNFLHLLRLSGDGLINRGRTEWRKKSSAR**MDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK**

SEQ ID NO: 72

*G. mangostana* FATA1 optimizada por codones (GenBank N° de acceso AAB51523) con etiqueta de epítipo FLAG® 3X

15           **ATG** ctgaagctgtcctcctcccgctccccctggcccgcatccccaccgccccgccccaaactccat  
20           ccccccccgcatcatcgtggtgtcctcctcctcctccaaggtgaacccctgaagaccgagggcgtgg  
tgtcctccggcctggccgaccgcctgcgccctgggctccctgaccgaggacggcctgtcctacaaggag  
aagttcatcgtgcgctgctacgaggtgggcatcaacaagaccgccaccgtggagaccatcgccaacct  
gctgcaggaggtgggctgcaaccacgcccagtcctgggctactccaccggcggttctccaccaccc  
25           ccaccatgcgcaagctgcgccctgatctgggtgaccgcccgcgcatgcacatcgagatctacaagtacccc  
gcctggtccgacgtggtggagatcgagtcctggggccagggcgagggcaagatcggcaccgcgcgga  
ctggatcctgcgcgactacgccaccggccaggtgatcggccgcgccacctccaagtggtgatgatga  
accaggacacccgcgcgctgcagaaggtggacgtggacgtgcgcgacgagtacctggtgactgcccc  
30           cgcgagctgcgccctggccttccccgaggagaacaactcctccctgaagaagatctccaagctggagga  
cccctcccagtaactccaagctgggcctggtgccccgcgcgcgacctggacatgaaccagcacgtga  
acaacgtgacctacatcggtgggtgctggagtcctgccccaggagatcatcgacaccacgagctg  
cagaccatcacccctggactaccgcccgcgagtgccagcacgacgacgtggtggactccctgacctcccc  
cgagccctccgaggacgccgagggcgtgttcaaccacaacggcaccaacggctccgccaacgtgtccg  
35           ccaacgaccacggctgccgcaacttctgacacgtgctgcgccctgtccggcaacggcctggagatcaac  
cgcgccgcgcaaccgagtggtgcgaagaagcccaccgcgATGGACTACAAGGACCACGACGGCGACTACAA  
GGACCACGACATCGACTACAAGGACGACGACGACAAG**TGA**

SEQ ID NO: 73

*G. mangostana* FATA1 (GenBank N° de acceso AAB51523) con etiqueta de epítipo FLAG® 3X eta

40           MLKLSSSRSPLARIPTRPRPNSIPPRIIVSSSSSKVNPLKTEAVVSSGLADRLRLGSLTEDGLSYKE  
45           KFIVRCYEVGINKTATVETIANLLQEVGCNHAQSVGYSTGGFSTPTMRKLRLIWVTARMHIEIYKYP  
AWSDVVEIESWGQGEKIGTRRDWILRDYATGQVIGRATSKWVMNQDTRRLQKVDVDVREYLVHCP  
RELRLAFPEENNSSLKKISKLEDPSQYSKLGVPRRADLDMNQHVNNVTYIGWVLESMPQEI IDTHEL  
QTITLDYRRECQHDDVVDLSLTSPEPSEDAEAVFNHNGTNGSANVSANDHGCNRLHLLRLSGNGLEIN  
50           RGRTEWRKKPTR**MDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK**

SEQ ID NO: 74

*Theobroma cacao* FATA1 optimizada por codones con etiqueta de epítipo FLAG® 3X

55

60

65

5 *ATG* ctgaagctgtcctcctgcaacgtgaccgaccagcgccaggccctggcccagtgccgcttcctggc  
ccccccgcgcccttctccttcgctggcgacccccgtggtggtgtcctgctccccctcctccgcgc  
ccaacctgtccccctgcagggtggtgctgtccggccagcagcaggccggcatggagctggtggagtcc  
ggctccgggtccctggccgaccgcctgcgccctgggctccctgaccgaggacggcctgtcctacaaggga

10 gaagttcatcgtgcgctgctacgaggtgggcatcaacaagaccgccaccgtggagaccatcgccaacc  
tgctgcaggaggtgggctgcaaccacgcccagtccgtgggctactccaccgacggcttcgccaccacc  
cgcaccatgcgcaagctgcacctgatctgggtgacgcgccgcgatgcacatcgagatctacaagtacc  
cgctgtggtccgacgtgatcgagatcgagacgtggtgccagtccgaggccgcgatcggcaccgccgcg

15 actggatcctgaaggacttcggcaccggcgaggtgatcggcgcgccacctccaagtgggtgatgatg  
aaccaggacaccgcgcctgcagaaggtgtccgacgacgtgcgcgaggagtaacctggtgttctgcc  
ccgcgagctgcgcctggccttccccgaggagaacaacaactccctgaagaagatcgccaagctggacg  
actccttcagtaactccgcctgggcctgatgccccgcgcgcgcacctggacatgaaccagcacgtg  
aacaacgtgacctacatcggctgggtgctggagtccatgcccaggagatcatcgacaccacgagct

20 gcgaccatcacctggactaccgccgcgagtgccagcaggacgacgtggtggactccctgacctccc  
ccgagcaggtggagggcaccgagaaggtgtccgccatccacggcaccaacggctccgcgcgcgcgc  
gaggacaagcaggactgccgccagttcctgcacctgctgcgcctgtcctccgacggccaggagatcaa  
ccgcggccgcgaccgagtggtgcgaagaagcccgcccgcatGGACTACAAGGACCACGACGGCGACTACA

25 AGGACCACGACATCGACTACAAGGACGACGACGACAAGTGA

SEQ ID NO: 75

*Theobroma cacao* FATA1 con etiqueta de epítipo FLAG® 3X

35 MLKLSSCNVTDQRQALAQCRFLAPPAPFSFRWRTPVWVSCSPSSRPNLSPLQVVLSGQQQAGMELVES  
GSGSLADRLRLGSLTEDGLSYKEKFIVRCYEVGINKTATVETIANLLQEVGCNHAQSVGYSTDGFATT  
RTMRKLHLHIWVTARMHIEIYKPAWSDVIEIETWCQSEGRIGTRRDWILKDFGTGEVIGRATSKWVMM  
NQDTRRLQKVSDDVREEYLVFCPRELRLAFPEENNNSLKKIAKLDDSFQYSRLGLMPRRADLDMNQHV  
NNVTYIGWVLESPQEIIDTHELQITITLDYRRECQQDDVVDLSLTSPEQVEGTEKVSIAIHGTNGSAAAR  
EDKQDCROF**LHLLRLSSDGOEINRGRTEWRKKPARMDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK**

SEQ ID NO: 76

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

45 TGGTTGAAGAATGAGCCGGCGACTTAAAAATAAATGGCAGGCTAAGAGAATTAATAAAGCTGAAACCTAAG  
CGAAAGCAAGTCTTAATAGGGCGCTAATTTAACAAAACATTAAATAAAATCTAAAGTCATTTATTTTA  
GACCCGAACCTGAGTGATCTAACCATGGTCAGGATGAAACTTGGGTGACACCAAGTGGAAGTCCGAAC  
CGACCGATGTTGAAAAATCGGCGGATGAACTGTGGTTAGTGGTGAAATACCAGTCGAACTCAGAGCTA  
50 GCTGGTTCTCCCCGAAATGCGTTGAGGCGCAGCAATATATCTCGTCTATCTAGGGGTAAAGCACTGTT  
TCGGTGCGGGCTATGAAAATGGTACCAAATCGTGGCAAACCTCTGAATACTAGAAAATGACGATATATTA  
GTGAGACTATGGGGGATAAGCTCCATAGTCGAGAGGGGAAACAGCCAGACCACAGTTAAGGCCCCCAA  
AATGATAATGAAGTGGTAAAGGAGGTGAAAATGCAAATACAACCAGGAGGTTGGCTTAGAAGCAGCCA  
TCCTTTAAAGAGTGC GTAATAGCTCACTG

SEQ ID NO: 77

Cu PSR23 LPAAT2-1

60 MAIAAAVIFLFLGLIFFASGLIINLFQALCFVLIRPLSKNAYRRINRVFAELLSELCLFDWWAGAK  
LKLFTDPETFRMLMGKEHALVIINHMTELDWMVGWVMQHFGLGSIISVAKKSTKFLPVLGWSMWFSE  
YLYLERSWAKDKSTLKSHIERLIDYPLPFWLVIFVEGTRFTRTKLLAAQQYAVSSGLPVPNRNVLIPRT  
KGFVSCVSHMRSFVPAVDVTVAFPKTSPPPTLLNLFEGQSIMLHVHIKRHAMKDLPESDDAVAEWCR  
65 DKFVEKDALLDKHNAEDTFSGQEVCHSGSRQLKSLLVVISWVVTTFGALKFLQWSSWKGAFAISAIGL  
GIVTLLMHVLLISSOAERSNPAEVAQAKLKTGLSISKKVTDKEN

SEQ ID NO: 78  
CuPSR23 LPAAT3-1

5

MAIAAAAVIVPLSLLFFVSGLIIVNLVQAVCFVLIRPLSKNTYRRINRVVAELLWLELVWLIDWWAGVK  
IKVFTDHEETFHLMGKEHALVICNHKSDIDWLVGWVLGQSGCLGSTLAVMKKSSKFLPVLGWSMWFSE  
YLFLEERSWAKDEITLKSGLNRLKDYPLPFWLALFVEGTRFTRAKLLAAQQYAASSGLPVPRNVLIPT  
10 KGFVSSVSHMRSFVPAIYDVTVAIPKTSPPPTLIRMFKGQSSVLHVHLKRHLMKDLPESDDAVAQWCR  
DIFVEKDALLDKHNAEDTFSGQELQETGRPIKSLLVVISWAVLEVFGAVKFLQWSSLLSSWKGLAFSG  
IGLGVITLLMHILILFSQSERSTPAKVAPAKPKNEGESSKTEMEKEK

15 SEQ ID NO: 79

Aecuencia de aminoácido para CuPSR23 LPPATx:

20

MEIPPHCLCSPSPAPSQLYYKKKKHAILQTQTPYRYRVSPTCFAPPRLRKQHPYPLPVLCYPKLLHFS  
QPRYPLVRSHLAEAGVAYRPGYELLGKIRGVCFYAVTAVALLLFQCMLLLHPFVLLFDPFPRKAHHT  
IAKLWSICSVSLFYKIHIGLENLPPPHSPAVVYVSNHQSFLDIYTLTLGRTFKFISKTEIFLYPIIG  
WAMYMLGTIPLKRLDSRSQDLTLKRCMDLIKKGASVFFFPPEGTRSKDGKLGAFKKGAFSIAAKSKVPV  
25 VPITLIGTGKIMPPGSELTVNPGTVQVIHKKPIEGSDAEAMCNEARATISHSLDD

25

SEQ ID NO: 80

Secuencia de ADNc para la región de codificación CuPSR23 LPAATx

30

ATGGAGATCCCGCCTCACTGTCTCTGTTTCGCCTTCGCCTGCGCCTTCGCAATTGTA  
TTACAAGAAGAAGAAGCATGCCATTCTCCAAACTCAAACCTCCCTATAGATATAG  
35 AGTTTCCCCGACATGCTTTGCCCCCCCCCGATTGAGGAAGCAGCATCCTTACCCT  
CTCCCTGTCCTCTGCTATCCAAAACCTCCTCCACTTCAGCCAGCCTAGGTACCCTCT  
GGTTAGATCTCATTGTTGGCTGAAGCTGGTGTGCTTATCGTCCAGGATACGAATTA  
TTAGGAAAAATAAGGGGAGTGTGTTTCTATGCTGTCACTGCTGCCGTTGCCTTGC  
40 TTCTATTTTCAGTGCATGCTCCTCCTCCATCCCTTTGTGCTCCTCTTCGATCCATTTTC  
CAAGAAAGGCTCACCATACCATCGCCAAACTCTGGTCTATCTGCTCTGTTTCTCTT  
TTTTACAAGATTCACATCAAGGGTTTGGAATACTTCCCCCACCCTCTCCTGC  
CGTCTATGTCTCTAATCATCAGAGTTTCTCGACATCTATACTCTCCTCACTCTCG  
45 GTAGAACCTTCAAGTTCATCAGCAAGACTGAGATCTTTCTCTATCCAATTATCGG  
TTGGGCCATGTATATGTTGGGTACCATTCCCTCTCAAGCGGTTGGACAGCAGAAGC  
CAATTGGACACTCTTAAGCGATGTATGGATCTCATCAAGAAGGGAGCATCCGTCT  
TTTTCTTCCCAGAGGGAACACGAAGTAAAGATGGGAAACTGGGTGCTTTCAAGA  
50 AAGGTGCATTTCAGCATCGCAGCAAAAAGCAAGGTTCCCTGTTGTGCCGATCACCT  
TATTGGAACCTGGCAAGATTATGCCACCTGGGAGCGAACTTACTGTCAATCCAGGA  
ACTGTGCAAGTAATCATACATAAACCTATCGAAGGAAGTGATGCAGAAGCAATG  
TGCAATGAAGCTAGAGCCACGATTTCTCACTCACTTGATGATTAA

