

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 909 143**

51 Int. Cl.:

C11B 1/02 (2006.01)

C12P 7/64 (2006.01)

H01B 3/22 (2006.01)

H01F 27/12 (2006.01)

C12N 9/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.11.2011 E 18212337 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.12.2021 EP 3521408**

54 Título: **Microbios de *Chlorella* o *Prototheca* modificados genéticamente y aceite producido a partir de estos**

30 Prioridad:

13.10.2011 US 201161546932 P

10.08.2011 US 201161522231 P

02.02.2011 US 201161438966 P

03.11.2010 US 40990210 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.05.2022

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**FRANKLIN, SCOTT;
LU, WENHUA;
RAKITSKY, WALTER;
RODRIGUEZ, FELIPE ARANA;
RUDENKO, GEORGE;
WEE, JANICE y
ZHAO, XINHUA**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 909 143 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

Microbios de *Chlorella* o *Prototheca* modificados genéticamente y aceite producido a partir de estos

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a la producción de aceites a partir de microorganismos.

10 ANTECEDENTES

[0002] Combustible fósil es un término general para los depósitos geológicos combustibles enterrados de materiales orgánicos, formados a partir de plantas y animales en descomposición que se han convertido en petróleo crudo, carbón, gas natural o aceites pesados por exposición al calor y a la presión en la corteza terrestre durante cientos de millones de años. Los combustibles fósiles son un recurso finito y no renovable.

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

[0004] En la publicación PCT n.º 2008/151149 se describen métodos y materiales para el cultivo de microalgas para la producción de aceite, la extracción de aceite microbiano y la producción de alimentos, aceite para alimentos, combustibles y otros productos oleoquímicos a partir del aceite producido por microbios oleaginosos.

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

[0006] El aceite de origen biológico, en particular el aceite de soja con alto contenido de ácido oleico, se ha utilizado como fluido dieléctrico en transformadores herméticos desde la década de 1990 (véase Srivastava (2009) Int'l J Computer Electrical Eng, v. 1(2) págs. 212-216). Los fluidos dieléctricos de origen biológico actuales son triacilglicerol (TAG) de alto contenido de ácido oleico purificados con aditivos incorporados (véase la patente de EE. UU. n.º 6,274,067 y la patente de EE. UU. n.º 8,043,0607). Por ejemplo, los principales beneficios del fluido dieléctrico de aceite de soja con alto contenido de ácido oleico en comparación con el fluido dieléctrico a base de aceite mineral son (i) un mayor punto de inflamación (2x), (ii) una mayor vida útil del transformador (4-8x) y (iii) un menor coste en remediar vertidos debido a la alta biodegradabilidad del aceite de origen biológico (>3x) y su menor toxicidad (véase Schneider (2006) J Sci Food Agric, v. 86 págs.: 1769-1780). En WO2010/063031 describe un método para producir un aceite, que comprende cultivar *Prototheca* que contiene un gen exógeno y aislar los lípidos de esta. En WO2011/008565 se describe un método para producir un producto de ácido graso, que comprende cultivar, por ejemplo, *Chlorella* o *Prototheca* que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica acil-ACP tioesterasa exógena. En WO2010/120939 se describe aceite microbiano de *Chlorella* o *Prototheca* que contiene al menos un 60 % de ácido graso C18:1.

[0007] Las principales desventajas de los aceites de origen biológico en comparación con los aceites de origen mineral son la inestabilidad oxidativa de los aceites de origen biológico, el mayor coste de la adquisición de aceites de origen biológico y la transición de los equipos de aceites de origen mineral a aceites de origen biológico (véase Schneider (2006), *supra*). Aunque los fluidos dieléctricos de origen biológico ocupan una parte importante del mercado de fluidos dieléctricos, los fluidos dieléctricos de aceite mineral dominan el mercado en la actualidad. Otra desventaja significativa es el coste de producción de estos aceites a base de soja y su desviación de una importante fuente de alimentos hacia aplicaciones no alimentarias.

50 RESUMEN

[0008] La invención está definida por el objeto de las reivindicaciones. En algunas formas de realización, la presente invención proporciona un microbio de *Chlorella* o *Prototheca* modificado genéticamente para eliminar o regular a la baja un gen endógeno de acil-ACP tioesterasa. En una forma de realización preferida, el microbio se manipula para alterar una acil-ACP tioesterasa endógena. En una forma de realización preferida, la acil-ACP tioesterasa endógena se elimina mediante recombinación homóloga. En una forma de realización preferida, el microbio se manipula para que exprese un ARN inhibidor que se dirige a una acil-ACP tioesterasa endógena. En una forma de realización preferida, el microbio comprende además uno o más genes exógenos que son expresados por la célula. En una forma de realización preferida, el gen exógeno codifica una sacarasa, una acil-ACP tioesterasa o una desaturasa. En una forma de realización preferida, los genes exógenos codifican: una sacarasa; una acil-ACP tioesterasa; o una

sacarasa y una acil-ACP tioesterasa. En una forma de realización preferida, el microbio es *Prototheca moriformis* o *Chlorella protothecoides*. Más preferiblemente, el microbio es *Prototheca moriformis*.

[0009] En algunas formas de realización, la invención proporciona un método para producir un aceite microbiano, donde el método comprende: a) cultivar un microbio como se ha definido anteriormente; y b) separar el aceite del microbio. En una forma de realización preferida, el método incluye además el paso de: c) someter el aceite a refinado, blanqueo, desodorización o desgomado para producir aceite microbiano RBD. En una forma de realización preferida, el método comprende además añadir al aceite microbiano un antioxidante, un desactivador de iones metálicos, un inhibidor de la corrosión, un desemulsionante, un aditivo antidesgaste, un inhibidor del punto de fluidez o un compuesto antihidrólisis.

[0010] En determinadas formas de realización, la invención proporciona un aceite producido mediante un método como se ha definido anteriormente, en el que el aceite comprende menos del 7,5 % de C18:2 y en el que: i) el número de copias del gen exógeno es superior a 2; ii) el gen exógeno es el gen de tioesterasa FatB2 de *Cuphea wrightii*; y iii) el microbio es *Prototheca moriformis*.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0011]

Figura 1. Perfil de enfriamiento típico para el fraccionamiento de aceite RBD (Tf = temperatura de filtración).
Figura 2. Perfil de enfriamiento típico para el fraccionamiento de oleína de algas (Tf = temperatura de filtración).
Figura 3. Efecto de VPL 10-310 en el punto de fluidez del aceite de algas y aceites fraccionados. "Aceite desodorizado" es aceite RBD; "oleína" es oleína # 1; "súper oleína" es súper oleína #1".

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0012] La presente invención surge, en parte, del descubrimiento de que *Prototheca* y otros microorganismos oleaginosos presentan, en determinadas formas de realización, propiedades inesperadamente ventajosas para la producción de fluidos dieléctricos, entre otras aplicaciones, tales como lubricantes biodegradables, especialmente aceites de motor y fluidos hidráulicos, que anteriormente estaban hechos principalmente a base de aceites minerales. Los lubricantes a base de aceite microbiano se pueden usar para reemplazar los lubricantes de petróleo en espadas de motosierra, lodos y aceites de perforación, fluidos puros para trabajar metales, lubricantes para la industria alimentaria, aceites para engranajes abiertos, grasas biodegradables, fluidos hidráulicos, aceites marinos y lubricantes para motores fuera de borda, aceites para bombas de agua y subterráneas, lubricantes para raíles, lubricantes para amortiguadores, aceites para tractores, lubricantes para equipos agrícolas, aceites para ascensores, aceites para desmoldeo, lubricantes para motores de dos tiempos y otros lubricantes.

[0013] La presente invención surge también, en parte, del descubrimiento de procesos de modificación de aceites microbianos para reducir su punto de fluidez. La transesterificación de lípidos produce ésteres de ácidos grasos de cadena larga. Se pueden adaptar otros procesos enzimáticos y químicos para producir ácidos grasos, aldehídos, alcoholes, alcanos y alquenos. En algunas aplicaciones, se producen compuestos de hidrocarburos útiles en fluidos dieléctricos.

[0014] Esta descripción detallada se divide en secciones para la comodidad del lector. En la sección I se proporcionan definiciones de los términos utilizados en este documento. En la sección II se proporciona una descripción de las condiciones de cultivo útiles en las formas de realización de los métodos de la invención. En la sección III se proporciona una descripción de los métodos y materiales de ingeniería genética. En la sección IV se proporciona una descripción de la ingeniería genética de microbios para permitir la utilización de sacarosa, con referencia específica a las microalgas, como por ejemplo *Prototheca*. En la sección V se proporciona una descripción de la ingeniería genética para modificar la biosíntesis de lípidos. En la sección VI se describen métodos para fabricar aceites microbianos de formas de realización de la invención y productos derivados de estos, tales como fluidos dieléctricos. En la sección VII se describen ejemplos que ilustran las diversas formas de realización de la invención.

I. DEFINICIONES

[0015] A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el significado comúnmente entendido por una persona experta en la materia a la que pertenece esta invención. Las siguientes referencias proporcionan a la persona experta una definición general de muchos de los términos utilizados en esta invención: Singleton y col., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5th Ed.,

R. Rieger y col. (eds.), Springer Verlag (1991); y Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991). Tal como se usan en este documento, los siguientes términos tienen los significados que se les atribuyen a menos que se especifique lo contrario.

5 [0016] "Activo en las microalgas" se refiere a un ácido nucleico que es funcional en las microalgas. Por ejemplo, de un promotor que se ha utilizado para activar un gen de resistencia a los antibióticos para dotar de resistencia a los antibióticos a una microalga transgénica, se dice que es activo en las microalgas.

10 [0017] La "proteína transportadora de acilo" o "ACP" es una proteína que se une a una cadena de acilo en crecimiento durante la síntesis de ácidos grasos como un tioéster en el tiol distal del resto 4'-fosfopanteteína y comprende un componente del complejo de la ácido graso sintasa.

15 [0018] "Molécula de acil-CoA" o "acil-CoA" es una molécula que comprende un resto acilo unido covalentemente a la coenzima A a través de un enlace tioéster en el tiol distal del resto 4'-fosfopanteteína de la coenzima A.

20 [0019] "Antioxidante" es una molécula que es capaz de inhibir la oxidación de otras moléculas. Los antioxidantes se suelen añadir a los productos industriales. Un uso común es como estabilizadores en combustibles y lubricantes para evitar la oxidación, y en gasolinas para evitar la polimerización que conduce a la formación de residuos que ensucian el motor. También se usan mucho para evitar la degradación oxidativa de polímeros como cauchos, plásticos y adhesivos que provoca una pérdida de resistencia y flexibilidad en estos materiales.

25 [0020] "Compuesto antihidrólisis" es una molécula que inhibe la descomposición de un compuesto químico por reacción con el agua. Las carbodiimidas, por ejemplo, se pueden emplear como compuestos antihidrólisis. Los compuestos antihidrólisis están disponibles en el mercado, por ejemplo, en SpecialChem, entre otros.

30 [0021] El "aditivo antidesgaste" es un aditivo para un fluido (por ejemplo, un aceite lubricante) que da como resultado una vida útil más prolongada de la máquina debido a una mayor resistencia al desgaste y al gripado de los componentes. Los aditivos antidesgaste evitan el contacto directo de metal con metal entre las piezas de la máquina cuando desaparece la película de aceite. Por lo general, el aditivo reacciona con el metal en la superficie de la pieza y forma una película que puede deslizarse sobre la superficie de fricción. Los aditivos antidesgaste suelen contener compuestos de zinc y fósforo. Los ejemplos de aditivos antidesgaste incluyen ditiófosfato de zinc (ZDP), dialquilditiófosfato de zinc (ZDDP, que también actúa como inhibidor de la corrosión y antioxidante), fosfato de tricresilo (TCP, utilizado para operaciones a alta temperatura), halocarbonos (parafinas cloradas, para operaciones con presión extrema), monooleato de glicerol, ácido esteárico (que se adhiere a las superficies a través de un proceso de adsorción reversible por debajo de 150 °C, útil para condiciones de contacto moderado).