55

SEQ ID NO: 81

Secuencia de ADNc para la región de codificación CuPSR23 LPAAT 2-1

60

65



ATGGCGATTGCAGCGGCAGCTGTCATCTTCCTCTTCGGCCTTATCTTCTTCGCCTC  
 CGGCCTCATAATCAATCTCTTCCAGGCGCTTTGCTTTGTCTTATTCGGCCTCTTT  
 CGAAAAACGCCTACMGGAGAATAAACAGAGTTTTTGCAGAATTGTTGTTGTTCGG  
 5 AGCTTTTATGCCTATTTCGATTGGTGGGCTGGTGCTAAGCTCAAATTATTTACCGAC  
 CCTGAAACCTTTTCGCCTTATGGGCAAGGAACATGCTCTTGTCTAATTAATCACA  
 TGACTGAACTTGACTGGATGGTTGGATGGGTTATGGGTCAGCATTTTGGTTGCCT  
 TGGGAGCATAATATCTGTTGCGAAGAAATCAACAAAATTTCTTCCGGTATTGGGG  
 10 TGGTCAATGTGGTTTTTCAGAGTACCTATATCTTGAGAGAAGCTGGGCCAAGGATA  
 AAAGTACATTAAAGTCACATATCGAGAGGCTGATAGACTACCCCTGCCCTTCTG  
 GTTGGTAATTTTTGTGGAAGGAACTCGGTTTACTCGGACAAAACCTCTTGGCAGCC  
 CAGCAGTATGCTGTCTCATCTGGGCTACCAAGTGCCGAGAAATGTTTTGATCCCAC  
 15 GTACTAAGGGTTTTGTTTCATGTGTAAGTCACATGCGATCATTTGTTCCAGCAGTA  
 TATGATGTCACAGTGGCATTCCTAAGACTTCACCTCCACCAACGTTGCTAAATC  
 TTTTCGAGGGTTCAGTCCATAATGCTTCACGTTACATCAAGCGACATGCAATGAA  
 AGATTTACCAGAATCCGATGATGCAGTAGCAGAGTGGTGTAGAGACAAATTTGT  
 20 GGAAAAGGATGCTTTGTTGGACAAGCATAATGCTGAGGACACTTTCAGTGGTCA  
 AGAAGTTTGTATAGCGGCAGCCGCCAGTTAAAGTCTCTTCTGGTGGTAATATCT  
  
 TGGGTGGTTGTAACAACATTTGGGGCTCTAAAGTTCCTTCAGTGGTCATCATGGA  
 25 AGGGGAAAGCATTTTCAGCTATCGGGCTGGGCATCGTCACTCTACTTATGCACGT  
 ATTGATTCTATCCTCACAAGCAGAGCGGTCTAACCCTGCGGAGGTGGCACAGGC  
 AAAGCTAAAGACCGGGTTGTGATCTCAAAGAAGGTAACGGACAAGGAAAAC  
 30 G

SEQ ID NO: 82

Secuencia de ADNc para la región de codificación CuPSR23 LPAAx 3-1

ATGGCGATTGCTGCGGCAGCTGTCATCGTCCCGCTCAGCCTCCTCTTCTTCGTCTC  
 CGGCCTCATCGTCAATCTCGTACAGGCAGTTTGTCTTGTACTGATTAGGCCTCTGT  
 CGAAAAACACTTACAGAAGAATAAACAGAGTGGTTGCAGAATTGTTGTGGTTGG  
 35 AGTTGGTATGGCTGATTGATTGGTGGGCTGGTGTCAAGATAAAAGTATTCACGGA  
 TCATGAAACCTTTCACCTTATGGGCAAAGAACATGCTCTTGTCTATTTGTAATCAC  
 40 AAGAGTGACATAGACTGGCTGGTTGGGTGGGTTCTGGGACAGCGGTTCAGGTTGC  
 CTTGGAAGCACATTAGCTGTTATGAAGAAATCATCAAAGTTTCTCCCGGTATTAG  
 GGTGGTCAATGTGGTTCTCAGAGTATCTATTCCCTTGAAAGAAGCTGGGCCAAGGA  
 45 TGAAATTACATTAAAGTCAGGTTTGAATAGGCTGAAAGACTATCCCTTACCCTTC  
 TGGTTGGCACTTTTTGTGGAAGGAACTCGGTTCACTCGAGCAAAACTCTTGGCAG  
 CCCAGCAGTATGCTGCCTCTTCGGGGCTACCTGTGCCGAGAAATGTTCTGATCCC  
 GCGTACTAAGGGTTTTGTTTCTTCTGTGAGTCACATGCGATCATTTGTTCCAGCCA  
 50 TATATGATGTTACAGTGGCAATCCCAAAGACGTCACCTCCACCAACATTGATAAG  
 AATGTTCAAGGGACAGTCCTCAGTGCTTCACGTCCACCTCAAGCGACACCTAATG  
 AAAGATTTACCTGAATCAGATGATGCTGTTGCTCAGTGGTGCAGAGATATATTTCG  
 TCGAGAAGGATGCTTTGTTGGATAAGCATAATGCTGAGGACACTTTCAGTGGCCA  
 55 AGAACTTCAAGAACTGGCCGCCCAATAAAGTCTCTTCTGGTTGTAATCTCTTGG  
 GCGGTGTTGGAGGTATTTGGAGCTGTGAAGTTTCTTCAATGGTCATCGCTGTTAT  
 CATCATGGAAGGGACTTGCATTTTCGGGAATAGGACTGGGTGTCATCACGCTACT  
 CATGCACATACTGATTTTATTCTCACAATCCGAGCGGTCTACCCCTGCAAAAGTG  
 60 GCACCAGCAAAGCCAAAGAATGAGGGAGAGTCCTCCAAGACGGAAATGGAAAA  
 GGAAAAGTAG

65

SEQ ID NO: 83

Secuencia de ADNc para CuPSR23 LPAATx región de codificación optimizada por codones para *Prototheca moriformis*

5

ATGgagatccccccactgctgtgctccccctccccgccccctccagctgtactacaagaagaagaagcacgccatc  
ctgcagaccagacccccctaccgtaccgcgtgtccccacctgcttcgcccccccgctgcgaagcagacccccctacc  
cctgccccgtgctgtgctacccaagctgctgcacttctccagccccgctacccccctggcgctcccacctggccgaggccg  
gctggtgctaccgccccggctacgagctgctgggaagatccgcccgtgtgcttctacgccgtgaccgcccgtggccct  
gctgctgttccagtgcatgctgctgctgcaccccttcgtgctgctgttcgaccccttccccgcaaggccccaccacaccatcgc  
caagctgtggtccatctgctccgtgtccctgttctacaagatccacatcaagggtcggagaacctgccccccccactccc  
ccgcccgtgtacgtgtccaaccaccagtccttctggacatctacacccctgtgacctggggccgaccttcaagttcatctcca  
agaccgagatcttctgtaccccatcatcggctgggcatgtacatgctgggcaccatccccctgaagcgctggactcccg  
ctccagctggacacccctgaagcgctgcatggacctgatcaagaaggcgccctccgtgttcttcttccccgagggcaccgc  
tccaaggacggcaagctggggcgcttcaagaaggcgcccttccatcgccgccaagtccaagggtcccgtgggtgccatc  
accctgatcggcaccggcaagatcatgccccggctccgagctgacctgaacccggcaccgtgcaggtgatcatccac  
aagcccatcgagggtccgacgccgaggccatgtgcaacgaggcccgccaccatctcccatccctggacgacTGA

SEQ ID NO: 84

Secuencia de ADNc para CuPSR23 LPAAT 2-1 región de codificación optimizada por codones para *Prototheca moriformis*

25

ATGgcgatcgcggccgcccgggtgatcttctgttcggcctgatcttcttcgcctccggcctgatcatcaacctgttcaggc  
gctgtgcttcgtcctgatccgccccctgtccaagaacgcctaccgcccgcataacccgctgttcgaggagctgctgtgccg  
agctgctgtgctgttcgactgggtggggcgccgaagctgaagctgttaccgacccccgagacgttccgctgatgggca  
aggagcacgcccgtgctcatcatcaaccacatgaccgagctggactggatgggtgggctgggtgatgggcccagcacttcggc  
tgctggggtccatcatctccgtcgccaagaagtccacgaagttctgcccgtgctgggctgggtccatgtggttctccgagta  
cctgtacctggagcgctcctgggccaaggacaagtccaccctgaagtcccacatcgagcgccctgatcgactacccccctgcc  
ttctgggtgggtcatcttcgtcgagggcacccgcttcacgcgcacgaagctgctggcgccagcagtagcggtctctccg  
gcctgcccgtccccgcaacgtcctgatccccgcacgaagggttcgtctcctgcgtgtcccacatgcgctccttcgtccccg  
cgggtgacgacgtcacggtggcggttccccaaagacgtccccccccccacgctgctgaacctgttcgagggccagtcacat  
gctgcacgtgcacatcaagcgccacgccatgaaggacctgcccagtcggacgacgcccgcggagtggtgccgcgac  
aagttcgtcgagaaggacgccctgctggacaagcacaacgcggaggacacgttctccggccaggagggtgtgccactccg  
gctcccgcagctgaagtcctgctgggtcgatctcctgggtcggtgacgacgttcggcgccctgaagttcctgcagtgg  
tctcctggaagggcaaggcgttctccgccatcgccctgggcatcgacacctgctgatgcacgtgctgatcctgtctccca  
ggccgagcgctccaaccccgccgaggtggcccaggccaagctgaagaccggcctgtccatctccaagaaggtgacggac  
aaggagaacTGA

SEQ ID NO: 85

Secuencia de ADNc para la región de codificación CuPSR23 LPAAx 3-1 optimizada por codones para *Prototheca moriformis*

50

55

60

65

ATGgccatcgcgggcgccggtgatcggtgccctgtccctgctgttcttcgtgtccggcctgatcgtaacctggtgcaggc  
 cgtctgcttcgtctgatccgccccctgtccaagaacacgtaccgcccgcacatcaaccgctggtcgaggagctgctgtggctgg  
 5 agctggtgtggctgatcgactggtggggcggtgaagatcaaggtcttcacggaccacgagacgttccacctgatgggc  
 aaggagcacgccttggtcatctgcaaccacaagtccgacatcgactggtggtcggtgggtcctgggccagcgctccggc  
 tgctggggctccacctggcggtcatgaagaagtctccaagtctcgtcccgctcctgggtggtccatgtggttctccgagta  
 cctgttctggagcgctcctgggccaaggacgagatcacgtgaagtccggcctgaaccgctgaaggactacccccctgcc  
 10 cttctggctggcgctgttcgtggaggacgcgcttcacccgcgcgaagtgtggtggcgagcagtaacggcgctcctcc  
 ggctgccccgtgccccgcaactgctgatccccgcacgaagggcttcgtgtcctccgtgtccacatgcgctccttcgtgcc  
 gcgatctacgacgtcaccgtggccatcccaagacgtccccccccccacgtgatccgcatttcaagggccagtcctccg  
 tgctgcacgtgcacctgaagcgccacctgatgaaggacctgcccagtcgcagacgcccgtcgcgagtggtgccgcgac  
 15 atcttcgtggagaaggacgcgctggtggacaagcacaacgccgaggacaccttctccggccaggagctgcaggagaccg  
 gccgccccatcaagtccctgctggtcgtcatctcctgggcccgtcctggaggtgttcggcgccgtcaagttcctgcagtgtcct  
 ccctgctgtcctcctggaagggcctggcggttctccggcatcgccctgggcgtgatcacctgctgatgcacatcctgatcctgt  
 20 tctccagtcggagcgctccacccccgcaaggtggccccgcgaagcccaagaacgagggcgagtcctccaagaccgag  
 atggagaaggagaagTGA

## SEQ ID NO: 86

Secuencia de ácidos nucleicos de codificación 14: 0-tioesterasa ACP, *Cuphea palustris* (cpal FATB2, AAC49180  
 25 adhesión) que contiene un péptido de tránsito heterólogo extendido desde *C. protothecoides* y una extensión N-  
 terminal de 41 aminoácidos derivada de la secuencia nativa *Cpal* FATB2 en constructo D1481 [pS22479]

GCGCACCCCAAGGCGAACGGCAGCGCGGTGTCGCTGAAGTCGGGCTCCCTGGAGACCCAGGAGGACAA  
 30 GACGAGCAGCTCGTCCCCCCCCCCCCGCACGTTTCATCAACCAGCTGCCCCGTGTGGAGCATGCTGCTGT  
 CGGCGGTGACCACGGTCTTCGGCGTGGCCGAGAAGCAGTGGCCCATGCTGGACCGCAAGTCCAAGCGC  
 CCCGACATGCTGGTCGAGCCCCCTGGGCGTGGACCGCATCGTCTACGACGGCGTGAGCTTCCGCCAGTC  
 GTTCTCCATCCGCAGCTACGAGATCGGCGCCGACCGCACCCTCGATCGAGACGCTGATGAACATGT  
 35 TCCAGGAGACCTCCCTGAACCACTGCAAGATCATCGGCCTGCTGAACGACGGCTTCGGCCGCACGCCC  
 GAGATGTGCAAGCGCGACCTGATCTGGGTCTGTGACCAAGATGCAGATCGAGGTGAACCGCTACCCAC  
 GTGGGGCGACACCATCGAGGTCAACACGTGGGTGAGCGCCTCGGGCAAGCACGGCATGGGCCGCGACT  
 GGCTGATCTCCGACTGCCACACCGGCGAGATCCTGATCCGCGCGACGAGCGTCTGGGCGATGATGAAC  
 40 CAGAAGACCCGCCGCTGTGCAAGATCCCCCTACGAGGTGCGCCAGGAGATCGAGCCCCAGTTCGTGCA  
 CTCGCCCCCGTGATCGTGGACGACCGCAAGTTCACAAGCTGGACCTGAAGACGGGCGACAGCATCT  
 GCAACGGCCTGACCCCCCGCTGGACGGACCTGGACGTGAACCAGCACGTCAACAACGTGAAGTACATC  
 GGCTGGATCCTGCAGTCGGTCCCCACCGAGGTGTTTCGAGACGCAGGAGCTGTGCGGCCTGACCCCTGGA  
 45 GTACCGCCGCGAGTGGCGCCGCGACTCCGTGCTGGAGAGCGTCACGGCCATGGACCCCTCGAAGGAGG  
 GCGACCGCTCCCTGTACCAGCACCTGCTGCGCCTGGAGGACGGCGCGGACATCGTGAAGGGCCGCACC  
 GAGTGGCGCCCCAAGAAGCGCGGCCAAGGGCGCCATCCTGACGGGCAAGACCAGCAACGGCAACTC  
 GATCTCCTGA

## SEQ ID NO: 87

Secuencia de ácido amino de 14: 0-tioesterasa ACP, *Cuphea palustris* (CPAL FATB2, adhesión AAC49180) que  
 50 contiene un péptido de tránsito heterólogo extendido desde *C. protothecoides* y una extensión N-terminal de 41  
 aminoácidos derivada de la secuencia nativa *Cpal* FATB2 codificada por constructo D1481 [pS22479]