40 [0022] "Porcentaje de área" se refiere al área de los picos observados utilizando los métodos de detección FAME GC/FID en los que cada ácido graso de la muestra se convierte en un éster metílico de ácido graso (FAME) antes de la detección. Por ejemplo, se observa un pico separado para un ácido graso de 14 átomos de carbono sin instauración (C14:0) en comparación con cualquier otro ácido graso como C14:1. El área del pico para cada clase de FAME es directamente proporcional a su composición porcentual en la mezcla y se calcula en función de la suma de todos los picos presentes en la muestra (es decir, [área bajo el pico específico/área total de todos los picos medidos] X 100). Cuando se hace referencia a los perfiles de lípidos (ácidos grasos) de los aceites y las células descritos en el presente documento, "al menos 4 % C8-C14" significa que al menos el 4 % de los ácidos grasos totales de la célula o de la composición de glicerolípidos extraída tienen una longitud de cadena que incluye 8, 10, 12 o 14 átomos de carbono.

[0023] "Axénico" se refiere a un cultivo de un organismo sin contaminación por otros organismos vivos.

50 [0024] "Biodiésel" es un éster alquílico de ácido graso producido de forma biológica que es apto para el uso como combustible en un motor diésel.

55 [0025] "Biomasa" es material producido por crecimiento y/o propagación de células. La biomasa puede contener células y/o contenidos intracelulares, así como material extracelular, incluidos, entre otros, compuestos secretados por una célula.

[0026] "Biorreactor" es un recinto o recinto parcial en el que se cultivan células, opcionalmente en suspensión.

60 [0027] La "tensión de ruptura" de un fluido dieléctrico es el voltaje al cual el fluido dieléctrico pierde sus propiedades aislantes.

- 5 [0028] "Catalizador" es un agente, como una molécula o un complejo macromolecular, capaz de facilitar o propiciar una reacción química de un reactivo a un producto sin convertirse en parte del producto. Un catalizador aumenta la velocidad de una reacción, después de lo cual, el catalizador puede actuar sobre otro reactivo para formar el producto. Un catalizador reduce por lo general la energía de activación total requerida para la reacción, de modo que avanza más rápido o a una temperatura más baja. Por lo tanto, se puede alcanzar más rápidamente un equilibrio de reacción. Entre los ejemplos de catalizadores se incluyen las enzimas, que son catalizadores biológicos; el calor, que es un catalizador no biológico; y metales utilizados en los procesos de refinado de combustible fósil.
- 10 [0029] "Material celulósico" es el producto de la digestión de celulosa, incluidas la glucosa y la xilosa y, opcionalmente, compuestos adicionales tales como disacáridos, oligosacáridos, lignina, furfural y otros compuestos. Los ejemplos no excluyentes de fuentes de material celulósico incluyen bagazo de caña de azúcar, pulpa de remolacha azucarera, rastrojo de maíz, astillas de madera, serrín y pasto varilla.
- 15 [0030] "Cocultivo", y sus variantes como "cultivo conjunto" y "cofermentación", se refieren a la presencia de dos o más tipos de células en el mismo biorreactor. Ambos de los dos o más tipos de células pueden ser microorganismos, tales como microalgas, o pueden ser células de microalgas cultivadas con un tipo de célula diferente. Las condiciones de cultivo pueden ser aquellas que fomenten el crecimiento y/o la propagación de los dos o más tipos de células o aquellas que faciliten el crecimiento y/o la proliferación de una, o un subconjunto, de las dos o más células mientras se mantiene el crecimiento celular para el resto.
- 20 [0031] "Cofactor" es cualquier molécula, distinta del sustrato, necesaria para que una enzima lleve a cabo su actividad enzimática.
- 25 [0032] El "ADN complementario" o "ADNc" es una copia de ADN del ARNm, generalmente obtenido por transcripción inversa del ARN mensajero (ARNm) o amplificación (por ejemplo, a través de la reacción en cadena de la polimerasa ("PCR")).
- 30 [0033] "Inhibidor de la corrosión" es una molécula que, cuando se añade a un fluido, disminuye la velocidad de corrosión de un metal o una aleación en contacto con el fluido.
- 35 [0034] "Cultivado", y sus variantes como "fermentado", se refieren al fomento intencional del crecimiento (aumentos del tamaño celular, del contenido celular y/o de la actividad celular) y/o propagación (aumentos del número de células a través de la mitosis) de una o más células mediante el uso de condiciones seleccionadas y/o controladas. La combinación de crecimiento y propagación puede denominarse proliferación. Entre los ejemplos de condiciones seleccionadas y/o controladas se incluyen el uso de un medio definido (con características conocidas como pH, fuerza iónica y fuente de carbono), temperatura especificada, tensión de oxígeno, niveles de dióxido de carbono y crecimiento en un biorreactor. Cultivar no se refiere al crecimiento o propagación de microorganismos en la naturaleza o de otro modo sin intervención humana; por ejemplo, el crecimiento natural de un organismo que finalmente se fosiliza para producir crudo geológico no es un cultivo.
- 40 [0035] La "citólisis" es la lisis de células en un ambiente hipotónico. La citólisis es causada por una ósmosis excesiva, o movimiento de agua, hacia el interior de una célula (hiperhidratación). La célula no puede soportar la presión osmótica del agua en su interior, por lo que explota.
- 45 [0036] La "harina deslipidada" y la "biomasa microbiana deslipidada" es la biomasa microbiana después de que el aceite (incluidos los lípidos) se haya extraído o aislado de ella, ya sea mediante el uso de extracción mecánica (es decir, ejercida por una prensa extrusora) o con disolventes, o ambas. La harina deslipidada tiene una cantidad reducida de aceite/lípidos en comparación con antes de la extracción o el aislamiento de aceite/lípidos de la biomasa microbiana, pero contiene algo de aceite/lípido residual.
- 50 [0037] "Desemulsionante" es una molécula que rompe las emulsiones (generalmente emulsiones líquido-líquido) o evita que se formen. Los desemulsionantes se basan típicamente en las siguientes químicas: resinas de fenol-formaldehído catalizadas por ácido, resinas de fenol-formaldehído catalizadas por base, poliaminas, diepóxidos, polioles. Estas moléculas suelen estar etoxiladas (y/o propoxiladas) para proporcionar el grado deseado de solubilidad en agua/aceite. La adición de óxido de etileno aumenta la solubilidad en agua, mientras que el óxido de propileno la disminuye. Las formulaciones desemulsionantes disponibles en el mercado suelen ser una mezcla de dos a cuatro compuestos químicos diferentes, en disolvente(s) portador(es) como xileno, nafta aromática pesada (HAN), isopropanol, metanol, 2-etilhexanol o diésel.
- 55 [0038] "Dieléctrico" o un "fluido dieléctrico" es un fluido que no tiene conductividad, o que tiene un nivel muy bajo de conductividad, de una corriente eléctrica en circunstancias normales (o en las circunstancias de uso previstas). Los

fluidos dieléctricos se utilizan para el aislamiento eléctrico, la refrigeración y la lubricación, por ejemplo, en transformadores y otros dispositivos eléctricos. Entre los dispositivos eléctricos que utilizan fluidos dieléctricos se incluyen los transformadores de potencia y distribución, disyuntores, condensadores, interruptores, máquinas de rayos X y cables aislantes.

5 [0039] La "rigidez dieléctrica" de un material (por ejemplo, un aislante) es el voltaje máximo requerido para producir una ruptura dieléctrica, esto es, un fallo de sus propiedades aislantes, expresado en voltios por unidad de espesor. La rigidez dieléctrica de un material se puede determinar según los métodos estándar, por ejemplo, los métodos de prueba ASTM D1816, D877, D3300, D117, D2413, D6180, D6181 o D1310.

10 [0040] "Vector de expresión" o "construcción de expresión" o "plásmido" o "construcción de ADN recombinante" se refiere a un ácido nucleico que se ha generado mediante la intervención humana, incluyendo por medios recombinantes o síntesis química directa, con una serie de elementos de ácido nucleico especificados que permiten la transcripción y/o traducción de un ácido nucleico concreto en una célula hospedadora. El vector de expresión puede formar parte de un plásmido, virus o fragmento de ácido nucleico. Típicamente, el vector de expresión incluye un ácido nucleico que se va a transcribir unido operativamente a un promotor.

15 [0041] "Gen exógeno" es un ácido nucleico que codifica la expresión de un ARN y/o una proteína que se ha introducido ("transformado") en una célula, y también se denomina "transgén". Una célula transformada puede denominarse célula recombinante, en la que pueden introducirse genes exógenos adicionales. El gen exógeno puede ser de una especie diferente (y, por tanto, heterólogo), o de la misma especie (y, por tanto, homólogo), con respecto a la célula que se está transformando. Por lo tanto, un gen exógeno puede incluir un gen homólogo que ocupa una ubicación diferente en el genoma de la célula o que está bajo un 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 plásmido) o como una molécula episomal.

20 [0042] "Proporcionado exógenamente" se refiere a una molécula proporcionada al medio de cultivo de un cultivo celular.

30 [0043] El "prensado con extrusión" es un método mecánico para extraer aceite de materias primas como la soja y la colza. Una prensa extrusora es una máquina de tipo tornillo, que presiona el material a través de una cavidad similar a un barril enjaulado. Las materias primas entran por un lado de la prensa y la torta prensada sale por el otro lado mientras el aceite se filtra entre las barras de la jaula y se recoge. La máquina utiliza la fricción y la presión continua de los tornillos para mover y comprimir la materia prima. El aceite se filtra a través de pequeñas aberturas que no permiten el paso de sólidos. A medida que se presiona la materia prima, la fricción generalmente hace que se caliente.

35 [0044] "Ácido graso" es un ácido carboxílico con una cola (cadena) alifática larga. La porción alifática del ácido graso puede estar completamente saturada (sin enlace(s) doble(s)) o puede estar insaturada en una o más porciones de la molécula. La mayoría de los ácidos grasos naturales tienen una cadena con un número par de átomos de carbono, de 4 a 28. Los ácidos grasos pueden ser componentes de triglicéridos u otros lípidos, por ejemplo, fosfolípidos, esfingolípidos. Los ácidos grasos se pueden caracterizar por "números de lípidos". Los números de lípidos toman la forma C:D, donde C es el número de átomos de carbono del ácido graso y D es el número de enlaces dobles del ácido graso. En consecuencia, "C18:1" se refiere a un ácido graso con 18 carbonos y 1 enlace doble, mientras que "C18:2" se refiere a un ácido graso con 18 carbonos y 2 enlaces dobles.

40 [0045] La "acil-ACP tioesterasa" es una enzima que cataliza la escisión de un ácido graso de una proteína transportadora de acilo (ACP) durante la síntesis de lípidos.

50 [0046] La "acil-CoA/aldehído reductasa" es una enzima que cataliza la reducción de una molécula de acil-CoA a un alcohol primario.

[0047] La "acil-CoA reductasa" es una enzima que cataliza la reducción de una molécula de acil-CoA a un aldehído.

55 [0048] La "aldehído graso descarboxilasa" es una enzima que cataliza la conversión de un aldehído graso en un alcano.

[0049] La "aldehído graso reductasa" es una enzima que cataliza la reducción de un aldehído a un alcohol primario.

[0050] El punto de inflamación de un material es la temperatura a la que continuará ardiendo durante al menos 5 segundos después de la ignición por una llama abierta. El punto de inflamación se puede determinar según métodos estándar, por ejemplo, métodos de prueba ASTM D92 o D1310.

5 [0051] El "punto de inflamación" es la temperatura más baja a la que un material puede vaporizarse para formar una mezcla inflamable en el aire. En el punto de inflamación, el material puede encenderse, pero es posible que los vapores producidos durante la ignición no se produzcan a una velocidad suficiente para sostener la combustión. El punto de inflamación se puede determinar según métodos estándar, por ejemplo, métodos de prueba ASTM D3278, D3828, D56 o D93.

10 [0052] "Fuente de carbono fijo" es una molécula o moléculas que contienen carbono, normalmente una molécula orgánica, que está presente a temperatura y presión ambiente en forma sólida o líquida en un medio de cultivo y que puede ser utilizada por un microorganismo que se cultiva en este.

15 [0053] "Heterótrofo", en lo que respecta a las condiciones de cultivo, es un cultivo en ausencia sustancial de luz mientras se utiliza o metaboliza una fuente de carbono fijo.

[0054] "Homogeneizado" es biomasa que se ha disgregado físicamente.

20 [0055] "Fluido hidráulico" es el fluido que sirve como medio de transmisión de potencia en un sistema hidráulico.

[0056] "Hidrocarburo" es una molécula que contiene únicamente átomos de hidrógeno y de carbono en la que los átomos de carbono están unidos covalentemente para formar una cadena lineal, ramificada, cíclica o parcialmente cíclica a la que están unidos los átomos de hidrógeno. La estructura molecular de los compuestos de hidrocarburos varía desde la más simple, en forma de metano (CH₄), que es un componente del gas natural, hasta las muy pesadas y muy complejas, como algunas moléculas como los asfaltenos que se encuentran en el petróleo crudo, el petróleo y los betunes. Los hidrocarburos pueden estar en forma gaseosa, líquida o sólida, o cualquier combinación de estas formas, y pueden tener uno o más enlaces dobles o triples entre átomos de carbono adyacentes en cadena principal. Por consiguiente, el término incluye parafina, lípidos, alcanos y alquenos lineales, ramificados, cíclicos o parcialmente cíclicos. Entre los ejemplos se incluyen propano, butano, pentano, hexano, octano y escualeno.

25

30

[0057] "Relación hidrógeno:carbono" es la relación de átomos de hidrógeno a átomos de carbono en una molécula sobre una base de átomo a átomo. La relación puede usarse para referirse al número de átomos de carbono e hidrógeno de una molécula de hidrocarburo. Por ejemplo, el hidrocarburo con la relación más alta es el metano CH₄ (4:1).

35

[0058] "Fracción hidrófoba" es la porción, o fracción, de un material que es más soluble en una fase hidrófoba en comparación con una fase acuosa. Una fracción hidrófoba es sustancialmente insoluble en agua y normalmente no polar.

40

[0059] "Aumentar la producción de lípidos" se refiere a un aumento en la productividad de lípidos de un cultivo microbiano mediante, por ejemplo, el aumento del peso en seco de las células por litro de cultivo, el aumento del porcentaje de células que constituyen lípidos o el aumento de la cantidad total de lípidos por litro de volumen de cultivo por unidad de tiempo.

45

[0060] "Promotor inducible" es un promotor que media la transcripción de un gen unido operativamente en respuesta a un estímulo particular.

[0061] El "aceite industrial" es un aceite que es útil en la industria. Los aceites industriales comunes incluyen lubricantes para espadas de motosierra, fluidos para trabajar metales, lubricantes de calidad alimentaria, aceites para engranajes, aceites marinos, lubricantes para motores, aceites para tractores, lubricantes para equipos agrícolas, aceites para ascensores, aceites para desmoldeo y similares. El "lubricante para espadas de motosierra" se utiliza para la lubricación externa de la espada y la cadena de las motosierras. Los "fluidos para trabajar metales" son fluidos que se usan para enfriar y/o lubricar el proceso de dar forma a una pieza de metal para convertirla en un objeto útil. Los "lubricantes de calidad alimentaria" son lubricantes aceptables para su uso en equipos, aplicaciones y plantas de procesamiento de carne de res, carne de ave y otros alimentos. Los "aceites para engranajes" son aceites que son útiles para lubricar engranajes, por ejemplo, en transmisiones, cajas de transferencia y diferenciales en automóviles, camiones y otra maquinaria. Los "aceites marinos" son aceites que son útiles para lubricar las partes móviles de los equipos marinos. Los "lubricantes de motor" se utilizan para la lubricación de varios motores de combustión interna. Si bien la función principal es lubricar las piezas móviles, los lubricantes para motores también pueden limpiar, inhibir la corrosión, mejorar la estanqueidad y enfriar el motor al alejar el calor de las piezas móviles.

50

55

60

Los "aceites para tractores" son aceites útiles para lubricar las partes móviles de los tractores. Los "lubricantes para equipos agrícolas" son lubricantes que son útiles para lubricar las partes móviles de los equipos agrícolas. Los "aceites para ascensores" son aceites utilizados como fluido hidráulico en ascensores hidráulicos. Los "aceites de desmoldeo" son aceites útiles en la producción de artículos formados usando un molde. Los aceites de desmoldeo facilitan el desmoldeo del artículo formado y pueden tener características de acondicionamiento superficial que proporcionan un acabado superficial deseado.

[0062] "En unión operativa" es una unión funcional entre dos secuencias de ácido nucleico, como una secuencia de control (típicamente un promotor) y la secuencia enlazada (típicamente una secuencia que codifica una proteína, también denominada secuencia codificante). Un promotor está en unión operativa con un gen exógeno si puede mediar en la transcripción del gen.

[0063] "In situ" significa "en su lugar" o "en su posición original". El "índice de yodo" (o "número de yodo") es una medida del grado de insaturación de un aceite. Es la masa de yodo que consumen los enlaces insaturados de un aceite. Por ejemplo, un aceite con un índice de yodo de 50 es un aceite en el que 100 gramos de aceite consumirían 50 gramos de yodo. Los valores de yodo se determinan de manera rutinaria en la técnica. Los métodos estándar para determinar los valores de yodo incluyen ASTM D5768-02 (2006) y DIN 53241.

[0064] La "concentración limitante de un nutriente" es una concentración de un compuesto en un cultivo que limita la propagación de un organismo cultivado. Una "concentración no limitante de un nutriente" es una concentración que permite la máxima propagación durante un período de cultivo dado. Por lo tanto, el número de células producidas durante un período de cultivo dado es menor en presencia de una concentración limitante de un nutriente que cuando el nutriente no es limitante. Se dice que un nutriente está "en exceso" en un cultivo cuando el nutriente está presente en una concentración mayor que la que permite la máxima propagación.

[0065] La "lipasa" es una enzima soluble en agua que cataliza la hidrólisis de enlaces éster en sustratos lipídicos insolubles en agua. Las lipasas catalizan la hidrólisis de los lípidos en gliceroles y ácidos grasos.

[0066] Una "enzima que modifica los lípidos" se refiere a una enzima que altera la estructura covalente de un lípido. Entre los ejemplos de enzimas que modifican los lípidos se incluyen una lipasa, una acil-ACP tioesterasa, una desaturasa, incluyendo una estearoil-ACP desaturasa (SAD) y una acilo graso desaturasa (FAD), y una aldehído graso descarboxilasa.

[0067] "Enzima de la ruta de los lípidos" es cualquier enzima que desempeñe una función en el metabolismo de los lípidos, es decir, la síntesis, modificación o degradación de los lípidos, y cualquier proteína que modifique químicamente los lípidos, así como las proteínas transportadoras.

[0068] "Lípido" o "lípidos" son una clase de moléculas que son solubles en disolventes no polares (como el éter y el cloroformo) y son relativa o completamente insolubles en agua. Las moléculas de lípidos tienen estas propiedades porque consisten en gran parte en largas colas hidrocarbonadas que son de naturaleza hidrófoba. Entre los ejemplos de lípidos se incluyen los ácidos grasos (saturados e insaturados); glicéridos o glicerolípidos (tales como monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos o grasas neutras y fosfoglicéridos o glicerofosfolípidos); no glicéridos (esfingolípidos, lípidos de esteroides incluyendo colesterol y hormonas esteroides, lípidos de prenol incluyendo terpenoides, alcoholes grasos, ceras y policétidos); y derivados de lípidos complejos (lípidos unidos a azúcares, o glicolípidos, y lípidos unidos a proteínas). Las "grasas" son un subgrupo de lípidos llamados "triacilglicéridos".

[0069] "Lubricante" es una sustancia capaz de reducir la fricción, el calor y/o el desgaste cuando se introduce como una película entre superficies sólidas.

[0070] "Lisado" es una solución que contiene el contenido de las células lisadas.

[0071] "Lisar" o "lisis" es romper la membrana celular y, opcionalmente, la pared celular de un organismo biológico o una célula lo suficiente para liberar al menos algo de contenido intracelular.

[0072] "Desactivador de iones metálicos", también conocido como "desactivador de metales" o "agente desactivador de metales (MDA)", es un aditivo de combustible y/o aceite que se utiliza para estabilizar fluidos mediante la desactivación (normalmente mediante el secuestro) de iones metálicos. Los iones metálicos se pueden producir por la acción de ácidos naturales en el combustible y ácidos generados en lubricantes por procesos oxidativos con las partes metálicas de los sistemas.

[0073] "Microalga" es un organismo microbiano eucariota que contiene un cloroplasto o plástido y, opcionalmente, que es capaz de hacer la fotosíntesis, o un organismo microbiano procariota capaz de hacer la fotosíntesis. Las microalgas incluyen las fotoautótrofas obligadas, que no pueden metabolizar una fuente de carbono fijo como energía, así como las heterótrofas, que pueden vivir únicamente de una fuente de carbono fijo. Las microalgas incluyen organismos unicelulares que se separan de sus células hermanas poco después de la división celular, como *Chlamydomonas*, así como microbios como, por ejemplo, *Volvox*, que es un microbio fotosintético multicelular simple de dos tipos de células distintas. Las microalgas incluyen células como *Chlorella*, *Dunaliella*, y *Prototheca*. Las microalgas también incluyen otros organismos fotosintéticos microbianos en los que se da la adhesión célula-célula, como *Agmenellum*, *Anabaena*, y *Pyrobotrys*. "Microalgas" también se refiere a microorganismos heterótrofos obligados que han perdido la capacidad de realizar la fotosíntesis, como algunas especies de algas dinoflageladas y especies del género *Prototheca*.

[0074] "Microorganismo" y "microbio" son organismos microscópicos unicelulares.

[0075] "Coexpresado de manera natural", con referencia a dos proteínas o genes, significa que las proteínas o sus genes se coexpresan de manera natural en un tejido u organismo del que derivan, por ejemplo, porque los genes que codifican las dos proteínas están bajo el control de una secuencia reguladora común o porque se expresan en respuesta a un mismo estímulo.

[0076] "Aceite" se refiere a cualquier aceite de triacilglicéridos, producido por organismos, incluyendo levaduras oleaginosas, plantas y/o animales. "Aceite", a diferencia de "grasa", se refiere, a menos que se indique lo contrario, a lípidos que generalmente, pero no siempre, son líquidos a temperaturas y presiones ambiente ordinarias. Por ejemplo, "aceite" incluye aceites vegetales o de semillas derivados de plantas, incluidos, entre otros, un aceite derivado de aguacate, nueces de Brasil, caléndula, camelina, camelina sativa, canola, anacardo, ricino, manteca de cacao (también conocida como cacao, que es un aceite de triacilglicéridos derivado del grano de cacao que es sólido a temperaturas y presiones ambiente típicas), coco, café, copra, cilantro, maíz, semilla de algodón, cuphea, euforbia, avellana, cáñamo, jatrofa, jojoba, kenaf, linaza, altramuz, macadamia, semillas de mostaza, avena, oliva, adormidera, palma, palmiste, cacahuete, nuez pecán, semilla de calabaza, colza, arroz, cártamo, sésamo, soja, girasol y árbol de tung, así como combinaciones de estos. "Aceite microbiano" se refiere a un aceite derivado de un microbio.