AHPKANGSAVSLKSGSLETQEDKTSSSSPPPRTFINQLPVWSMLLSAVTTTVFGVAEKQWP  
 MLDRKSKRPDMLVEPLGVDRIVYDGVSFQSFIRSIEIGADRTASIEITLMNMFQETSLN  
 HCKIIGLLNDGFGRTPEMCKRDLIWVVTMKQIEVNRYPTWGDITIEVNTWVSASGKHGMGR  
 55 DWLISDCHTGEILIRATSVWAMNQNKTRRLSKIPYEVQRQIEPQFVDSAPVIVDDRKFHK  
 LDLKTGDSICNGLTPRWTDLDVNQHVNNVKYIGWILQSVPTFVFETQELCGLTLEYRREC  
 60 GRDSVLESVTAMDPSKEGDRSLYQHLLRLEDGADIVKGRTEWRPKNAGAKGAILTGKTSN  
 GNSIS

## SEQ ID No: 88

Secuencia de ácido nucleico de codificación de 14: 0-tioesterasa ACP, *Cuphea palustris* (Cpal FATB2, adhesión AAC49180) que contiene un péptido de tránsito heterólogo extendido de *C. protothecoides*, una extensión N-terminal de 41 aminoácidos derivada de la secuencia nativa FATB2 Cpal, y una etiqueta de epítipo FLAG C-terminal en constructo D1482 [pSZ2480]

5

10

15

20

25

GCGCACCCCAAGGCGAACGGCAGCGCGGTGTCGCTGAAGTCGGGCTCCCTGGAGACCCAGGAGGACAA  
GACGAGCAGCTCGTCCCCCCCCCCCCGCACGTTTCATCAACCAGCTGCCCCTGTGGAGCATGCTGCTGT  
CGGCGGTGACCACGGTCTTCGGCGTGGCCGAGAAGCAGTGGCCCATGCTGGACCGCAAGTCCAAGCGC  
CCCAGCATGCTGGTCGAGCCCCTGGGCGTGGACCGCATCGTCTACGACGGCGTGAGCTTCCGCCAGTC  
GTTCTCCATCCGCAGCTACGAGATCGGCGCCGACCGCACCGCCTCGATCGAGACGCTGATGAACATGT  
TCCAGGAGACCTCCCTGAACCACTGCAAGATCATCGGCCTGCTGAACGACGGCTTCGGCCGCACGCCC  
GAGATGTGCAAGCGCGACCTGATCTGGGTGCTGACCAAGATGCAGATCGAGGTGAACCGCTACCCAC  
GTGGGGCGACACCATCGAGGTCAACACGTGGGTGAGCGCCTCGGGCAAGCACGGCATGGGCCGCGACT  
GGCTGATCTCCGACTGCCACACCGGCGAGATCCTGATCCGCGCGACGAGCGTCTGGGCGATGATGAAC  
CAGAAGACCCGCGCCTGTGCAAGATCCCTACGAGGTGCGCCAGGAGATCGAGCCCCAGTTCGTGCA  
CTCCGCCCCCGTGATCGTGGACGACCGCAAGTTCACAAAGCTGGACCTGAAGACGGGCGACAGCATCT  
GCAACGGCCTGACCCCCCGCTGGACGGACCTGGACGTGAACCAGCACGTCAACAACGTGAAGTACATC  
GGCTGGATCCTGCAGTCGGTCCCCACCGAGGTGTTTCGAGACGCAGGAGCTGTGCGGCCTGACCCTGGA  
GTACCGCCGCGAGTGGGCCGCGACTCCGTGCTGGAGAGCGTCACGGCCATGGACCCCTCGAAGGAGG  
GCGACCGCTCCCTGTACCAGCACCTGCTGCGCCTGGAGGACGGCGCGGACATCGTGAAGGGCCGACC  
GAGTGGCGCCCCAAGAACGCCGGCGCCAAGGGCGCCATCCTGACGGGCAAGACCAGCAACGGCAACTC  
GATCTCCatggactacaaggaccacgacgcgactacaaggaccacgacatcgactacaaggacgacg  
acgacaagtga

SEQ ID NO: 89

30

Secuencia de aminoácido de 14: 0-tioesterasa ACP, *Cuphea palustris* (CPAL FATB2, adhesión AAC49180) que contiene un péptido de tránsito heterólogo extendido de *C. protothecoides*, una extensión N-terminal de 41 aminoácidos derivada de la secuencia FATB2 Cpal nativa, y una etiqueta de epítipo FLAG C-terminal codificada por constructo D1482 [pSZ2480]

35

40

45

50

55

60

65

AHPKANGSAVSLKSGSLETQEDKTSSSSPPPRTFINQLPVWSMLLSAVTTTVFGVAEKQWP  
MLDRKSKRPDMLVEPLGVDRIVYDGVSFQRQSFIRSIEIGADRTASIELTMNMFQETSLN  
HCKIIIGLLNDGFGRTPMCKRDLIWWVTMQUIEVNRYPTWGDTEVNNTWVSASGKHGMGR  
DWLISDCHTGEILIRATSVWAMMNQKTRRLSKIPYEVQRQIEPQFVDSAPVIVDDRKFHK  
LDLKTGDSICNGLTPRWTDLDVNQHVNNVKYIGWILQSVPTVEVFETQELCGLTLEYRREC  
GRDSVLESVTAMDPskeGDRSLYQHLLRLEDGADIVKGRTEWRPKNAGAKGAILTGKTSN  
GNSISMDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK

## REIVINDICACIONES

1. Una célula de microalgas oleaginosas del género *Prototheca*, que comprende opcionalmente un gen de la invertasa de sacarosa exógena de manera que la célula puede crecer en sacarosa como única fuente de carbono, la célula comprende un gen heterólogo exógeno que codifica una enzima LPAAT activo, la célula productora de un aceite consistente en triglicéridos, en el que el aceite es, en virtud de la actividad LPAAT:

- (a) enriquecido en triglicéridos con ácidos grasos de cadena media; o
- (b) enriquecido en triglicéridos del tipo saturado-insaturado-saturado.

2. La célula de la reivindicación 1, en la que los triglicéridos del aceite comprenden 40, 50, 60, 70, o 80% o más de C8: 0, C10: 0, C12: 0, C14: 0, o C16: 0 ácidos grasos.

3. La célula de la reivindicación 1 o 2, donde la célula comprende además:

- (a) un gen exógeno que codifica una tioesterasa de acil-ACP graso activo, y, opcionalmente, los triglicéridos del aceite están enriquecidos en ácidos grasos de cadena media por mayor que 70%, como consecuencia de la expresión de la LPAAT exógena y tioesterasa de acil-ACP;
- (b) ácidos nucleicos recombinantes que pueden funcionar para codificar una enzima exógena KAS I o KAS IV o para reducir la actividad de una enzima endógena KAS I; y/
- (c) ácidos nucleicos que pueden funcionar para reducir la expresión de una desaturasa de ácido graso delta 12, opcionalmente a través de un promotor regulable, a fin de producir un aceite con ácidos linoleico y linolénico por un total de 5 por ciento en área o menos por FAME GC/FID.

4. La célula de la reivindicación 1, en la que el aceite se enriquece en SOS, POS, y/o POP, opcionalmente en el que el aceite comprende triglicéridos que contienen al menos 50% de SOS y, opcionalmente, menos del 10% SSS.

5. La célula de la reivindicación 4, que comprende además:

- (a) un knockout o knockdown de un gen de desaturasa de estearoil-ACP, tioesterasa de acil-ACP graso de genes, o ambos; y/o
- (b) ácidos nucleicos recombinantes operables para aumentar actividad de sintasa cetoadil-ACP (KAS).

6. La célula de la reivindicación 4 o 5, en la que:

- (a) la relación de estearato de oleato en el aceite es de 3: 1  $\pm$  20%;
- (b) POP, SOS, y POS en el aceite comprenden al menos 30% en suma;
- (c) el aceite comprende al menos 30% POS;
- (d) el aceite comprende POP a 16% $\pm$ 20%, POS a 38% $\pm$ 20%, y SOS en 23%  $\pm$  20%; y/o
- (e) el perfil de ácidos grasos del aceite comprende ácido araquídico 1 a 4%.

7. La célula de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en la que:

- (a) la célula comprende además ácidos nucleicos que pueden funcionar para reducir la expresión de una desaturasa de ácido graso delta 12, opcionalmente a través de un promotor regulable, a fin de producir un aceite con linoleico y linolénico por un total de 5 por ciento de área o menos;
- (b) el aceite tiene más de 65% de SOS, menos de 45% de ácido graso insaturado, menos del 5% de ácidos grasos poliinsaturados, menos de 1% de ácido láurico, y los ácidos grasos trans de menos de 2%; y/o
- (c) la LPAAT tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78 o SEQ ID NO: 79 o una secuencia que tiene al menos 95% de identidad con SEQ ID NO: 78 o SEQ ID NO: 79.

8. La célula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la célula es *Prototheca moriformis*.

9. Un método para producir un aceite que comprende proporcionar o cultivar una célula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, y la extracción del aceite, la célula se cultiva heterótrofa.

10. Un método de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el aceite comprende uno o más de: al menos 10% ergosterol; ergosterol y  $\beta$ -sitosterol, donde la relación de ergosterol a  $\beta$ -sitosterol es mayor que 25: 1; ergosterol y brasicasterol; ergosterol, brasicasterol, y poriferasterol; y en el que el aceite es opcionalmente libre de uno o más de  $\beta$ -sitosterol, campesterol, y estigmasterol.

11. El método de la reivindicación 10 en el que el aceite (a) forma cristales  $\beta$ -polimorfos, opcionalmente en el que los cristales tienen una estructura 2L laminillas o una estructura 3L laminillas; o (b) en donde las formas de petróleocristales  $\beta$ -polimorfo, opcionalmente en donde los cristales tienen una estructura de laminillas 2L o una estructura de laminillas 3L.

12. El método de la reivindicación 10 o 11, en el que:

(a) los triglicéridos tienen un perfil de ácidos grasos **caracterizado porque** la suma del porcentaje de estearato y palmitato es igual al porcentaje de oleato multiplicado por 2,0 +/- 40%;

(b) el aceite tiene más que 65% de triglicéridos SOS, ácido graso insaturado de menos de 45%, menos de 5% de ácidos grasos insaturados, menos de 1% de ácido láurico, y menos de 2% de ácidos grasos trans;

(c) la suma del estearato y palmitato en el perfil de ácidos grasos es el doble del porcentaje de oleato,  $\pm$  20%, opcionalmente en el que el perfil sn-2 tiene al menos 40% de oleato;

(d) el aceite es al menos 40, 50, 60, 70, 80, o 90% de SOS; y/o

(e) el aceite es un plato de acortamiento que tiene una temperatura de fusión de entre 30°C y 40°C, opcionalmente:

(i) que comprende cristales  $\beta'$  polimórficos;

(ii) que tiene un contenido de grasa sólida de menos de 15% a 35°C; y/o

(iii) que comprende 15 a 20% de C8 a C14 de ácidos grasos, ácidos grasos de 45-50% de C16 y más, y/o ácidos grasos insaturados de 30-25%.

13. Un método en el que el aceite obtenido por el método de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 se utiliza para producir un alimento, combustible o producto químico.

14. Un constructo, vector, cromosoma o célula huésped que comprende ácidos nucleicos que codifican una proteína que tiene al menos 90% de identidad con SEQ ID NO: 77 a 79, que tiene opcionalmente % de identidad, al menos 95% de identidad o al menos 98% de identidad a SEQ ID NO: 77 a 79.

15. El constructo, vector, cromosoma, o célula huésped de la reivindicación 14, que comprende ácidos nucleicos que tienen al menos 80, 90, 95, 96, 97, 98, o 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 80-85 o secuencias equivalentes en virtud de la degeneración del código genético.

**PERFILES DE ACEITE DE MUESTRA: CONTENIDO OLEICO BAJO A ALTO**

	Rico en cáprico	Rico en cáurico	Mirístico- palmitico	Palmitico alto	Equilibrado	Estearico- palmitico -oleico	Palmitico- oleico mezclado	Palmitico- oleico 2 mezclado	Oleico alto	Oleico de alta estabili- dad
<i>Aceite</i>	<i>RB Z</i>	<i>RBD-1</i>	<i>RBD-2</i>	<i>RBD-3</i>	<i>RBD Y</i>	<i>RBD X</i>	<i>RBD W</i>	<i>RBD-4</i>	<i>RDB-5</i>	<i>RBD-6</i>
C8:0	4.5	0.2	0.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C10:0	29.3	16.8	13.2	0.0	2.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C12:0	4.4	47.2	2.8	0.2	0.9	0.0	0.1	0.1	0.0	0.0
C14:0	23.6	11.3	24.8	6.0	15.3	0.7	2.0	1.7	0.5	0.6
C16:0	21.5	5.1	31.6	49.1	35.9	24.0	28.7	25.0	6.9	8.2
C16:1	0.1	0.1	0.1	0.4	0.3	0.2	0.4	1.0	0.7	0.8
C18:0	2.3	0.9	4.8	5.1	3.5	21.4	9.5	3.6	1.4	1.9
<b>C18:1</b>	<b>8.5</b>	<b>12.8</b>	<b>13.9</b>	<b>28.7</b>	<b>29.6</b>	<b>43.5</b>	<b>48.9</b>	<b>59.4</b>	<b>79.5</b>	<b>85.9</b>
C18:2	4.6	4.2	4.8	8.3	10.3	7.8	8.0	7.4	8.9	0.05
C18:3	0.3	0.3	0.2	0.3	0.2	0.1	0.2	0.2	0.2	0.0

**Figura 1**

INTERVALO DE CONTENIDO DE GRASA SÓLIDA: ACEITES HECHOS PARA SOLAZYME

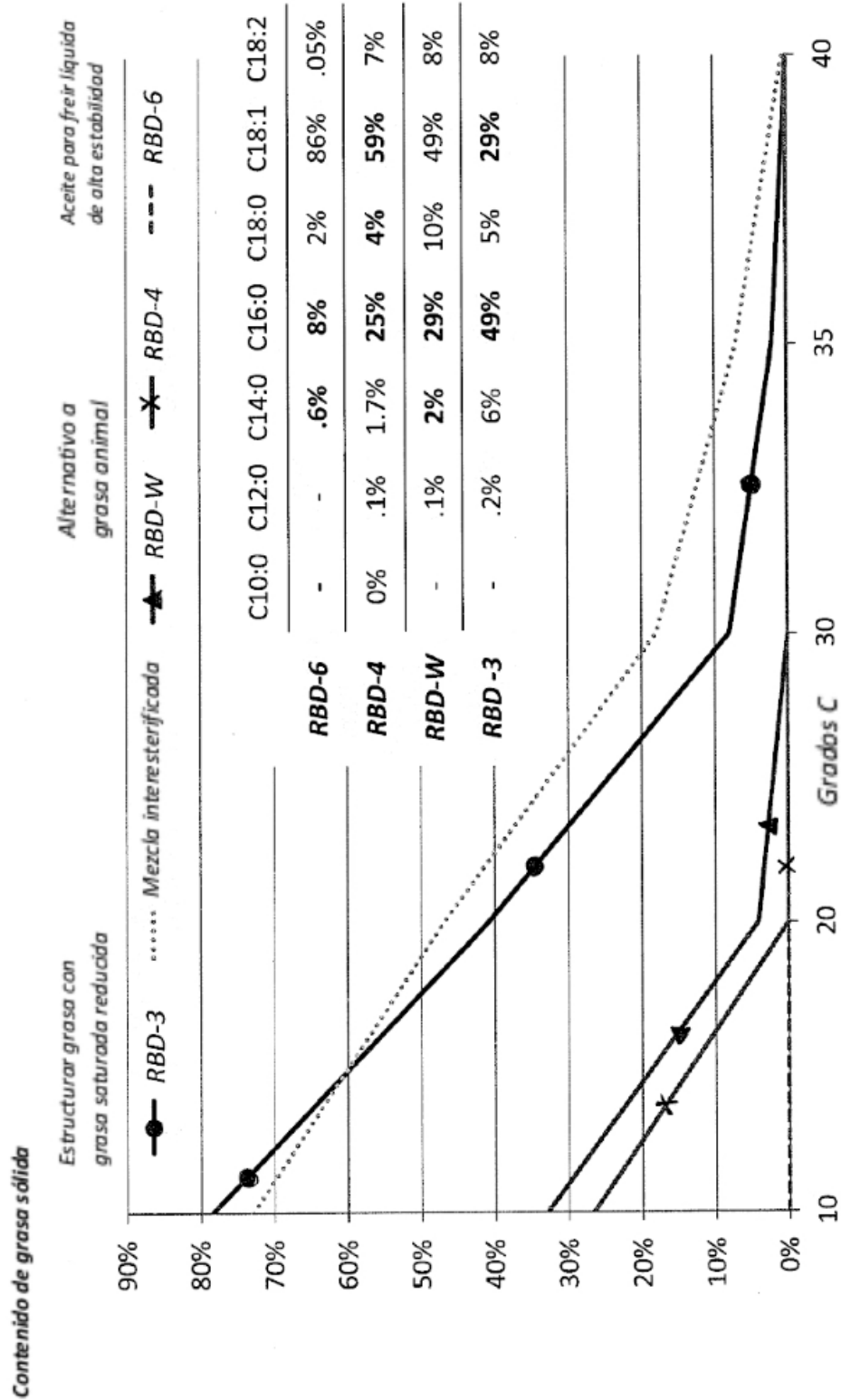
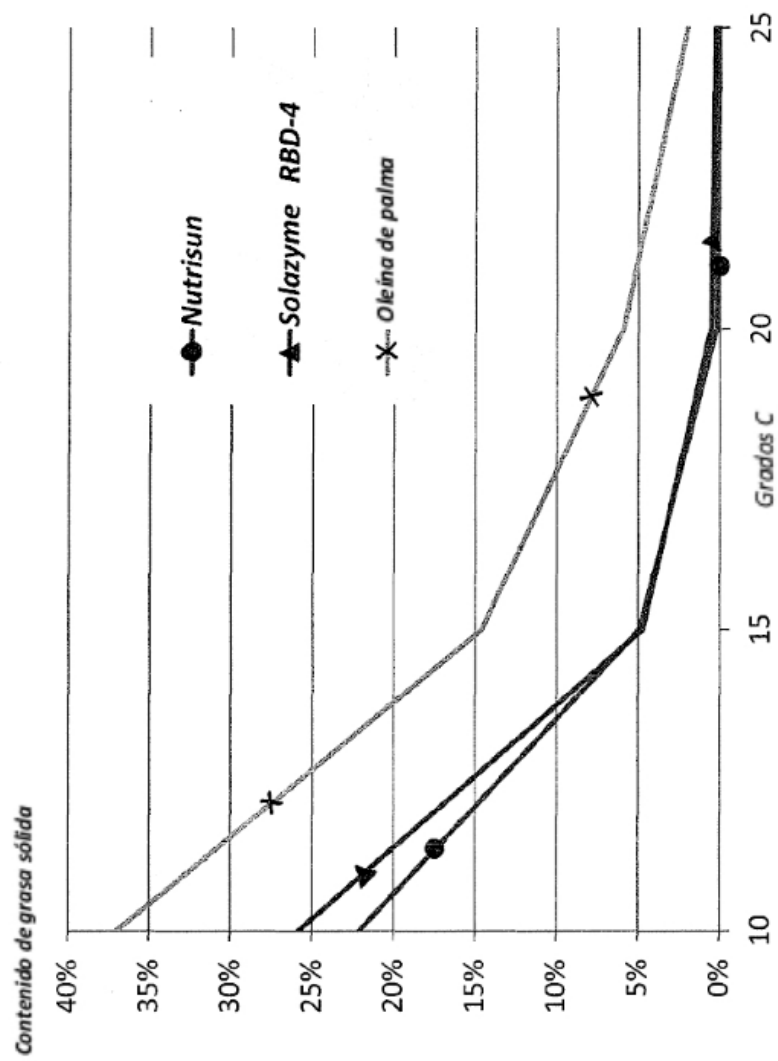


Figura 2



**COMPOSICIONES ALTERNATIVAS: PERFILES SFC SIMILARES**



**Figura 3**

# ESTRUCTURAR COMPOSICIONES DE GRASA

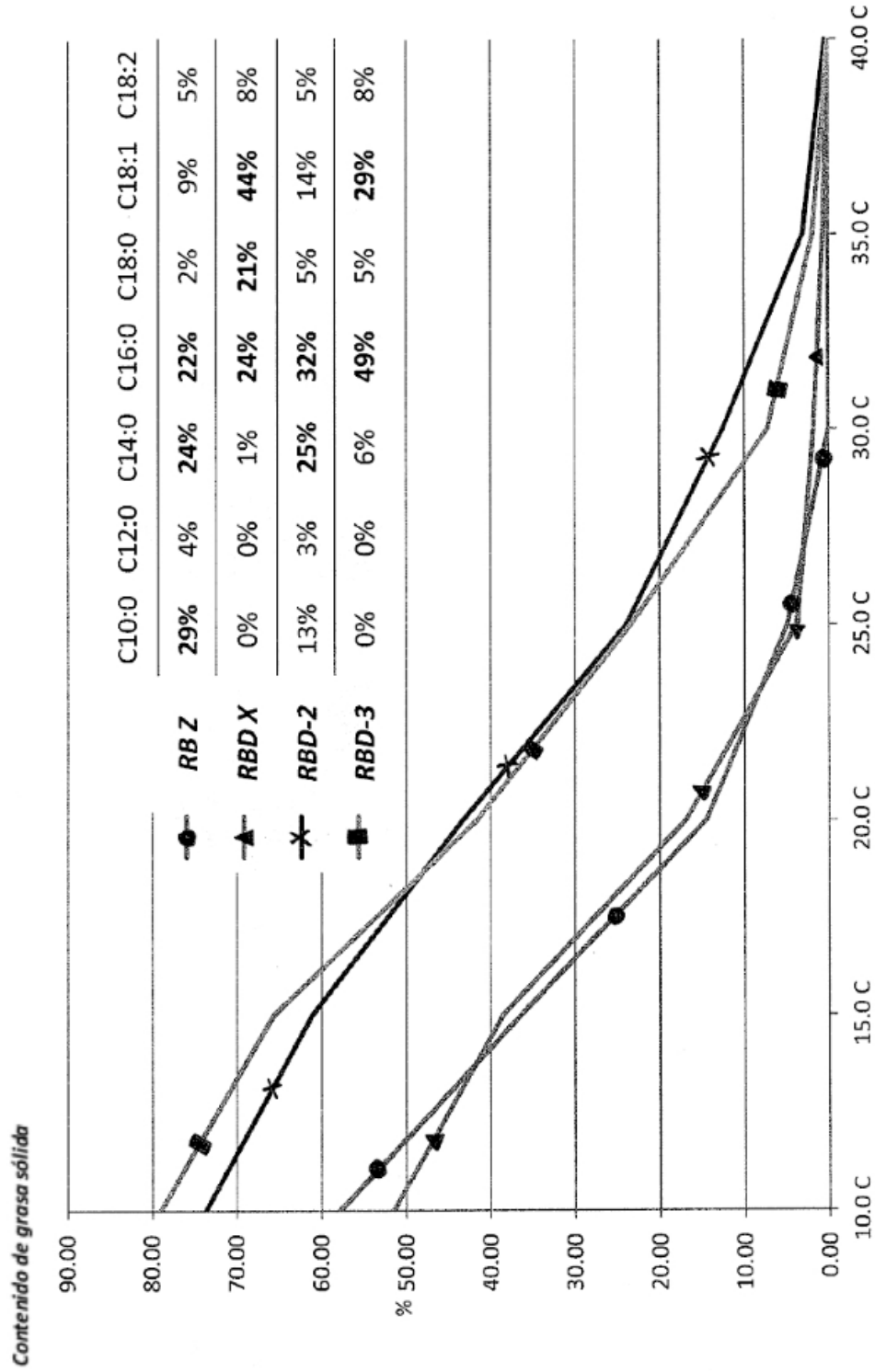


Figura 4

## ACEITES HECHOS DE SOLAZYME: PROPIEDADES FÍSICAS ÚNICAS

- *Perfil de ácido graso similar a palma pero...*
  - Sólidos más altos y fusión más aguda
  - Completamente fundido por temp. corporal
- *~20% grasa saturada más baja vs. mezcla de acortamiento*