[0077] "Levadura oleaginosa" significa una levadura que puede acumular de manera natural más del 20 % de su peso celular en seco en forma de lípidos y son del subreino de los hongos *Dikarya*. La levadura oleaginosa incluye, pero no se limita a, organismos tales como *Yarrowia lipolytica*, *Rhodotorula glutinis*, *Cryptococcus curvatus*, y *Lipomyces starkeyi*.

[0078] El "choque osmótico" es la ruptura de células en una solución después de una reducción repentina de la presión osmótica. A veces se induce un choque osmótico para liberar componentes celulares de tales células en una solución.

[0079] "Enzima degradante de polisacáridos" es cualquier enzima capaz de catalizar la hidrólisis, o la sacarificación, de cualquier polisacárido. Por ejemplo, las celulasas catalizan la hidrólisis de la celulosa.

[0080] Los "polisacáridos" o "glicanos" son carbohidratos formados por monosacáridos unidos por enlaces glucosídicos. La celulosa es un polisacárido que forma parte de algunas paredes celulares de las plantas. La celulosa se puede despolimerizar mediante enzimas para producir monosacáridos como xilosa y glucosa, así como disacáridos y oligosacáridos más grandes.

[0081] El "punto de fluidez" es la temperatura más baja a la que un líquido se verterá o fluirá en un conjunto específico de condiciones. Los estándares de punto de fluidez ejemplares incluyen ASTM D97-11, D5853-11 y D5949-10, pero se pueden emplear otros conocidos o desarrollados por los expertos en la técnica para realizar determinaciones de punto de fluidez en relación con los métodos descritos en este documento.

[0082] Los "depresores del punto de fluidez", o "PPD", son polímeros que controlan la formación de cristales de cera en aceites o lubricantes, lo que da como resultado un punto de fluidez más bajo y un mejor rendimiento del flujo a baja temperatura.

[0083] "Promotor" es una secuencia de control de ácido nucleico que dirige la transcripción de un ácido nucleico. Como se usa en este documento, un promotor incluye secuencias de ácido nucleico necesarias cerca del sitio de inicio de la transcripción, tal como, en el caso de un promotor de tipo polimerasa II, un elemento TATA. Un promotor también incluye opcionalmente elementos potenciadores o represores distales, que pueden ubicarse hasta varios miles de pares de bases desde el sitio de inicio de la transcripción.

[0084] "Recombinante" se refiere a 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. Por lo tanto, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula o que expresan genes nativos de manera diferente a como los expresa una célula no recombinante. Un "ácido nucleico recombinante" es un ácido nucleico formado originalmente *in vitro*, en general, mediante la manipulación del ácido nucleico, por ejemplo, utilizando polimerasas y endonucleasas, o que de otro modo se encuentra en una forma que no se da de manera natural en la naturaleza. Pueden producirse ácidos nucleicos recombinantes, por ejemplo, para colocar dos o más ácidos nucleicos en una unión operativa. Por lo tanto, un ácido nucleico aislado o un vector de expresión formado mediante la unión *in vitro* de moléculas de ADN que normalmente no están unidas en la naturaleza se considera recombinante. Una vez que se produce un ácido nucleico recombinante y se introduce en una célula u organismo hospedador, puede replicarse usando la maquinaria celular *in vivo* de la célula hospedadora; sin embargo, dichos ácidos nucleicos, una vez producidos de forma recombinante, aunque posteriormente se repliquen intracelularmente, todavía se consideran recombinantes. De manera similar, una "proteína recombinante" es una proteína elaborada utilizando técnicas recombinantes, es decir, mediante la expresión de un ácido nucleico recombinante.

[0085] El "aceite RBD" es un aceite que se ha sometido a refinado, blanqueo o desodorización.

[0086] El "diésel renovable" es una mezcla de alcanos (como C10:0, C12:0, C14:0, C16:0 y C18:0) producidos por hidrogenación y desoxigenación de lípidos.

[0087] La "sacarificación" es un proceso de conversión de biomasa, normalmente biomasa celulósica o lignocelulósica, en azúcares monoméricos, como glucosa y xilosa. Material celulósico o biomasa "sacarificado/a" o "despolimerizado/a" se refiere a material celulósico o biomasa que se ha convertido en azúcares monoméricos mediante sacarificación.

[0088] La "sonicación" es un proceso de alteración de materiales biológicos, como una célula, mediante el uso de energía de ondas sonoras.

[0089] "Especie de furfural" es 2-furancarboxaldehído o un derivado que conserva las mismas características estructurales básicas.

[0090] "Rastrojo" son los tallos secos y las hojas de un cultivo que quedan después de la cosecha de un grano.

[0091] El "gen de utilización de sacarosa" es un gen que, cuando se expresa, ayuda a la capacidad de una célula para utilizar sacarosa como fuente de energía. Las proteínas codificadas por un gen de utilización de sacarosa se denominan en la presente "enzimas de utilización de sacarosa" e incluyen transportadores de sacarosa, sacarosas y hexocinasas tales como glucocinasas y fructocinasas.

[0092] "Transformador" es un dispositivo que transfiere energía eléctrica de un circuito a otro a través de conductores acoplados de manera inductiva, típicamente las bobinas del transformador.

[0093] Los términos "preparación para el invierno" del aceite o "preparación del aceite para el invierno" se refieren a un proceso que incluye la eliminación de los componentes de mayor punto de fusión de un aceite y/o la adición de uno o más depresores del punto de fluidez.

II. CULTIVO Y CONDICIONES DE CULTIVO

[0094] En algunas formas de realización, la presente invención generalmente está relacionada con el cultivo de microbios oleaginosos, tales como microalgas recombinantes, incluyendo especies y cepas de *Chlorella* y *Prototheca*, para la producción de aceite microbiano (lípidos). Para comodidad del lector, esta sección se subdivide en subsecciones. En la subsección 1 se describen especies y cepas de *Prototheca* y cómo identificar nuevas especies y cepas de *Prototheca* y microalgas relacionadas por comparación de ADN genómico, así como otras microalgas, levaduras, hongos y bacterias útiles en los métodos descritos en este documento. En la subsección 2 se describen biorreactores útiles para el cultivo. En la subsección 3 se describen medios para el cultivo. En la subsección 4 se describe la producción de aceite (lípidos) según métodos de cultivo ilustrativos descritos en este documento. En la subsección 5 se describen los tipos de levadura oleaginosa adecuados para usar en los métodos descritos en este documento, las condiciones de cultivo para generar biomasa de levadura y los perfiles de lípidos y la composición química de la biomasa preparada según los métodos ilustrativos descritos en este documento.

1. Especies y cepas de Prototheca y otros microbios oleaginosos

- [0095] *Prototheca* es un microorganismo notable para su uso en la producción de lípidos, porque puede producir altas cantidades de lípidos, en particular lípidos adecuados para la producción de fluidos dieléctricos y otros lubricantes. El lípido producido por *Prototheca* tiene un mayor grado de saturación que el producido por otras microalgas. Es más, el lípido de *Prototheca* generalmente está libre de pigmento (niveles bajos o indetectables de clorofila y ciertos carotenoides) y, en cualquier caso, contiene mucho menos pigmento que los lípidos de otras microalgas. Además, las células de *Prototheca* recombinantes proporcionadas para su uso en los métodos descritos en el presente documento pueden usarse para producir lípidos con un mayor rendimiento y eficacia, y con un coste reducido, con respecto a la producción de lípidos a partir de otros microorganismos. Entre las especies y cepas ilustrativas de *Prototheca* para usar en los métodos descritos en este documento se incluyen *Prototheca wickerhamii*, *Prototheca stagnora* (incluida UTEX 327), *Prototheca portoricensis*, *Prototheca moriformis* (incluidas las cepas UTEX 1441, 1435), y *Prototheca zopfii*. Las especies del género *Prototheca* son heterótrofos obligados.
- [0096] Las especies de *Prototheca* para su uso en los métodos descritos en el presente documento pueden identificarse mediante la amplificación de algunas regiones concretas del genoma. Por ejemplo, la identificación de una determinada especie o cepa de *Prototheca* se puede lograr a través de la amplificación y secuenciación del ADN nuclear y/o de los cloroplastos usando cebadores y metodología usando cualquier región del genoma, por ejemplo usando los métodos descritos en Wu y col., Bot. Bull. Acad. Sin. (2001) 42:115-121 Identification of Chlorella spp. isolates using ribosomal DNA sequences. Los expertos en la técnica pueden utilizar métodos establecidos de análisis filogenético, como la amplificación y la secuenciación del espaciador transcrito interno ribosomal (ITS1 e ITS2 rDNA), ARNr 23S, ARNr 18S y otras regiones genómicas conservadas para identificar especies no solo de *Prototheca*, sino de otros organismos productores de hidrocarburos y lípidos con perfiles de lípidos y capacidad de producción similares. Para ver ejemplos de métodos de identificación y clasificación de algas, véase también, por ejemplo, Genetics, agosto de 2005; 170(4):1601-10 y RNA, abril de 2005; 11(4):361-4.
- [0097] Por lo tanto, la comparación de ADN genómico se puede usar para identificar especies adecuadas de microalgas para usar en los métodos descritos en este documento. Las regiones de ADN genómico conservado, tales como, entre otros, el ADN que codifica el ARNr 23S, pueden amplificarse a partir de especies de microalgas y compararse con secuencias de consenso para detectar especies de microalgas que estén relacionadas desde el punto de vista taxonómico con las microalgas preferidas utilizadas en los métodos descritos en el presente documento. A continuación, se muestran ejemplos de tales comparaciones de secuencias de ADN para especies dentro del género *Prototheca*. La comparación de ADN genómico también puede ser útil para identificar especies de microalgas que se han identificado erróneamente en una colección de cepas. A menudo, una colección de cepas identificará especies de microalgas en función de las características fenotípicas y morfológicas. El uso de estas características puede dar lugar a una categorización errónea de la especie o el género de una microalga. El uso de la comparación de ADN genómico puede ser un método mejor para clasificar las especies de microalgas en función de su relación filogenética.
- [0098] Las microalgas ilustrativas para su uso en los métodos descritos en el presente documento suelen tener secuencias de ADN genómico que codifican el ARNr 23S que tienen al menos un 99 %, al menos un 95 %, al menos un 90 % o al menos un 85 % de identidad de nucleótidos con al menos una de las secuencias enumeradas en la SEQ ID N.º 11-19.
- [0099] Para la comparación de secuencias para determinar el porcentaje de identidad de nucleótidos o aminoácidos, normalmente una secuencia actúa como secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de la subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencia. A continuación, el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidad de secuencia para la(s) secuencia(s) de prueba en relación con la secuencia de referencia, en función de los parámetros de programa designados.
- [0100] La alineación óptima de las secuencias para la comparación se puede realizar, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), por el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970)), por el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante inspección visual (véase en general Ausubel y col., *supra*).
- [0101] Otro ejemplo de un algoritmo adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia es el algoritmo BLAST, que se describe en Altschul y col., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990). El

programa informático para realizar análisis BLAST está disponible para el público a través del Centro Nacional para la Información Biotecnológica de EE. UU. (National Center for Biotechnology Information, en la dirección web www.ncbi.nlm.nih.gov). Este algoritmo implica identificar primero pares de secuencias de puntuación alta (HSP) mediante la identificación de palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que coinciden o satisfacen una puntuación de umbral T de valor positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se conoce como el umbral de puntuación de palabras adyacentes (Altschul y col., *supra.*). Estas coincidencias iniciales de palabras adyacentes actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largos que las contengan. Las coincidencias de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia hasta donde se puede aumentar la puntuación de alineación acumulada. Las puntuaciones acumulativas se calculan usando, para las secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de residuos coincidentes; siempre > 0) y N (puntuación de penalización para residuos coincidentes; siempre < 0). Para las secuencias de aminoácidos, se utiliza una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulativa. La extensión de las coincidencias de palabras en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineación acumulativa desciende en la cantidad X de su valor máximo alcanzado; la puntuación acumulativa llega a cero o menos debido a la acumulación de uno o más alineamientos de residuos de puntuación negativa; o se llega al final de cualquiera de las secuencias. Para identificar si un ácido nucleico o un polipéptido está dentro del alcance de la invención, son adecuados los parámetros predeterminados de los programas BLAST. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M=5, N=-4 y una comparación de ambas cadenas. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10 y la matriz de puntuación BLOSUM62. El programa TBLASTN (que usa la secuencia de proteínas para la secuencia de nucleótidos) usa por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una expectativa (E) de 10 y una matriz de puntuación BLOSUM 62. (véase Henikoff y Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989).

[0102] Además de calcular el porcentaje de identidad de secuencia, el algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin & Altschul, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993)). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual se produciría por casualidad una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de la suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de prueba con el ácido nucleico de referencia es menor que aproximadamente 0,1, más preferiblemente menor que aproximadamente 0,01 y, de la manera más preferible, menor que aproximadamente 0,001.

[0103] Se puede utilizar una amplia variedad de microbios oleaginosos además de *Prototheca* en los métodos descritos en el presente documento. Por ejemplo, *Chlorella*, que incluye pero no se limita a las cepas de la especie *protothecoides* de *Chlorella*, es una microalga excelente para usar en los métodos descritos en el presente documento. Las consideraciones que afectan la selección de microorganismos para su uso en los métodos descritos en este documento, además de la producción de lípidos o hidrocarburos adecuados para la producción de aceites, combustibles y sustancias oleoquímicas, pueden incluir uno o más de las siguientes: (1) alto contenido de lípidos como porcentaje de peso celular; (2) facilidad de crecimiento; (3) facilidad para la modificación por ingeniería genética; y (4) facilidad de procesamiento de biomasa. En formas de realización particulares, el microorganismo de tipo salvaje o modificado genéticamente produce células que tienen al menos un 40 %, al menos un 45 %, al menos un 50 %, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 % o al menos un 70 % o más de aceite microbiano (es decir, lípidos y ácidos grasos). Los organismos preferidos crecen (y se cultivan) de manera heterótrofa (en azúcares, en ausencia sustancial de luz). Las microalgas por lo general son microbios excelentes para usar en los métodos descritos en este documento. Los ejemplos de microalgas que se pueden usar para poner en práctica los métodos incluyen, entre otros, las siguientes algas enumeradas en la Tabla 1.

Tabla 1. Ejemplos de microalgas oleaginosas.

<p><i>Chlorella anitrata</i>, <i>Chlorella Antarctica</i>, <i>Chlorella aureoviridis</i>, <i>Chlorella candida</i>, <i>Chlorella capsulata</i>, <i>Chlorella denticata</i>, <i>Chlorella ellipsoidea</i>, <i>Chlorella emersonii</i>, <i>Chlorella fusca</i>, <i>Chlorella fusca var. vacuolata</i>, <i>Chlorella glucotropha</i>, <i>Chlorella infusionum</i>, <i>Chlorella infusionum var. actophila</i>, <i>Chlorella infusionum var. auxenophila</i>, <i>Chlorella kessleri</i>, <i>Chlorella lobophora</i> (cepa SAG 37.88), <i>Chlorella luteoviridis</i>, <i>Chlorella luteoviridis var. aureoviridis</i>, <i>Chlorella luteoviridis var. lutescens</i>, <i>Chlorella miniata</i>, <i>Chlorella minutissima</i>, <i>Chlorella mutabilis</i>, <i>Chlorella nocturna</i>, <i>Chlorella parva</i>, <i>Chlorella photophila</i>, <i>Chlorella pringsheimii</i>, <i>Chlorella protothecoides</i> (incluyendo cualquiera de las cepas UTEX 1806, 411, 264, 256, 255, 250, 249, 31, 29, 25, y cepas CCAP 211/17 y 211/8d), <i>Chlorella protothecoides var. acidicola</i>, <i>Chlorella regularis</i>, <i>Chlorella regularis var. minima</i>, <i>Chlorella regularis var. umbricata</i>, <i>Chlorella reisiigii</i>, <i>Chlorella saccharophila</i>, <i>Chlorella saccharophila var. ellipsoidea</i>, <i>Chlorella salina</i>, <i>Chlorella simplex</i>, <i>Chlorella sorokiniana</i>, <i>Chlorella sp.</i>, <i>Chlorella sphaerica</i>, <i>Chlorella stigmatophora</i>, <i>Chlorella vanniellii</i>, <i>Chlorella vulgaris</i>, <i>Chlorella vulgaris</i>, <i>Chlorella vulgaris f. tertia</i>, <i>Chlorella vulgaris var. autotrophica</i>, <i>Chlorella vulgaris</i></p>
--

var. viridis, Chlorella vulgaris var. vulgaris, Chlorella vulgaris var. vulgaris f. tertia, Chlorella vulgaris var. vulgaris f. viridis, Chlorella xanthella, Chlorella zofingiensis, Chlorella trebouxioides, Chlorella vulgaris, Prototheca wickerhamii, Prototheca stagnora, Prototheca portoricensis, Prototheca moriformis y Prototheca zopfii.

2. Biorreactor

5 [0104] Los microorganismos se cultivan tanto para fines de manipulación genética como para la producción de aceite
 10 microbiano (por ejemplo, hidrocarburos como lípidos, ácidos grasos, aldehídos, alcoholes y alcanos). El primer tipo
 de cultivo se lleva a cabo a pequeña escala e inicialmente, al menos, en condiciones en las que el microorganismo
 de partida pueda crecer. El cultivo con fines de producción de hidrocarburos normalmente se lleva a cabo a gran
 15 escala en un biorreactor (por ejemplo, en biorreactores de 10 000 l, 40 000 l, 100 000 l o más grandes). Las
 microalgas, incluyendo especies de *Prototheca*, así como los otros microbios oleaginosos descritos en este
 documento, se cultivan típicamente en los métodos descritos en este documento en medios líquidos dentro de un
 biorreactor. Normalmente, el biorreactor no permite la entrada de cantidades sustanciales de luz o de ninguna
 cantidad de luz. Toda(s) la(s) etapa(s) de cultivo del microbio oleaginoso, incluidas las microalgas, se puede(n)
 realizar en ausencia sustancial de luz.

15 [0105] El biorreactor o fermentador se utiliza para cultivar células de microalgas durante las diversas fases de su ciclo
 fisiológico. Los biorreactores ofrecen muchas ventajas para su uso en métodos de crecimiento y propagación
 heterótrofos. Las microalgas y otros microbios oleaginosos descritos en el presente documento normalmente se
 fermentan en líquido en grandes cantidades, como, por ejemplo, en cultivos en suspensión. Los biorreactores, como
 20 los fermentadores de acero, pueden albergar volúmenes de cultivo muy grandes (se pueden utilizar biorreactores de
 40 000 litros y de mayor capacidad). Los biorreactores también suelen permitir el control de las condiciones de
 cultivo, como la temperatura, el pH, la tensión de oxígeno y los niveles de dióxido de carbono. Por ejemplo, los
 biorreactores suelen ser configurables, por ejemplo, utilizando puertos conectados al sistema de conductos, para
 permitir que los componentes gaseosos, como oxígeno o nitrógeno, burbujeen a través de un cultivo líquido. Otros
 parámetros de cultivo, como el pH de los medios de cultivo, la identidad y concentración de elementos traza y otros
 25 componentes de los medios, también se pueden manipular con mayor facilidad usando un biorreactor.

[0106] Los biorreactores se pueden configurar para que los medios de cultivo fluyan a través del biorreactor durante
 todo el período de tiempo durante el cual las microalgas se reproducen y aumentan en número. Por ejemplo, los
 30 medios se pueden infundir en el biorreactor después de la inoculación pero antes de que las células alcancen la
 densidad deseada. En otros casos, un biorreactor se llena con medios de cultivo al comienzo de un cultivo y no se
 infunde más medio de cultivo después de inocular el cultivo. En otras palabras, la biomasa de microalgas (u otros
 microbios) se cultiva en un medio acuoso durante un período de tiempo durante el cual las microalgas se reproducen
 y aumentan en número; sin embargo, no fluyen cantidades de medio de cultivo acuoso a través del biorreactor
 durante todo el período de tiempo. Por lo tanto, no es necesario que el medio de cultivo acuoso fluya a través del
 35 biorreactor después de la inoculación.

[0107] Los biorreactores equipados con dispositivos tales como palas giratorias e impulsores, mecanismos
 basculantes, barras agitadoras o medios para la infusión de gas presurizado pueden usarse para someter los cultivos
 40 de microalgas a mezcla. La mezcla puede ser continua o intermitente. Por ejemplo, no se mantiene un régimen de
 flujo turbulento de entrada de gas y entrada de medios para la reproducción de microalgas hasta que se haya logrado
 un aumento deseado del número de dichas microalgas.

[0108] Los puertos del biorreactor se pueden utilizar para introducir o extraer gases, sólidos, semisólidos y líquidos
 en la cámara del biorreactor que contiene las microalgas. Si bien muchos biorreactores tienen más de un puerto (por
 45 ejemplo, uno para la entrada de medios y otro para el muestreo), no es necesario que solo una sustancia entre o
 salga de un puerto. Por ejemplo, se puede usar un puerto para hacer fluir medios de cultivo al biorreactor y luego
 usarlo para el muestreo, como entrada de gas, como salida de gas o para otros fines. Preferiblemente, un puerto de
 muestreo se puede usar repetidamente sin alterar y comprometer la naturaleza axénica del cultivo. Un puerto de
 muestreo se puede configurar con una válvula u otro dispositivo que permita detener e iniciar el flujo de muestras o
 50 proporcionar un medio de muestreo continuo. Los biorreactores suelen tener al menos un puerto que permite la
 inoculación de un cultivo, y dicho puerto también se puede utilizar para otros fines, como la introducción de medios o
 gases.

[0109] Los puertos de los biorreactores permiten manipular el contenido de gas del cultivo de microalgas. A modo
 55 ilustrativo, parte del volumen de un biorreactor puede ser gas en lugar de líquido, y las entradas de gas del
 biorreactor permiten bombear gases al biorreactor. Los gases que pueden bombearse beneficiosamente a un
 biorreactor incluyen aire, mezclas de aire/CO₂, gases nobles, como el argón, y otros gases. Los biorreactores suelen

estar equipados para permitir que el usuario controle la velocidad de entrada de un gas en el biorreactor. Como se ha indicado anteriormente, se puede usar el aumento del flujo de gas en un biorreactor para aumentar la mezcla del cultivo.