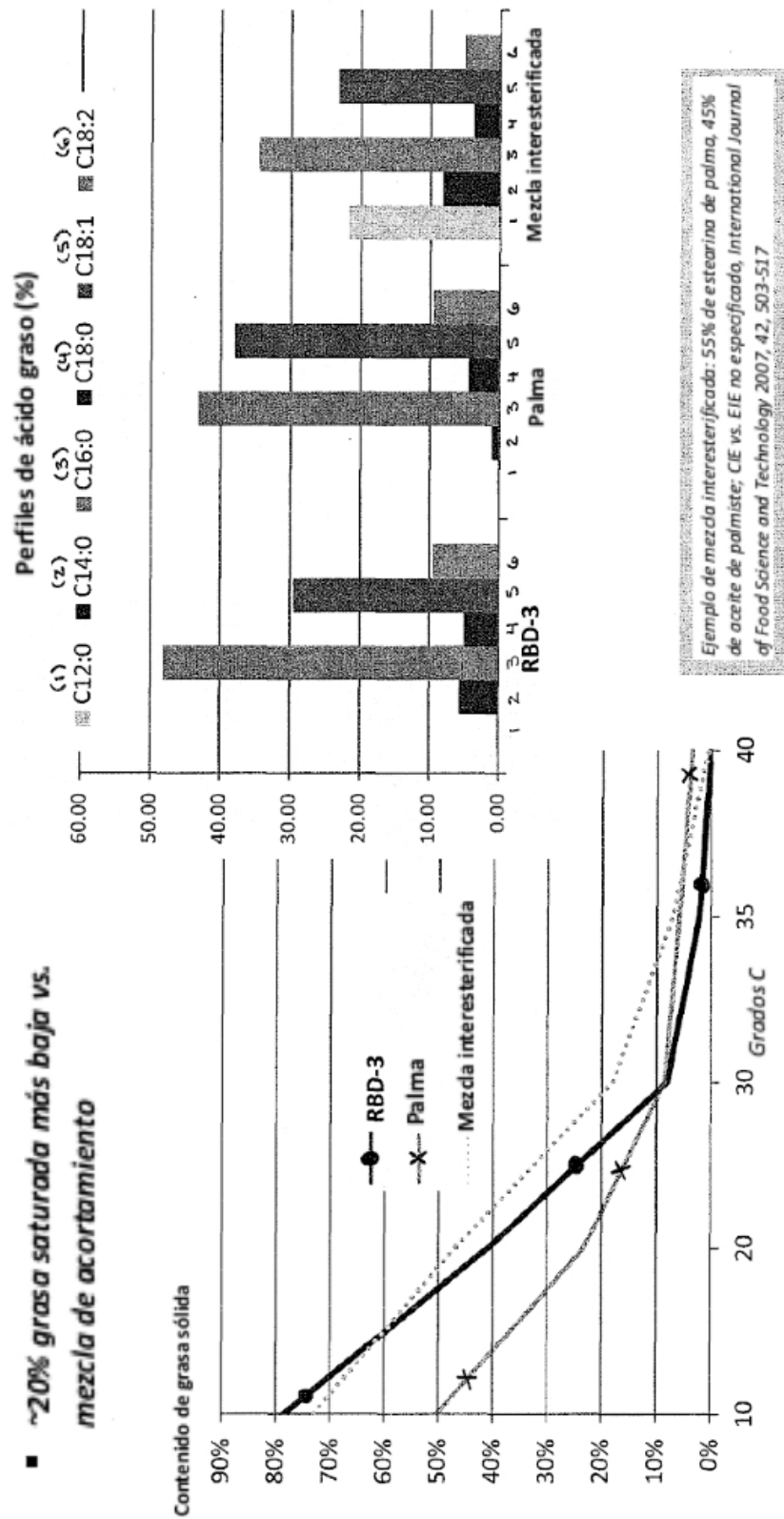


Figura 5

## Aceite de alga rico en láurico

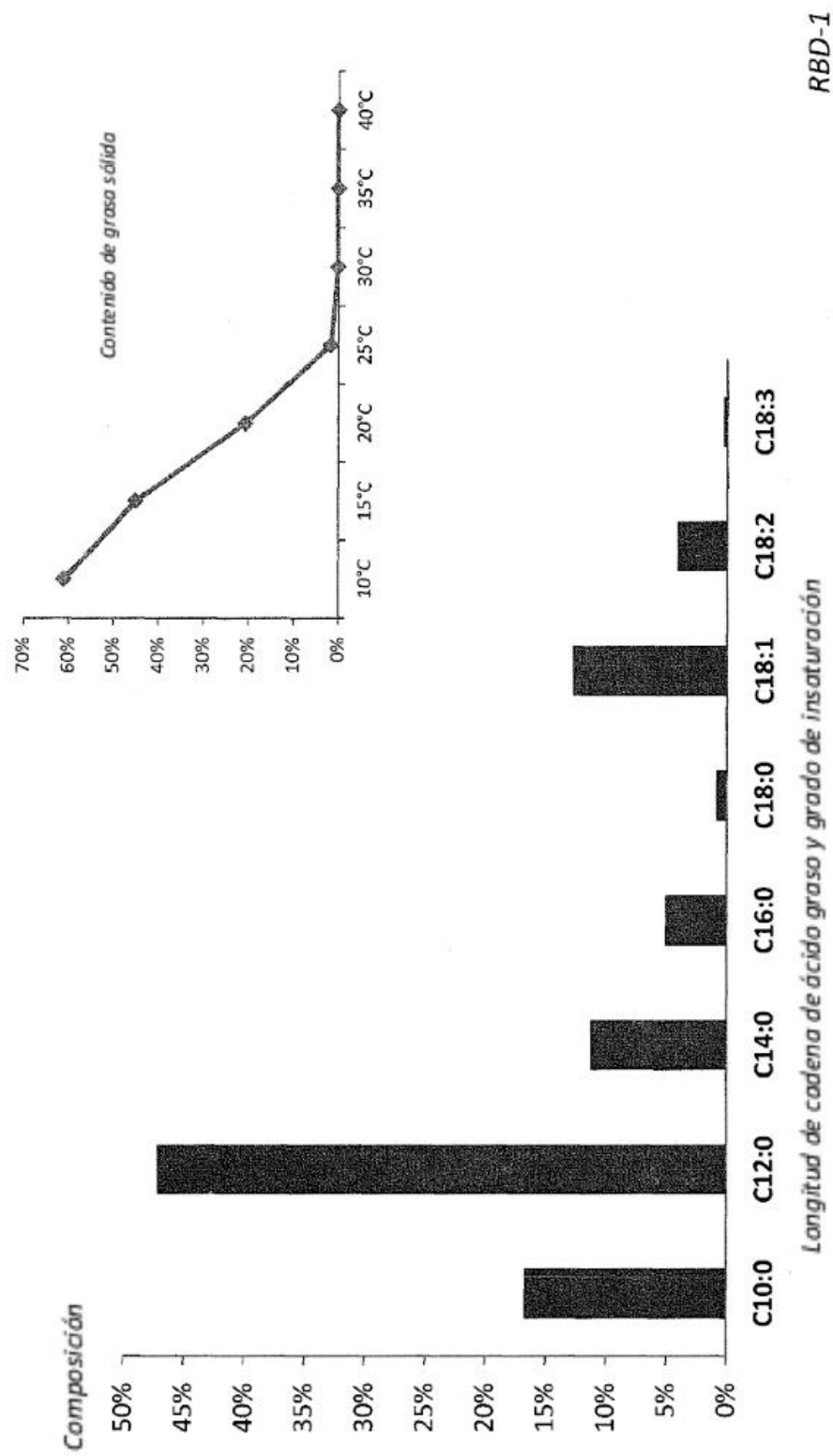


Figura 6

## Aceite de alga mirístico-palmitico

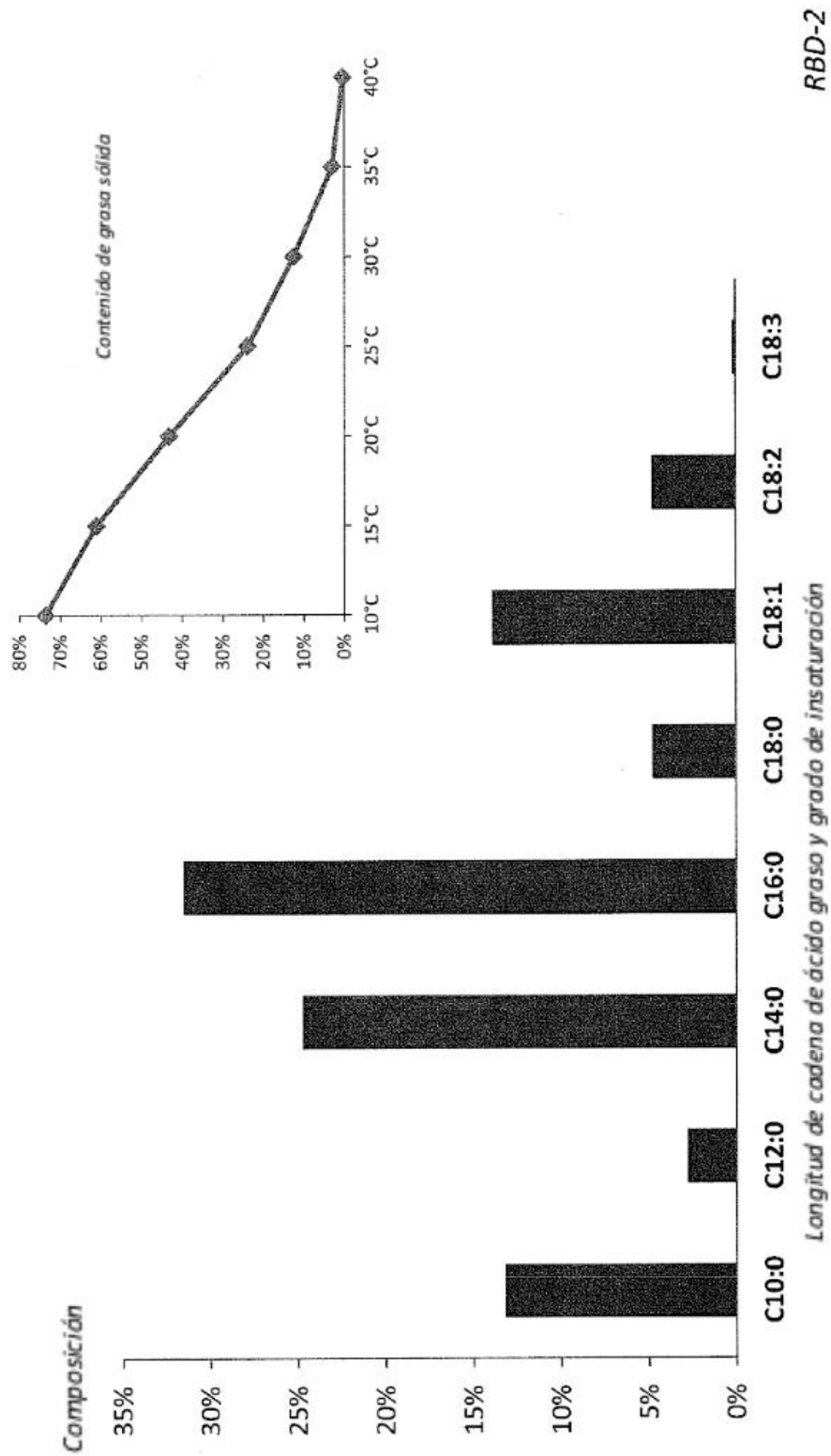


Figura 7

## Aceite de alga palmítico alto

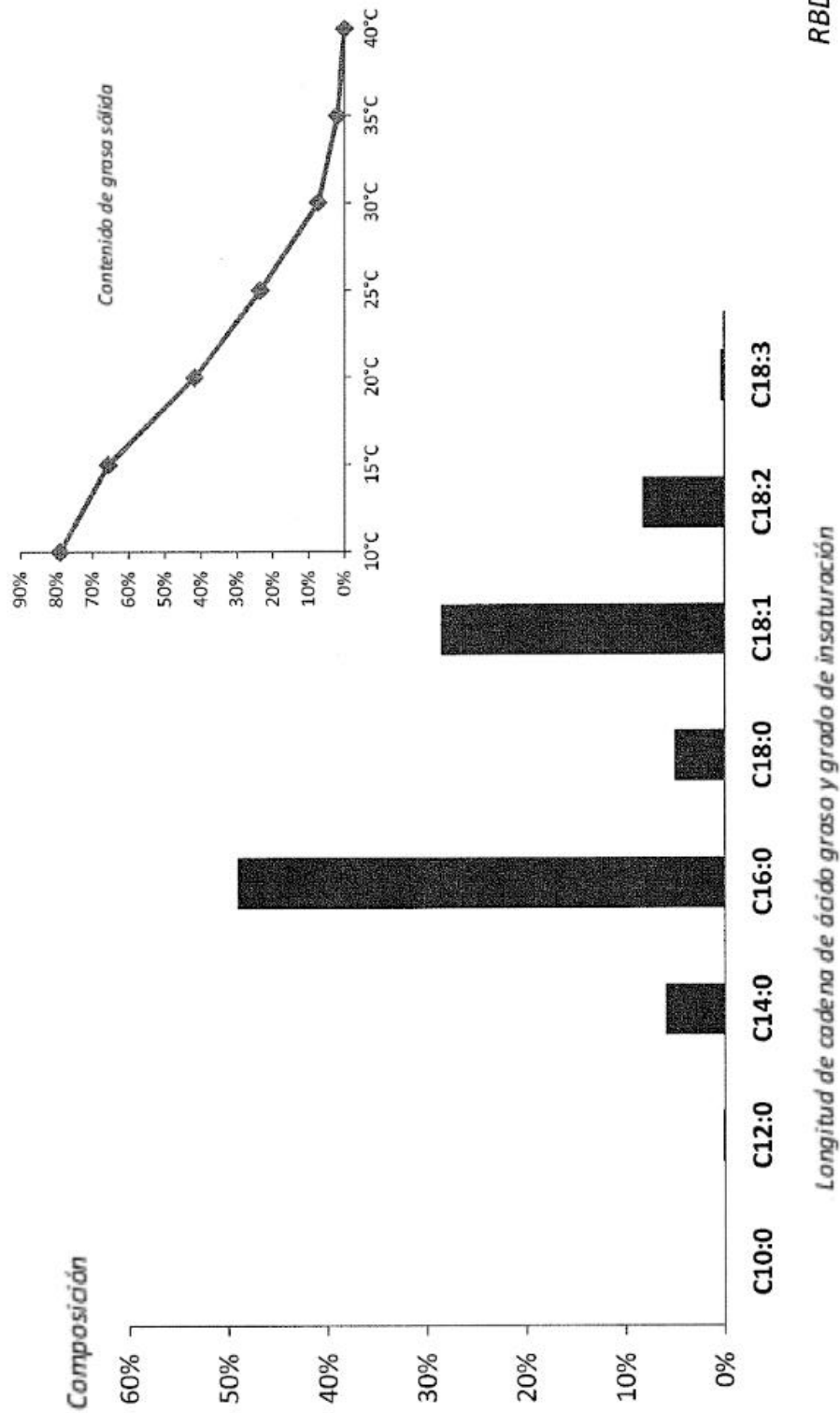
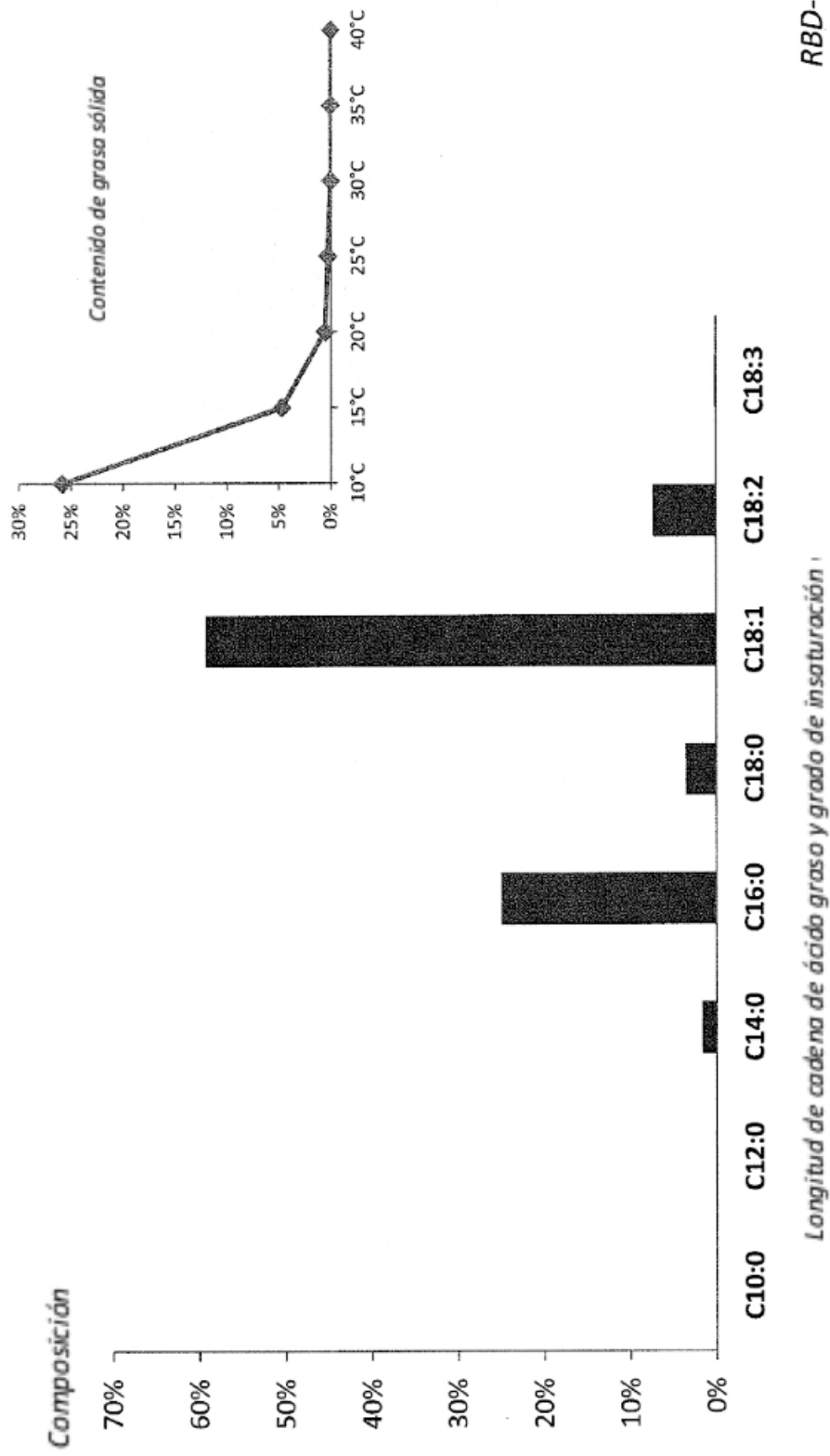