- 5 [0110] El aumento del flujo de gas también afecta a la turbidez del cultivo. La turbulencia se puede lograr colocando un puerto de entrada de gas por debajo del nivel del medio de cultivo acuoso para que el gas que entra al biorreactor burbujee hacia la superficie del cultivo. Uno o más puertos de salida de gas permiten que escape el gas, evitando así la acumulación de presión en el biorreactor. Preferiblemente, un puerto de salida de gas conduce a una válvula "unidireccional" que evita que los microorganismos contaminantes entren en el biorreactor.

10

3. Medios

- 15 [0111] Las microalgas, así como otros medios de cultivo microbiano, normalmente contienen componentes como una fuente de nitrógeno fijo, una fuente de carbono fijo, oligoelementos, opcionalmente una solución amortiguadora para el mantenimiento del pH y fosfato (normalmente proporcionado como una sal de fosfato). Otros componentes pueden incluir sales como el cloruro de sodio, particularmente para las microalgas de agua de mar. Las fuentes de nitrógeno incluyen fuentes de nitrógeno orgánico e inorgánico, incluyendo, por ejemplo, sin limitación, nitrógeno molecular, nitrato, sales de nitrato, amoníaco (puro o en forma de sal, como, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y NH_4OH), proteína, harina de soja, licor de maíz y extracto de levadura. Los ejemplos de oligoelementos incluyen zinc, boro, cobalto, cobre, manganeso y molibdeno, por ejemplo, en las formas respectivas de ZnCl_2 , H_3BO_3 , $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

20

- 25 [0112] Los microorganismos adecuados se pueden encontrar en varios lugares y entornos de todo el mundo. Como consecuencia de su aislamiento de otras especies y su divergencia evolutiva resultante, puede ser difícil predecir el medio de crecimiento particular para el crecimiento óptimo y la generación de constituyentes de lípidos y/o hidrocarburos. En algunos casos, algunas cepas de microorganismos pueden ser incapaces de crecer en un medio de cultivo concreto debido a la presencia de algún componente inhibitorio o a la ausencia de algún requisito nutricional esencial requerido por la cepa concreta del microorganismo.

30

- 30 [0113] Los medios de crecimiento sólidos y líquidos generalmente están disponibles en una amplia variedad de fuentes, y se pueden encontrar instrucciones para la preparación de medios particulares que sean adecuados para una amplia variedad de cepas de microorganismos, por ejemplo, en línea en www.utex.org/, un sitio web mantenido por la Universidad de Texas en Austin, 1 University Station A6700, Austin, Texas, 78712-0183, para su colección de cultivos de algas (UTEX). Por ejemplo, varios medios de agua dulce y agua salada incluyen los descritos en la publicación PCT n.º 2008/151149, que se incorpora a la presente por referencia.

35

- 40 [0114] En un ejemplo particular, el medio de proteosa es adecuado para cultivos axénicos, y se puede preparar un volumen de 1 litro del medio (pH ~6,8) mediante la adición de 1 g de proteosa peptona a 1 litro de medio de cultivo Bristol. El medio Bristol comprende 2,94 mM NaNO_3 , 0,17 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,3 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,43 mM, 1,29 mM KH_2PO_4 , y 1,43 mM NaCl en una solución acuosa. Para medio de agar al 1,5 %, se pueden agregar 15 g de agar a 1 L de la solución. La solución se cubre y se esteriliza en autoclave, y luego se almacena a temperatura refrigerada antes de su uso. Otro ejemplo es el medio para el aislamiento de *Prototheca* (PIM), que comprende 10 g/l de ftalato de hidrógeno y potasio (KHP), 0,9 g/l de hidróxido de sodio, 0,1 g/l de sulfato de magnesio, 0,2 g/l de hidrógeno fosfato de potasio, 0,3 g/l de cloruro de amonio, 10 g/l de glucosa 0,001 g/l de clorhidrato de tiamina, 20 g/L de agar, 0,25 g/l de 5-fluorocitosina, a un pH en el rango de 5,0 a 5,2 (véase Pore, 1973, App. Microbiology, 26: 648-649). Se pueden identificar fácilmente otros medios adecuados para usar con los métodos descritos en este documento consultando la URL que se ha identificado antes o consultando otras organizaciones que mantienen cultivos de microorganismos, como SAG, CCAP o CCALA. SAG se refiere a la Colección de Cultivos de Algas de la Universidad de Göttingen (Göttingen, Alemania), CCAP se refiere a la colección de cultivos de algas y protozoos gestionada por la Asociación Escocesa de Ciencias Marinas (Scottish Association for Marine Science, Escocia, Reino Unido), y CCALA se refiere a la colección de cultivos colección del laboratorio de algas del Instituto de Botánica (Institute of Botany, Třeboň, República Checa). Adicionalmente, en la patente de EE. UU. n.º 5,900,370 se describen formulaciones de medios y condiciones adecuadas para la fermentación heterótrofa de especies de *Prototheca*.

45

50

55

- 55 [0115] Para una producción rentable, la selección de una fuente de carbono fijo es importante, ya que el coste de la fuente de carbono fijo debe ser lo suficientemente bajo para que la producción de aceite sea económica. Las fuentes de carbono adecuadas incluyen, por ejemplo, acetato, floridósido, fructosa, galactosa, ácido glucurónico, glucosa, glicerol, lactosa, manosa, N-acetilglucosamina, ramnosa, rafinosa, estaquiosa, sacarosa y/o xilosa. Las materias primas adecuadas útiles según los métodos descritos en este documento incluyen, por ejemplo, licor negro, almidón de maíz, material celulósico despolimerizado, suero de leche, azúcar invertido (glucosa/fructosa), melaza, patata, sorgo, sacarosa, remolacha azucarera, caña de azúcar, jugo de caña espeso, arroz y trigo. Las fuentes de carbono

60

también se pueden proporcionar como una mezcla, tal como una mezcla de sacarosa y pulpa de remolacha azucarera despolimerizada.

5 [0116] La fuente o fuentes de carbono se pueden suministrar a una concentración de al menos aproximadamente 50 μ M, al menos aproximadamente 100 μ M, al menos aproximadamente 500 μ M, al menos aproximadamente 5 mM, al menos aproximadamente 50 mM y al menos aproximadamente 500 mM, de una o más fuentes de carbono fijos proporcionadas exógenamente. Se prefieren fuentes de carbono altamente concentradas como materia prima para la fermentación, y la fuente de carbono se puede proporcionar en una materia prima a una concentración cercana a su solubilidad máxima (es decir, a una concentración que excede el 90 % de solubilidad, como una concentración del 95 % o más, es decir, del 99 % de solubilidad).

10 [0117] Por ejemplo, se utilizan concentraciones de glucosa de al menos 300 g/l, al menos 400 g/l, al menos 500 g/l o al menos 600 g/l o más en la materia prima en un cultivo discontinuo, en el que la fuente de carbono fijo altamente concentrado se alimenta a las células con el tiempo a medida que las células crecen y acumulan aceite microbiano (lípidos). Alternativamente, pueden usarse concentraciones de sacarosa de al menos 500 g/L, al menos 600 g/L, al menos 700 g/L, al menos 800 g/L o más en la materia prima en un cultivo discontinuo. Los ejemplos no excluyentes de fuentes de carbono de sacarosa altamente concentradas incluyen jugo de caña espeso, jugo de caña de azúcar, jugo de remolacha azucarera y melaza. Las fuentes de carbono de particular interés para los fines de los métodos descritos en este documento incluyen celulosa (en forma despolimerizada), glicerol, sacarosa y sorgo, cada una de las cuales se analiza con más detalle a continuación.

15 [0118] Según los métodos descritos en el presente documento, los microorganismos pueden cultivarse usando biomasa celulósica despolimerizada como materia prima. La biomasa celulósica (por ejemplo, rastrojo, como el rastrojo de maíz) es económica y se puede obtener con facilidad; sin embargo, los intentos de utilizar este material como materia prima para la levadura han fracasado. En particular, se ha descubierto que dichas materias primas inhiben el crecimiento de la levadura, y la levadura no puede usar los azúcares de 5 carbonos producidos a partir de materiales celulósicos (por ejemplo, xilosa de hemicelulosa). Por el contrario, las microalgas pueden crecer en material celulósico procesado. Los materiales celulósicos generalmente incluyen alrededor de un 40-60 % de celulosa; aproximadamente un 20-40 % de hemicelulosa; y un 10-30 % de lignina.

20 [0119] Entre los materiales celulósicos adecuados se incluyen los residuos de cultivos energéticos herbáceos y leñosos, así como cultivos agrícolas, es decir, las partes de la planta, principalmente tallos y hojas, que no se extraen de los campos con el alimento principal o el producto de fibra. Los ejemplos incluyen desechos agrícolas como bagazo de caña de azúcar, cascarillas de arroz, fibra de maíz (incluidos tallos, hojas, cáscaras y zuros), harina de soja, paja de trigo, paja de arroz, pulpa de remolacha azucarera, pulpa de cítricos, cáscaras de cítricos; desechos forestales tales como los de entresacas de maderas duras y blandas, y residuos de maderas duras y blandas procedentes de operaciones madereras; desechos de madera tales como desechos de aserraderos (astillas de madera, serrín) y desechos de plantas de celulosa; desechos urbanos tales como las fracciones de papel de los desechos sólidos municipales, desechos urbanos de madera y desechos verdes urbanos tales como recortes de césped municipal; y residuos de construcción de madera. Los celulósicos adicionales incluyen cultivos celulósicos dedicados, como el pasto varilla, la madera de álamo híbrido y el miscanto, la caña de fibra y el sorgo de fibra. Entre los azúcares de cinco carbonos que se producen a partir de dichos materiales se incluye la xilosa.

25 [0120] Los materiales celulósicos se procesan para aumentar la eficacia con la que el microbio puede utilizar los azúcares contenidos en dichos materiales. Los métodos descritos en este documento se pueden poner en práctica para aprovechar los nuevos métodos para el tratamiento de materiales celulósicos después de la explosión ácida, de modo que los materiales sean adecuados para su uso en un cultivo heterótrofo de microbios (por ejemplo, microalgas y levaduras oleaginosas). Como se ha mencionado antes, la biomasa lignocelulósica se compone de varias fracciones, incluyendo la celulosa, un polímero cristalino de glucosa con enlaces beta 1,4 (un azúcar de seis carbonos), hemicelulosa, un polímero asociado más libremente compuesto predominantemente de xilosa (un azúcar de cinco carbonos) y, en menor medida, manosa, galactosa, arabinosa, lignina, un polímero aromático complejo compuesto por alcohol sinapílico y sus derivados, y pectinas, que son cadenas lineales de un ácido poligalacturónico con enlaces alfa 1,4. Debido a la estructura polimérica de la celulosa y la hemicelulosa, los azúcares (por ejemplo, glucosa monomérica y xilosa) que contienen no se encuentran en una forma que muchos microbios puedan usar (metabolizar) de manera eficiente. Para tales microbios, el procesamiento adicional de la biomasa celulósica para generar los azúcares monoméricos que forman los polímeros puede ser muy útil para garantizar que los materiales celulósicos se utilicen de manera eficiente como materia prima (fuente de carbono).