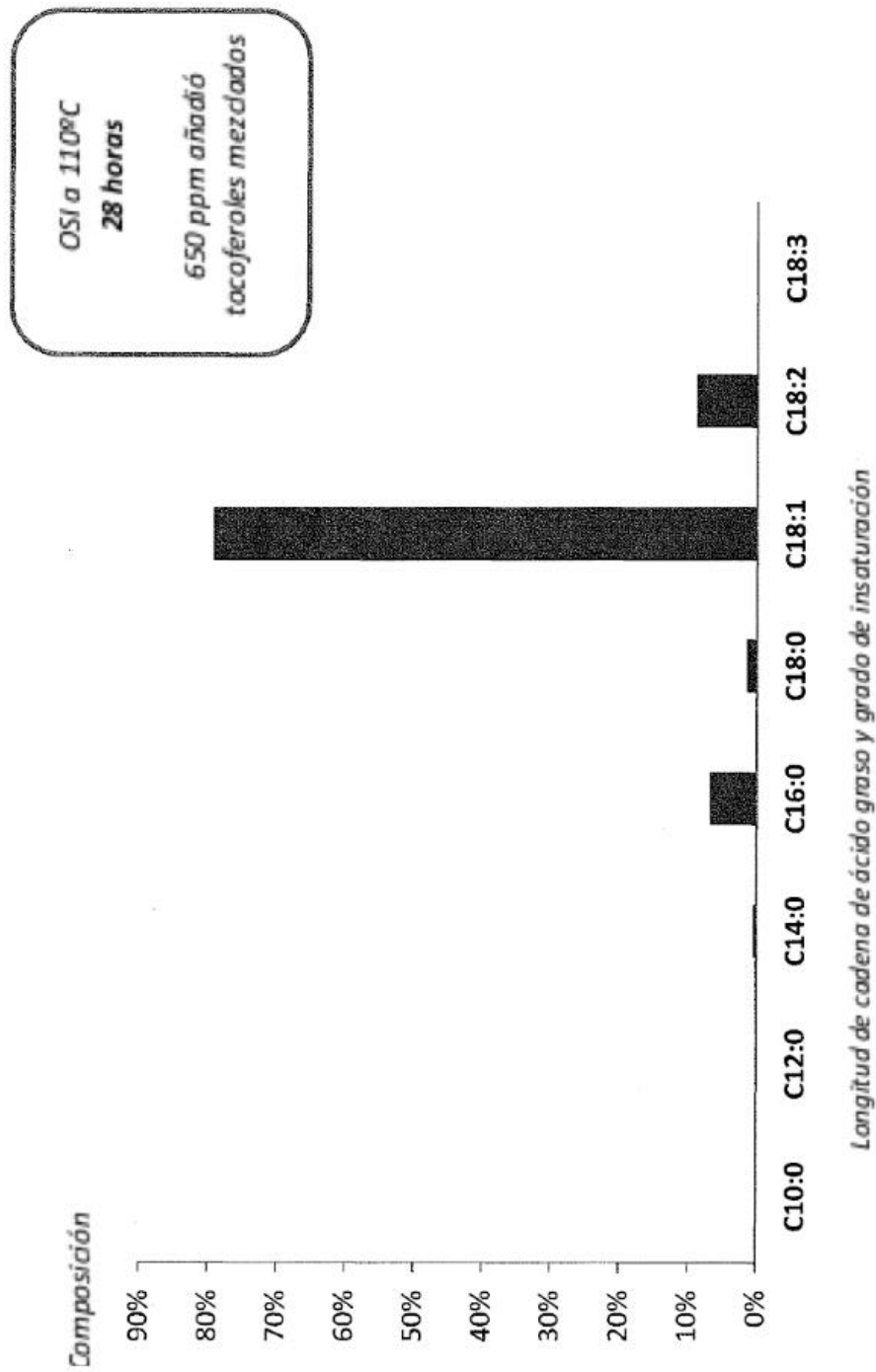
Figura 8

# **Aceite de alga medio palmítico oleico alto**



**Figura 9**

## Aceite de alga oleico alto



RBD-5

Figura 10



## Aceite de alga oleico de alta estabilidad

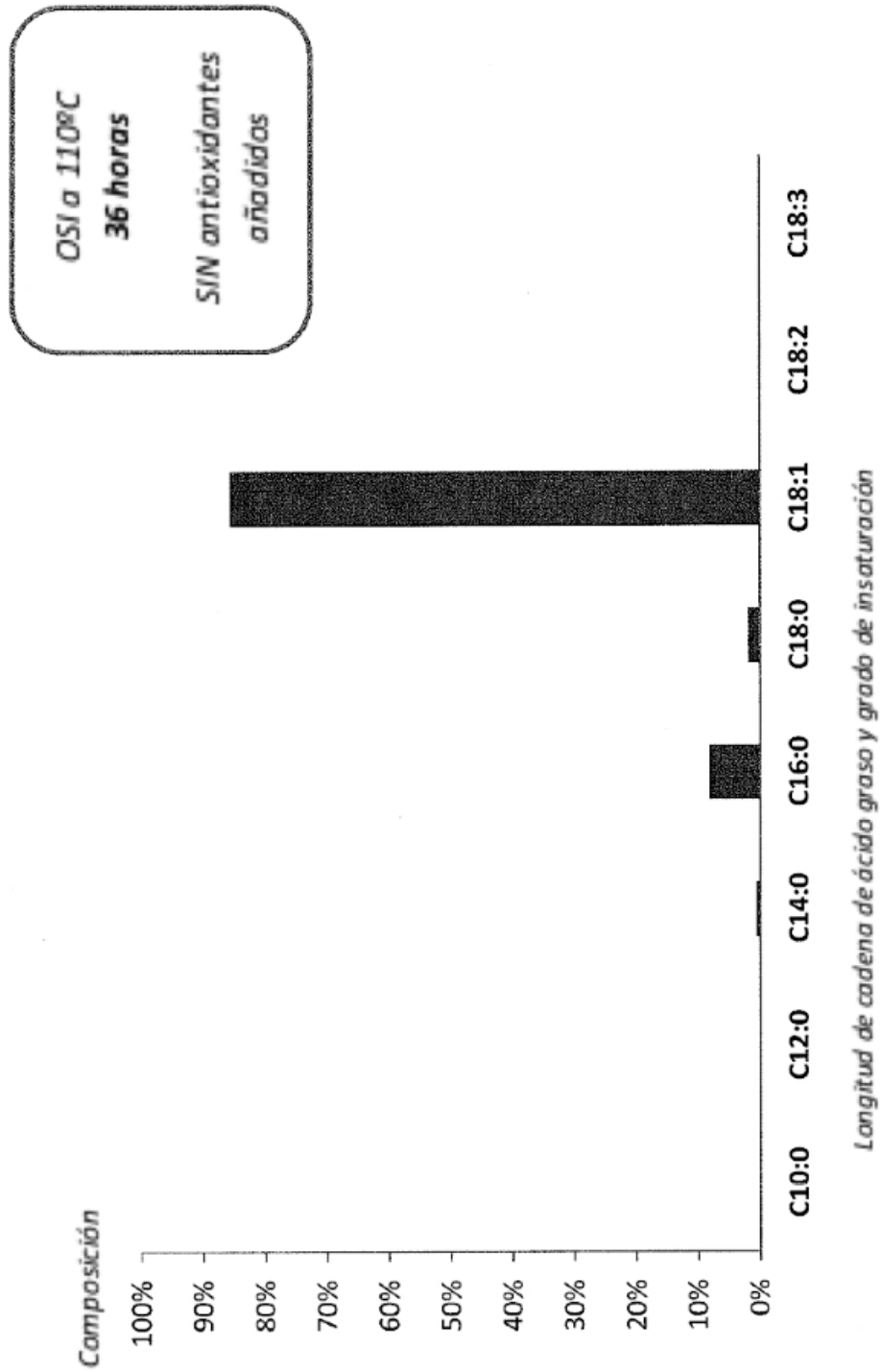


Figura 11

ATEMPERACIÓN DE GRASA / MÚLTIPLES ESTRUCTURAS DE TAG

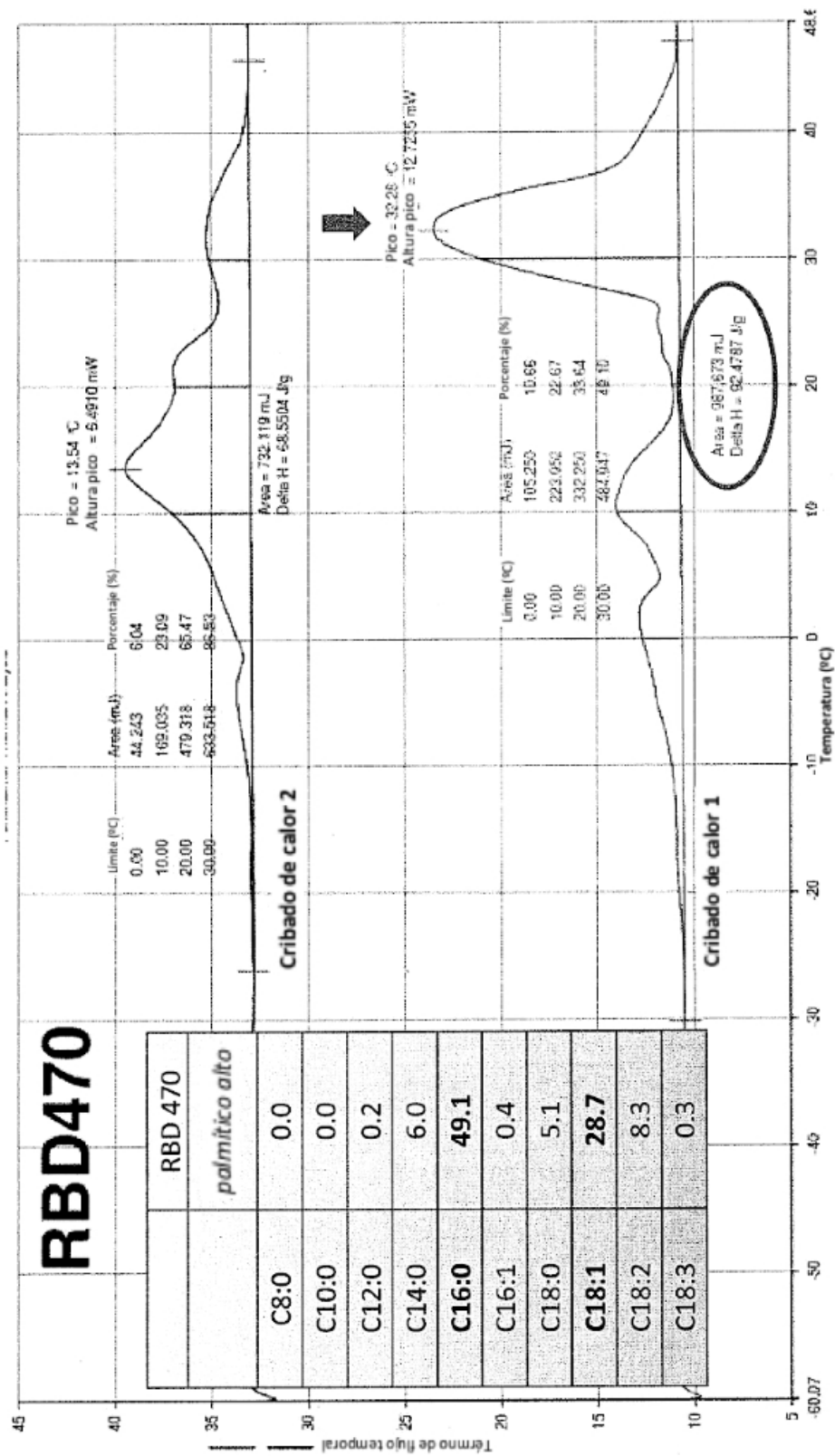


Figura 12

Lote	Nombre	Características	Beneficios
RBD-6	Alta estabilidad Rico en oleico	Niveles muy bajos de poliinsaturados < .1% combinados con niveles muy altos de monoinsaturados (oleicos) >85%	Niveles bajos sin precedente de poliinsaturados crea tal vez el aceite rico en oleico natural más estable en cualquier lugar del mundo para uso en aplicaciones industriales y de alimentos. Estabilidad excelente y baja reactividad (oxidativa) es ideal para uso en aperitivos o aplicaciones de recubrimiento por pulverización en alimentos. Combinación de punto de vertido alto y estabilidad oxidativa es atractiva para usos industriales como fluidos y lubricantes funcionales bio-basados. Notable estabilidad minimiza la necesidad de antioxidantes para añadirse al aceite.
RBD-5	Alto oleico Aceite de girasol Mimético	Niveles bajos de poliinsaturado <10% combinados con altos niveles de monoinsaturados (oleicos) ~80%	Alternativa derivada de azúcar a girasol oleico alto con mejor perfil GHG (producción brasileña). Aceite ideal para cocinar y freír; equilibra estabilidad con beneficios para la salud de poliinsaturados. El nivel más alto de poliinsaturados (que el aceite de alga de alta estabilidad) baja el punto de vertido para aplicaciones industriales y de alimentos p. ej. fluidos funcionales
RBD-1	Alternativa rica en láurico a aceite de palmiste, aceite de coco	Niveles altos de ácidos grasos saturados de longitud de cadena media (C <sub>10</sub> -C <sub>14</sub> )	Alternativa derivada de azúcar a aceite de palmiste y aceite de coco con sostenibilidad mejorada y perfiles de ácido graso para las industrias oleoquímicas y de alimentos. Concentración de ácido graso de cadena media mejorada (C <sub>10</sub> – C <sub>14</sub> ) creará grasa de fusión más aguda para aplicación de recubrimiento de repostería, y propiedades de espuma eficiente en jabones. Aceite rico en láurico también interesante como ola de recogida de aceite de alimentos de aceite de coco como láurico es neutral a corazón sano; sat sólido para cocción y/o repostería.