30 [0121] La celulosa o biomasa celulósica se somete a un proceso, denominado "explosión", en el que la biomasa se trata con ácido sulfúrico diluido (u otro) a temperatura y presión elevadas. Este proceso condiciona la biomasa de manera que pueda someterse de manera eficiente a la hidrólisis enzimática de las fracciones celulósica y

hemicelulósica en monómeros de glucosa y xilosa. Los azúcares monoméricos resultantes se denominan azúcares celulósicos. Los azúcares celulósicos pueden ser utilizados posteriormente por microorganismos para producir una variedad de metabolitos (por ejemplo, lípidos). El paso de explosión ácida da como resultado una hidrólisis parcial de la fracción de hemicelulosa en monosacáridos constituyentes. Estos azúcares pueden liberarse completamente de la biomasa con un tratamiento adicional. El tratamiento adicional puede ser un tratamiento hidrotérmico que incluye lavar el material explotado con agua caliente, lo que elimina contaminantes como sales. Este paso no es necesario para las fermentaciones de etanol celulósico debido a las concentraciones de azúcar más diluidas que se utilizan en dichos procesos. Alternativamente, el tratamiento adicional puede ser un tratamiento con ácido adicional; o bien, el tratamiento adicional puede ser la hidrólisis enzimática del material explotado. Estos tratamientos también se pueden utilizar en cualquier combinación. El tipo de tratamiento puede afectar al tipo de azúcares liberados (por ejemplo, azúcares de cinco carbonos frente a azúcares de seis carbonos) y la etapa en la que se liberan en el proceso. Como consecuencia, se pueden crear diferentes corrientes de azúcares, ya sean predominantemente de cinco o seis carbonos. Estas corrientes enriquecidas de cinco o seis carbonos pueden dirigirse a microorganismos específicos con diferentes capacidades de utilización de carbono.

[0122] Los métodos descritos en este documento implican típicamente la fermentación a densidades celulares más altas que las que se logran en la fermentación con etanol. Debido a las mayores densidades de los cultivos para la producción heterótrofa de lípidos, la fuente de carbono fijo (por ejemplo, la(s) corriente(s) de azúcar(es) derivado(s) de la celulosa) está preferiblemente en forma concentrada. El contenido de glucosa del material celulósico despolimerizado es preferentemente de al menos 300 g/litro, al menos 400 g/litro, al menos 500 g/litro o al menos 600 g/litro antes del paso de cultivo, que es opcionalmente un cultivo discontinuo en el que el material se suministra a las células a lo largo del tiempo a medida que las células crecen y acumulan lípidos. Las corrientes de azúcar celulósico no se utilizan en o cerca de este rango de concentración en la producción de etanol celulósico. Por lo tanto, con el fin de generar y mantener muy altas las densidades de células durante la producción de aceite lignocelulósico, la(s) materia(s) prima(s) de carbono debe(n) suministrarse a los cultivos heterótrofos de forma muy concentrada. Sin embargo, cualquier componente de la corriente de alimentación que no sea un sustrato y no sea metabolizado por el microorganismo oleaginoso se acumulará en el biorreactor, lo que puede generar problemas si el componente es tóxico o inhibe la producción del producto final deseado. Mientras que la lignina y los subproductos derivados de la lignina, los subproductos derivados de carbohidratos como los furfurales y los hidroximetilfurfurales, y las sales derivadas de la generación de los materiales celulósicos (tanto en el proceso de explosión como en el posterior proceso de neutralización), e incluso los azúcares pentosas/hexosas no metabolizados pueden presentar problemas en las fermentaciones etanólicas, estos efectos se amplifican significativamente en un proceso en el que su concentración en la materia prima inicial es alta. Para lograr concentraciones de azúcar de materiales celulósicos de 300 g/L, 400 g/L, 500 g/L o más para azúcares de seis carbonos que pueden usarse en aplicaciones de producción a gran escala, la concentración de estos materiales tóxicos puede ser 20 veces superior a las concentraciones típicamente presentes en las fermentaciones etanólicas de biomasa celulósica.

[0123] En el tratamiento del proceso de explosión del material celulósico se utilizan cantidades significativas de ácido sulfúrico, calor y presión, liberando así subproductos de carbohidratos, a saber, furfurales e hidroximetilfurfurales. Los furfurales y los hidroximetilfurfurales se producen durante la hidrólisis de la hemicelulosa a través de la deshidratación de la xilosa en furfural y agua. Estos subproductos (por ejemplo, furfurales e hidroximetilfurfurales) se pueden eliminar del material lignocelulósico sacarificado antes de introducirlo en el biorreactor. El proceso para la eliminación de los subproductos de los carbohidratos puede ser el tratamiento hidrotérmico de los materiales celulósicos sometidos a la explosión. Además, pueden usarse para la producción cepas capaces de tolerar compuestos tales como furfurales o hidroximetilfurfurales. Otra posibilidad es usar microorganismos que no solo sean capaces de tolerar los furfurales en los medios de fermentación, sino que también puedan metabolizar estos subproductos durante la fermentación.

[0124] El proceso de explosión también genera niveles significativos de sales. Por ejemplo, las condiciones típicas de explosión pueden generar conductividades superiores a 5 mS/cm cuando la biomasa celulósica explotada se resuspende en una proporción de 10:1 agua:sólidos (peso en seco). La biomasa explotada diluida se puede someter a sacarificación enzimática y el sobrenadante resultante se puede concentrar hasta 25 veces para su uso en el biorreactor. El nivel de sal (medido por conductividad) en la(s) corriente(s) de azúcar concentrado puede ser inaceptablemente alto (hasta 1,5 M Na⁺ equivalentes). También se generan sales adicionales tras la neutralización de los materiales explotados para el posterior proceso de sacarificación enzimática. Según los métodos descritos en el presente documento, estas sales se pueden eliminar para que la(s) corriente(s) de azúcar celulósico concentrado resultante(s) se pueda(n) usar en procesos heterótrofos para producir lípidos. El método para eliminar estas sales puede ser la desionización con resinas, como, entre otras, DOWEX Marathon MR3. El paso de desionización con resina puede ocurrir antes de la concentración de azúcar o el ajuste del pH y el tratamiento hidrotérmico de la biomasa antes de la sacarificación, o cualquier combinación de los anteriores; o bien, el paso se lleva a cabo después de uno o más de estos procesos. Alternativamente, el propio proceso de explosión se modifica para evitar la

generación de sales a niveles inaceptablemente altos. Por ejemplo, una alternativa adecuada a la explosión con ácido sulfúrico (u otro ácido) de la biomasa celulósica es la reducción mecánica a pulpa para hacer que la biomasa celulósica sea receptiva a la hidrólisis enzimática (sacarificación). Como alternativa, pueden usarse cepas nativas de microorganismos resistentes a niveles elevados de sales o cepas modificadas genéticamente con resistencia a niveles elevados de sales.

[0125] El proceso de preparación de biomasa celulósica explotada para su uso en la producción heterótrofa de aceite microbiano usando microbios oleaginosos se puede realizar de la siguiente manera. Un primer paso comprende el ajuste del pH de la biomasa celulósica explotada resuspendida al rango de 5,0-5,3 seguido de lavado de la biomasa celulósica tres veces. Este paso de lavado se puede lograr por una variedad de medios que incluyen el uso de resinas de intercambio de iones y desalinización, ósmosis inversa, tratamiento hidrotérmico (como se ha descrito anteriormente) o simplemente resuspensión y centrifugación repetidas en agua desionizada. Este paso de lavado da como resultado una corriente celulósica cuya conductividad está entre 100-300 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y la eliminación de cantidades significativas de furfurales e hidroximetilfurfurales. Los decantados de este paso de lavado se pueden guardar para concentrar azúcares de cinco carbonos liberados de la fracción de hemicelulosa. Un segundo paso comprende la sacarificación enzimática de la biomasa celulósica lavada. Por ejemplo, se puede utilizar Accellerase (Genencor). Un tercer paso comprende la recuperación de azúcares mediante centrifugación o decantación y lavado de la biomasa sacarificada. La biomasa resultante (sólidos) es un componente rico en lignina y denso en energía que puede usarse como combustible o desecharse. Se recoge la corriente de azúcar recuperada en el proceso de centrifugado/decantación y aclarado. Un cuarto paso comprende la microfiltración para eliminar los sólidos contaminantes con la recuperación del permeado. Un quinto paso comprende un paso de concentración que se puede lograr utilizando un evaporador al vacío. Este paso puede incluir opcionalmente la adición de agentes antiespumantes como P'2000 (Sigma/Fluka), que a veces es necesario debido al contenido de proteínas de la materia prima de azúcar resultante.

[0126] La fuente de carbono puede ser glicerol, incluido el subproducto de glicerol acidulado y no acidulado de la transesterificación de biodiésel. La fuente de carbono puede incluir glicerol y al menos otra fuente de carbono. En algunos casos, todo el glicerol y dicha al menos otra fuente de carbono fijo se proporcionan al microorganismo al comienzo de la fermentación. En algunos casos, el glicerol y dicha al menos otra fuente de carbono fijo se proporcionan al microorganismo de manera simultánea en una proporción predeterminada. En algunos casos, el glicerol y dicha al menos otra fuente de carbono fijo se proporcionan a los microbios a una velocidad predeterminada durante el transcurso de la fermentación.

[0127] Algunas microalgas experimentan una división celular más rápida en presencia de glicerol que en presencia de glucosa (véase la publicación PCT N.º 2008/151149). En estos casos, los procesos de crecimiento en dos etapas, en los que las células se alimentan primero con glicerol para aumentar rápidamente la densidad celular y luego se alimentan con glucosa para acumular aceite microbiano (lípidos), pueden mejorar la eficiencia con la que se produce el aceite. El uso del subproducto de glicerol del proceso de transesterificación proporciona ventajas económicas significativas cuando se vuelve a poner en un proceso de producción de aceite microbiano. También se proporcionan otros métodos de alimentación, como los que emplean mezclas de glicerol y glucosa como fuente de carbono fijo. Con el uso de tales mezclas para la alimentación también se obtienen beneficios económicos similares. Además, se puede proporcionar a las microalgas azúcares alternativos, como la sacarosa, en varias combinaciones con glicerol.

[0128] La fuente de carbono puede ser azúcar invertido. El azúcar invertido se produce dividiendo la sacarosa en los monosacáridos que lo componen, fructosa y glucosa. La producción de azúcar invertido se puede lograr mediante varios métodos que se conocen en la técnica. Uno de estos métodos es calentar una solución acuosa de sacarosa. A menudo, se emplean catalizadores para acelerar la conversión de sacarosa en azúcar invertido. Estos catalizadores pueden ser biológicos; por ejemplo, se pueden agregar enzimas como invertasas y sacarasas a la sacarosa para acelerar la reacción de hidrólisis para producir azúcar invertido. El ácido es un ejemplo de un catalizador no biológico que, cuando se combina con el calor, puede acelerar la reacción de hidrólisis. Una vez que se produce el azúcar invertido, es menos propenso a la cristalización en comparación con la sacarosa y, por lo tanto, brinda ventajas para el almacenamiento y las fermentaciones discontinuas, donde, en el caso del cultivo heterótrofo de microbios, incluidas las microalgas, existe la necesidad de una fuente concentrada de carbono. La fuente de carbono puede ser azúcar invertido, preferiblemente en forma concentrada (al menos el 90 % de su máxima solubilidad en las condiciones utilizadas, como se ha descrito anteriormente), es decir, al menos 800 g/litro, al menos 900 g/litro, al menos 1000 g/litro o al menos 1100 g/litro. El azúcar invertido, preferiblemente en forma concentrada, se suministra a las células con el tiempo a medida que las células crecen y acumulan lípidos.

[0129] La fuente de carbono puede ser sacarosa, incluyendo una materia prima compleja que contiene sacarosa, como el jugo de caña espeso del procesamiento de la caña de azúcar. Como se ha señalado anteriormente, debido a las densidades más altas de los cultivos para la producción de aceite heterótrofo, la fuente de carbono fijo (por

ejemplo, sacarosa, glucosa, etc.) se encuentra en forma concentrada, es decir, al menos 500 g/litro, al menos 600 g/litro, al menos 700 g/litro o al menos 800 g/litro de la fuente de carbono fijo antes del paso de cultivo, que es opcionalmente un cultivo discontinuo en el que el material se suministra a las células a lo largo del tiempo a medida que las células crecen y acumulan lípidos. En algunos casos, la fuente de carbono es sacarosa en forma de jugo de caña espeso, típicamente en forma concentrada, es decir, al menos 60 % de sólidos o aproximadamente 770 g/litro de azúcar, al menos 70 % de sólidos o aproximadamente 925 g/litro de azúcar, o al menos 80 % de sólidos o aproximadamente 1125 g/litro de azúcar antes de la etapa de cultivo, que es opcionalmente un cultivo discontinuo. El jugo de caña espeso concentrado se suministra a las células con el tiempo a medida que las células crecen y acumulan lípidos.