Figura 13

Lote	Nombre	Características	Beneficios
RBD-3	Alto palmítico / Bajo oleico	50% palmítico y 30% oleico; perfil similar a una media fracción de palma especial utilizada para crear estructura en productos alimenticios	Grasa de estructuración muy eficiente para productos alimenticios maximiza la estructuración mientras que se minimiza el contenido de grasa saturada. Perfil de fusión agudo minimiza impacto negativo en propiedades sensoriales de productos alimenticios. Reemplazo para fracciones de palma especial en productos alimenticios; perfil de sostenibilidad mejorada comparada a palma Concentración únicamente alta de ácido mirístico combinado con ácido cáprico y palmítico crea perfiles de fusión agudos y contenido de grasa sólida más alto a temperaturas bajas que aceite de palma; perfil de sostenibilidad mejorada comparado con palma. Perfil de contenido de grasa sólida muy único
	Rico en mirístico /palmítico	Nivel más alto de mirístico que cualquier aceite existente	
RBD-2			
RBD-4	Oleico alto Palmítico medio	60% oleico y 25% palmítico; oleico más alto y palmítico más bajo que aceite de palma	Alto contenido oleico combinado con niveles palmíticos medios produce aceite muy estable con contenido de grasa sólida que lo hace una excelente alternativa de aceite de freír: textura de producto alimenticio puede ser impactado positivamente por recogida de aceite líquido reducida . 30% de grasas saturadas para aplicaciones de acortamiento. Alternativa potencialmente buena a aceites que contienen grasa trans.

Figura 14

# ACEITE OLEICO ALTO DE SOLAZYME

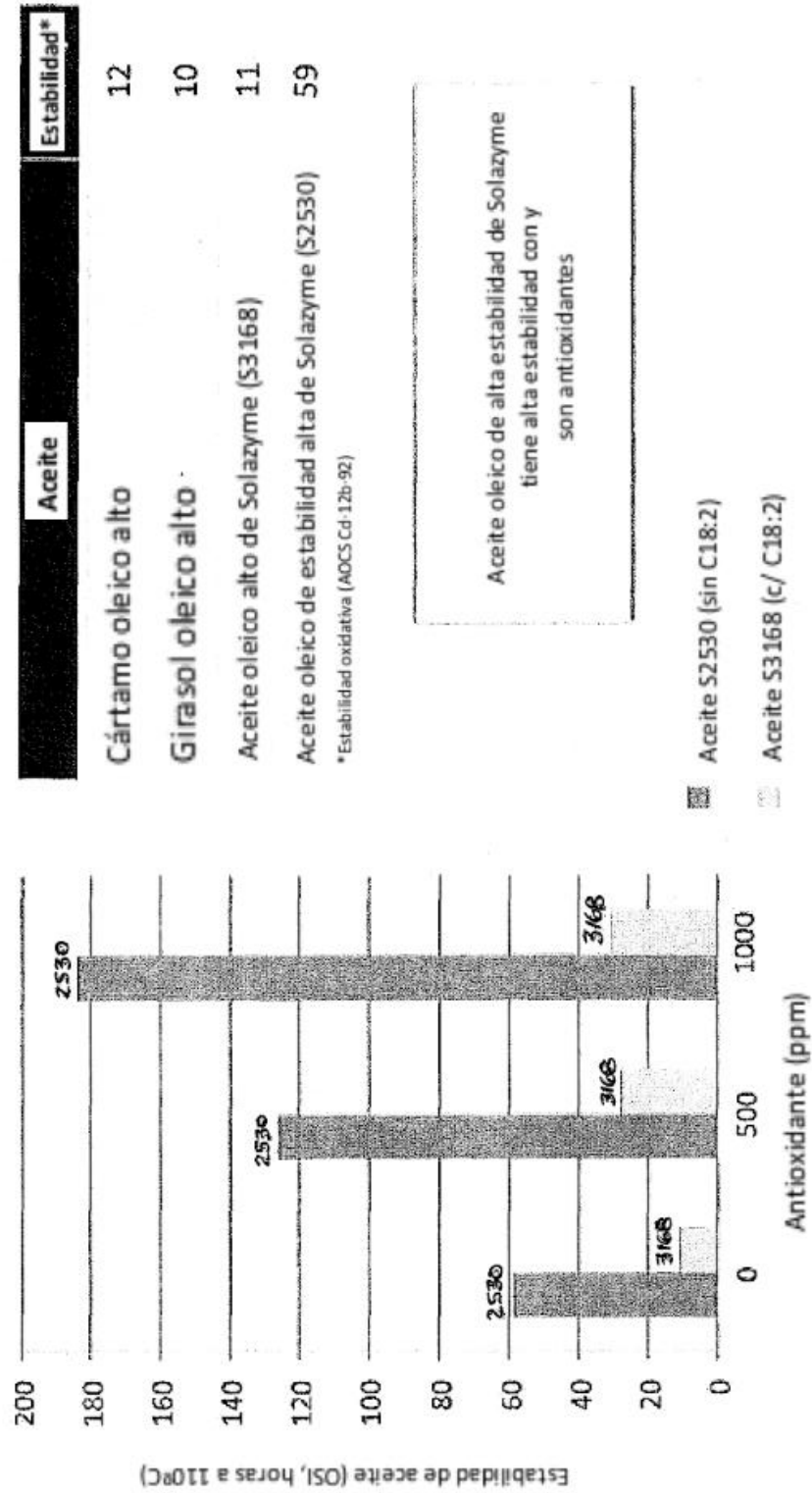


Figura 15

<i>prueba</i>	<i>aceite RBD ensayado</i>	<i>resultado</i>	<i>protocolo de prueba</i>
OSI	RBD 502	Max corriente: 242 Horas a 110 °C	Método AOCS Cd 12b-92 (modificado)
Punto de vertido	RBD 437	-19,5 °C	D97
Punto de turbidez	RBD 437	7,5 °C	AOCS Cc 6-25
Punto de ignición	RBD 437	245 °C	AOCS Cc 9b-55
Viscosidad	Media de RBD 437 y RBD 469	41,6 cSt	Viscosidad (D445) a 40 °C
Índice de viscosidad	"	195,5	Índice de viscosidad (D445)
Color	RBD 437	2,0 Rojo 18,0 Amarillo	Color Lovibond AOCS Cc 13j-97 (célula de 5 ¼ pulgadas)
Color (convertido)	RBD 437	87,3, -8,7, 32,3	Transmitancia Hunter: L, a, b
Bio-degradabilidad		Biodegradación definitiva	OECD 301 B

Figura 16

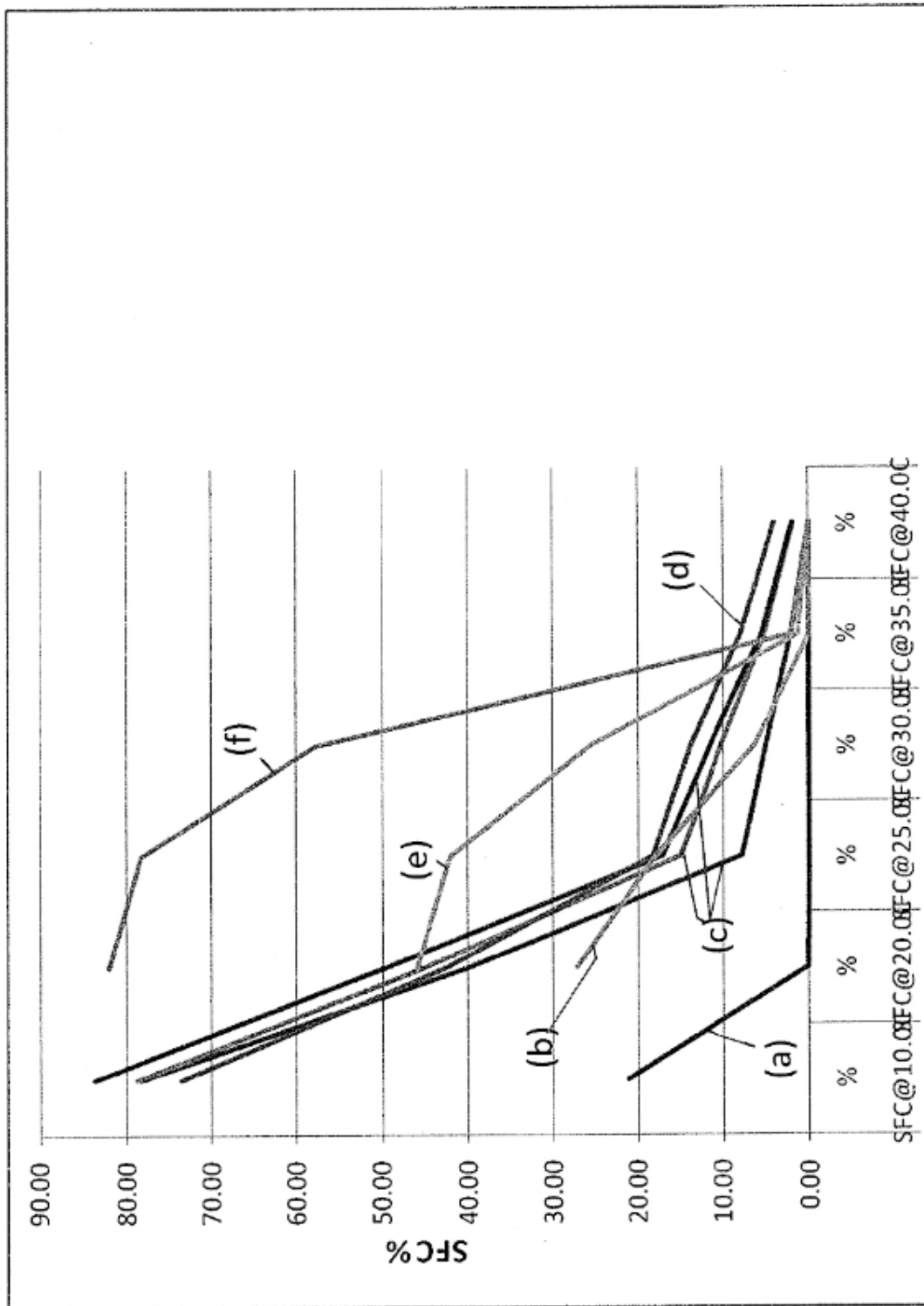


Figura 17

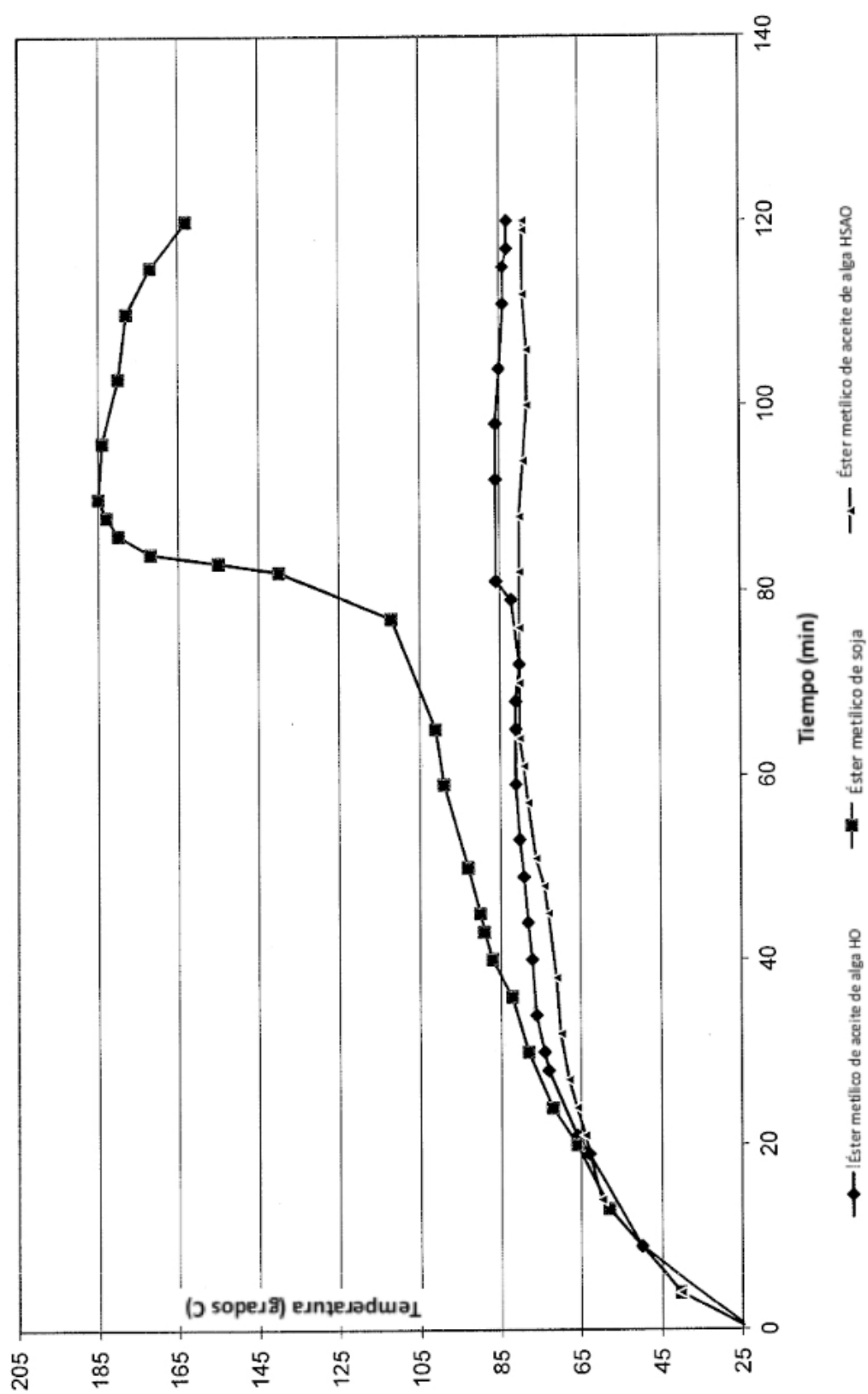


Figura 18



PRUEBA	PROTOCOLO DE PRUEBA	ACEITE DE ALTA DE ALTA ESTABILIDAD	ACEITE DE ALGA OLEICO ALTO	COMENTARIOS SOBRE ALTA ESTABILIDAD DE ACEITE DE ALGA
OSI A 100 °C	Método AOCS Cd 12b-92	41,0 – 56,6 horas (puro) 242 horas (antioxidantes naturales)	14,4 horas (puro)	HSAO supera aceites basados en planta naturales con los mismos aditivos
RPVOT	ASTM D2272	33 min (puro) 500 min (formulación preliminar.)	30 minutos (puro)	Aceite puro supera PAO puro; HSAO supera aceites basados en planta naturales con los mismos aditivos
Desgaste de 4 bolas	@ 40kg; no formulado	0,64 mm	0,60 mm	
Corrosión de tira de cobre	ASTM D130, 24 h	1A	1A	
Punto de vertido	ASTM D6749/D97; no formulado	-19,5 °C (puro) -29 °C (c/ pp depresor)	-21 °C (puro)	Bajo punto de vertido con alta estabilidad oxidativa
Punto de turbidez	ASTM D7683/D2500	-14 °C	-18 °C	
Punto de ignición	D92 Cleveland Open Cup	315 °C	330 °C	Supera aceites minerales
Viscosidad	Viscosidad (D445) a 40 °C	41,6 cSt	38,6 cSt	
Índice de viscosidad	Índice de viscosidad (D445)	196	202	
VOC	ASTM E1868-10	0,37% (cerca de cero)	nm	Supera aceites minerales
Biodegradabilidad	OECD 301 B	Biodegradación definitiva: 96% degradación en día 28	Biodegradación definitiva: 94% degradación en día 28	Supera aceites minerales

Figura 19

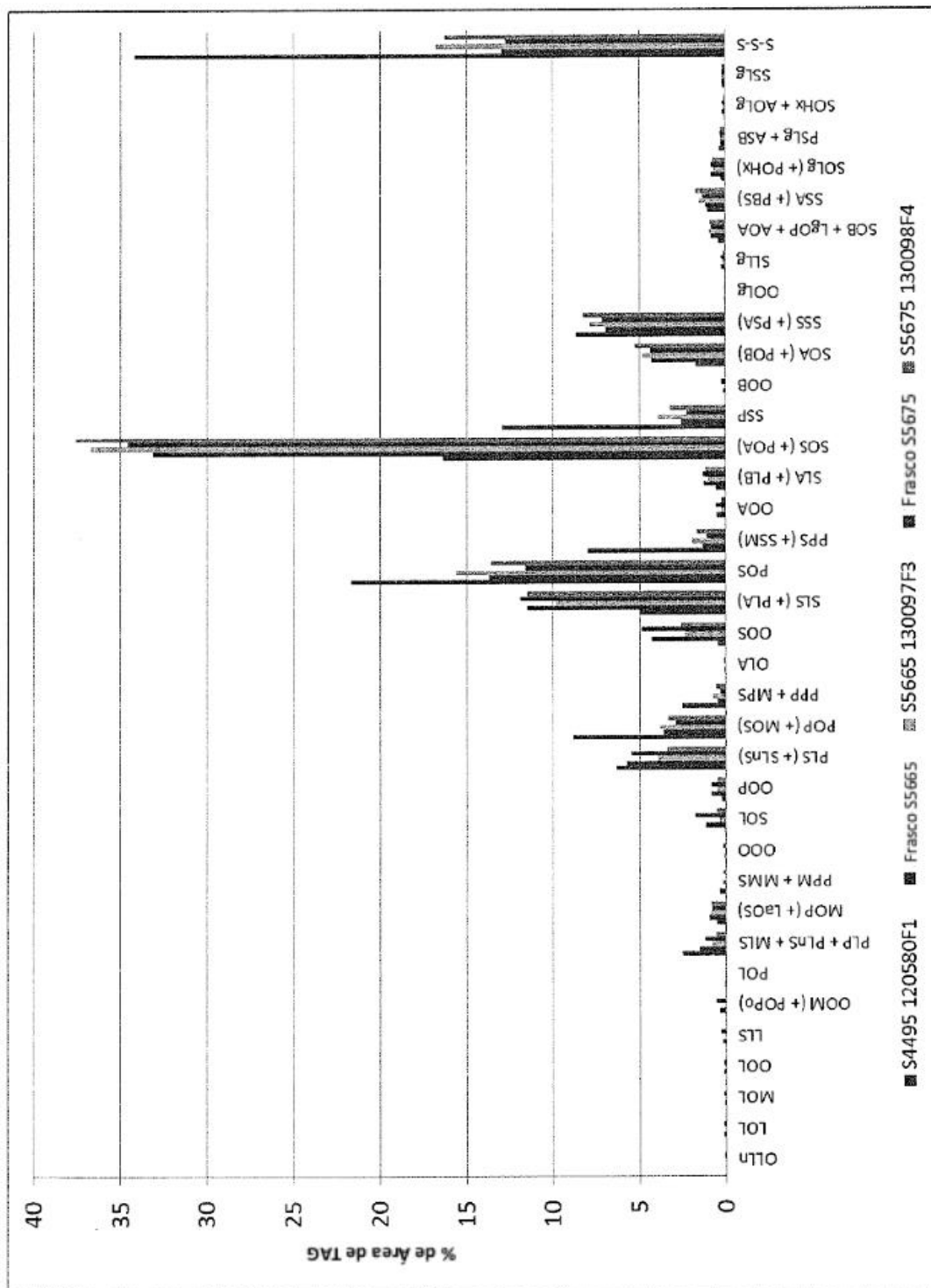


Figura 20

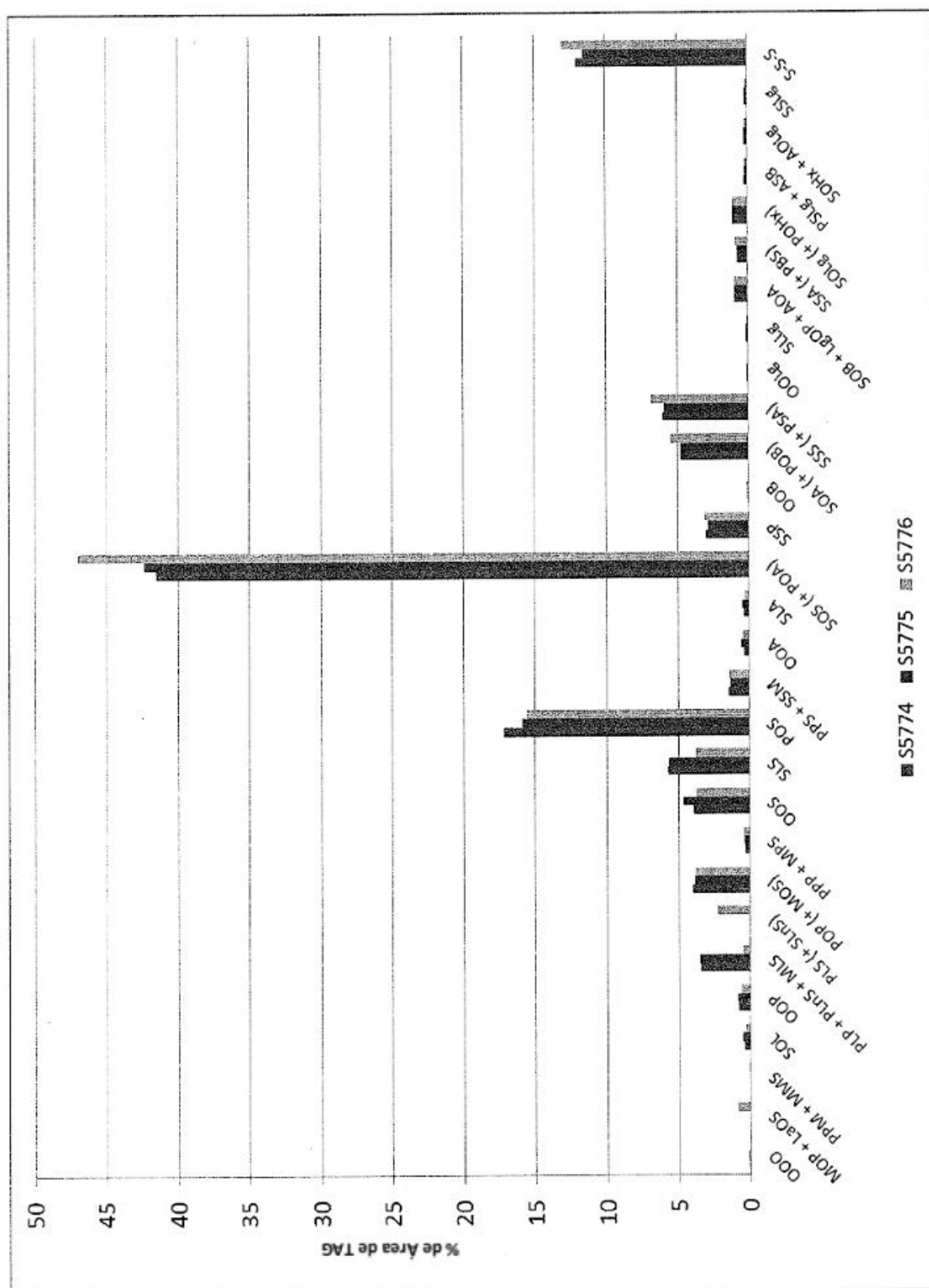
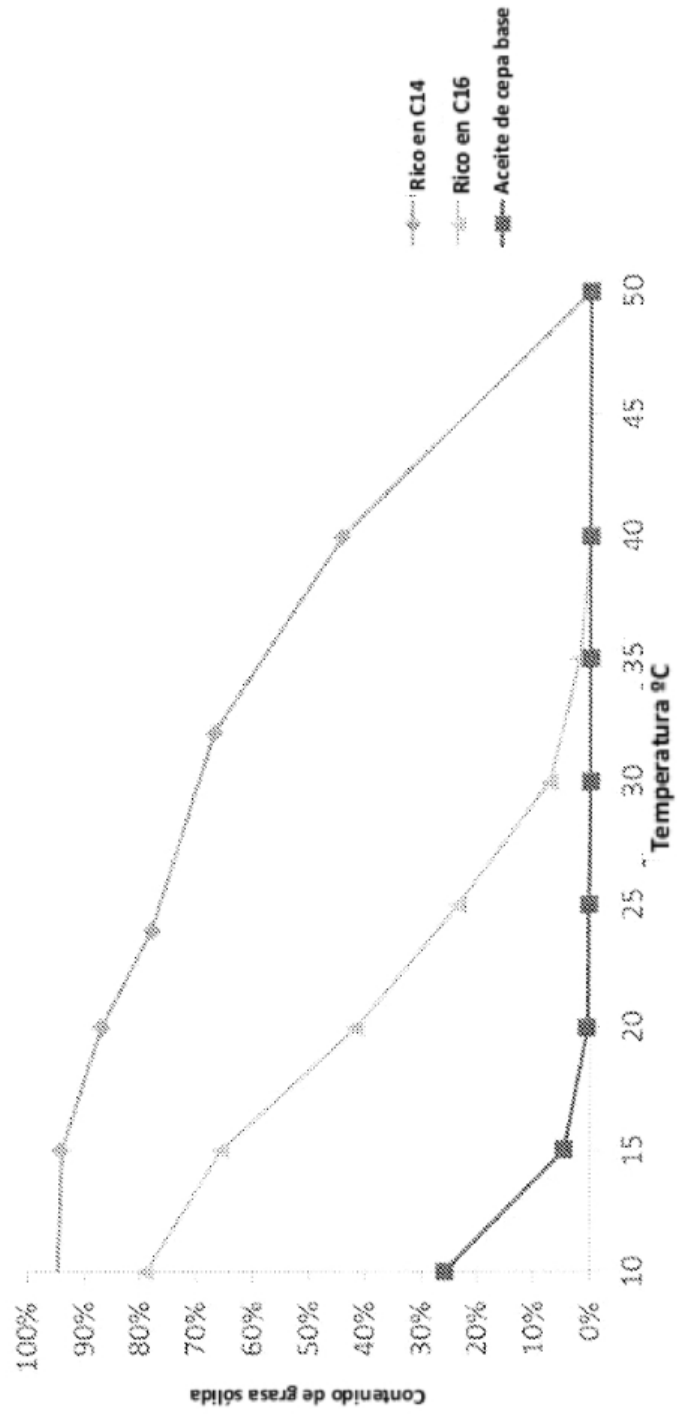


Figura 21

**LONGITUD DE CADENA: AMPLIO RANGO DE PERFILES DE FUSIÓN ACCESIBLE**



**Figura 22**

[illegible]

### Figura 23