[0130] El medio de cultivo puede incluir además al menos una enzima de utilización de sacarosa. En algunos casos, el medio de cultivo incluye una sacarasa. La enzima sacarasa puede ser una enzima sacarasa secretable codificada por un gen exógeno de sacarasa expresado por la población de microorganismos. Por lo tanto, en algunos casos, como se describe con más detalle en la sección IV, a continuación, el microbio utilizado en los métodos descritos en este documento se ha diseñado genéticamente para que exprese una enzima de utilización de sacarosa, como un transportador de sacarosa, una sacarasa, una hexoquinasa, una glucocinasa o una fructocinasa.

[0131] Las materias primas complejas que contienen sacarosa incluyen la melaza de desecho del procesamiento de la caña de azúcar; el uso de este producto de desecho de bajo valor del procesamiento de la caña de azúcar puede proporcionar ahorros significativos en los costes de producción de hidrocarburos y otros aceites. Otra materia prima compleja que contiene sacarosa que es útil en los métodos descritos en este documento es el sorgo, incluyendo jarabe de sorgo y sorgo puro. El jarabe de sorgo se produce a partir del jugo de la caña de sorgo dulce. Su perfil de azúcares se compone principalmente de glucosa (dextrosa), fructosa y sacarosa.

4. Producción de aceite

[0132] Para la producción de aceite (lípidos) según los métodos descritos en este documento, es preferible cultivar células en la oscuridad, como es el caso, por ejemplo, cuando se utilizan fermentadores extremadamente grandes (de 40 000 litros y más) que no permiten que la luz llegue al cultivo. Por ejemplo, *Prototheca* y otras especies de microalgas pueden cultivarse y propagarse para la producción de aceite en un medio que contenga una fuente de carbono fijo y en ausencia de luz; dicho crecimiento se conoce como crecimiento heterótrofo.

[0133] Como ejemplo, se introduce en el medio un inóculo de células de microalgas productoras de lípidos; hay un período de retraso (fase de retraso) antes de que las células comiencen a propagarse. Después del período de retraso, la tasa de propagación aumenta constantemente y entra en la fase logarítmica o exponencial. A la fase exponencial le sigue, a su vez, una ralentización de la propagación debido a la disminución de nutrientes como el nitrógeno, el aumento de sustancias tóxicas y los mecanismos de percepción de quórum. Después de esta desaceleración, la propagación se detiene y las células entran en una fase estacionaria o en un estado de crecimiento constante, según el entorno particular que se les proporcione. Para obtener una biomasa rica en lípidos, el cultivo generalmente se cosecha mucho después del final de la fase exponencial, que puede terminarse antes de tiempo permitiendo que el nitrógeno u otro nutriente clave (que no sea carbono) se agote, obligando a las células a convertir las fuentes de carbono, presentes en exceso, en lípidos. Los parámetros de las condiciones de cultivo se pueden manipular para optimizar la producción total de aceite, la combinación de ácidos grasos del aceite producido y/o la producción de un ácido graso específico y los lípidos correspondientes.

[0134] Preferiblemente, los microorganismos cultivados usando las condiciones descritas en este documento y otras conocidas en la técnica comprenden al menos aproximadamente el 20 % en peso de lípido, preferiblemente al menos aproximadamente el 40 % en peso, más preferiblemente al menos aproximadamente el 50 % en peso y, de la manera más preferible, al menos aproximadamente 60 % en peso. Las condiciones del proceso se pueden ajustar para aumentar la producción de lípidos adecuados para un uso particular y/o para reducir el coste de producción. Por ejemplo, se puede cultivar una microalga en presencia de una concentración limitante de uno o más nutrientes, como, por ejemplo, nitrógeno, fósforo o azufre, mientras se proporciona un exceso de energía de carbono fijo, como la glucosa. La limitación del nitrógeno tiende a aumentar la producción de lípidos microbianos en comparación con la producción de lípidos microbianos en un cultivo en el que se proporciona nitrógeno en exceso. El aumento en la producción de lípidos puede ser de al menos aproximadamente: 10 %, 50 %, 100 %, 200 % o 500 %. El microbio se puede cultivar en presencia de una cantidad limitante de un nutriente durante una parte del período de cultivo total o durante todo el período. La concentración de nutrientes se puede alternar entre una concentración limitante y una concentración no limitante al menos dos veces durante el período de cultivo total. El contenido de lípidos de las células puede incrementarse continuando el cultivo durante periodos de tiempo prolongados mientras se proporciona un exceso de carbono, pero limitando o no el nitrógeno.

[0135] Alternativamente, la producción de lípidos aumenta mediante el cultivo de un microbio productor de lípidos (por ejemplo, microalgas) en presencia de uno o más cofactores para una enzima de la ruta de los lípidos (por ejemplo, una enzima sintética de ácidos grasos). En general, la concentración de los cofactores es suficiente para aumentar la producción de aceite microbiano (por ejemplo, lípidos y ácidos grasos) en comparación con la producción de aceite microbiano en ausencia de los cofactores. El o los cofactores pueden proporcionarse al cultivo incluyendo en el cultivo un microbio (por ejemplo, microalgas) que contenga un gen exógeno que codifique el o los cofactores. Alternativamente, se pueden proporcionar cofactor(es) a un cultivo incluyendo un microbio (por ejemplo, microalgas) que contenga un gen exógeno que codifique una proteína que participa en la síntesis del cofactor. Los cofactores adecuados pueden incluir una vitamina requerida por una enzima de la ruta de los lípidos, como, por ejemplo: biotina y pantotenato. Los genes que codifican cofactores adecuados para su uso en los métodos descritos en este documento o que participan en la síntesis de dichos cofactores son ampliamente conocidos y pueden introducirse en microbios (por ejemplo, microalgas u otros microbios oleaginosos descritos en este documento), utilizando construcciones y técnicas como las descritas anteriormente.

[0136] Los ejemplos específicos de biorreactores, condiciones de cultivo y métodos de crecimiento y propagación heterótrofos descritos en el presente documento se pueden combinar de cualquier manera adecuada para mejorar las eficiencias del crecimiento microbiano y la producción de lípidos y/o proteínas.

[0137] Se ha generado biomasa de microalgas con un alto porcentaje de acumulación de aceite/lípidos en peso en seco (véase la publicación PCT n.º 2008/151149). La biomasa de microalgas generada por los métodos de cultivo descritos en este documento y útil según los métodos descritos en este documento comprende al menos un 10 % de aceite de microalgas en peso en seco. La biomasa de microalgas puede comprender al menos un 25 %, al menos un 50 %, al menos un 55 % o al menos un 60 % de aceite de microalgas en peso en seco. La biomasa de microalgas puede contener del 10 al 90 % de aceite de microalgas, del 25 al 75 % de aceite de microalgas, del 40 al 75 % de aceite de microalgas o del 50 al 70 % de aceite de microalgas en peso en seco.

[0138] El aceite de microalgas de la biomasa que se describe en este documento, o extraído de la biomasa para su uso en los métodos y composiciones descritos en este documento, puede comprender glicerolípidos con una o más cadenas laterales de éster de ácido graso distintas. Los glicerolípidos se componen de una molécula de glicerol esterificada a una, dos o tres moléculas de ácidos grasos, que pueden tener longitudes variables y grados de saturación variables. Las características de longitud y saturación de las moléculas de ácidos grasos (y los aceites de microalgas que las contienen) se pueden manipular para modificar las propiedades o proporciones de las moléculas de ácidos grasos en los aceites de microalgas descritos en este documento a través de condiciones de cultivo o mediante ingeniería de rutas de lípidos, como se describe en más detalles e la sección V, a continuación. Por lo tanto, se pueden preparar mezclas específicas de aceite de algas (u otros microorganismos) dentro de una sola especie de algas o mezclando la biomasa o el aceite de algas de dos o más especies de microalgas, o mezclando el aceite de algas descrito en este documento con aceites de otras fuentes como soja, colza, canola, palma, palmiste, coco, maíz, residuos vegetales, árbol de sebo, aceituna, girasol, semilla de algodón, grasa de pollo, sebo bovino, sebo porcino, microalgas, macroalgas, microbios, cuphea, lino, cacahuete, grasa blanca de primera, manteca de cerdo, Camellina sativa, semilla de mostaza, anacardo, avena, lupino, kenaf, caléndula, socorro, café, linaza (lino), avellana, euforbia, semilla de calabaza, cilantro, camelia, sésamo, cártamo, arroz, árbol de tung, cacao, copra, adormidera, ricino, nuez pecán, jojoba, macadamia, nueces de Brasil, aguacate, petróleo o una fracción destilada de cualquiera de los aceites anteriores.

[0139] Como se ha señalado antes, la composición del aceite, es decir, las propiedades y proporciones de los constituyentes de ácidos grasos de los glicerolípidos, también pueden manipularse combinando biomasa o aceite de al menos dos especies distintas de microalgas. Al menos dos de las distintas especies de microalgas pueden tener diferentes perfiles de glicerolípidos. Las distintas especies de microalgas se pueden cultivar juntas o por separado como se describe en este documento, preferiblemente en condiciones heterótrofas, para generar los respectivos aceites. Diferentes especies de microalgas pueden contener diferentes porcentajes de constituyentes de ácidos grasos distintos en los glicerolípidos de la célula.

[0140] Por lo general, las cepas de *Prototheca* tienen perfiles de lípidos con ácidos grasos C16 y C18 como especies predominantes. Dichos ácidos grasos de cadena más larga, especialmente los ácidos grasos monosaturados C16 y C18 (es decir, C16:1 y C18:1) son generalmente preferidos para la producción de fluidos dieléctricos (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6,274,067). Por ejemplo, *Prototheca moriformis* (UTEX 1435), *Prototheca stagnora* (UTEX 327), y *Prototheca moriformis* (UTEX 1441) contienen entre un 12 % y un 30 % de ácidos grasos C16 y entre un 50 % y un 58 % de ácidos grasos C18:1. *Chlorella protothecoides* (UTEX 250) contiene aproximadamente un 73 % de ácidos grasos C18:1 y otras cepas de *Chlorella protothecoides*, incluidas, entre otras, UTEX 25, UTEX 249, UTEX 256, UTEX 264, UTEX 411, CCAP 211/17, CCAP 221/8D y SAG 221 10d, pueden contener entre un 7 % y un 18 % de ácidos grasos C 16 y entre un 55 % y un 75 % de ácidos grasos C18:1. El aceite microbiano (lípidos) útil en

los productos descritos en el presente documento (como los fluidos dieléctricos) puede tener al menos un 50 % de C18:1, por ejemplo, al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos alrededor de un 75 %, al menos alrededor de un 80 %, al menos alrededor de un 85 % y al menos alrededor de un 90 % de C18:1. En algunas formas de realización, el aceite microbiano (lípidos) es menos del 7,5 %, por ejemplo de menos del 5 %, menos del 2,5 % y menos del 1 % de C18:2. El aceite microbiano puede tener cualquier combinación de porcentajes de C18:1 y C18:2 que sumen 100 % o menos. Por ejemplo, el aceite microbiano puede tener al menos un 50 % de C18:1 y menos de un 10 % de C18:2 o al menos un 80 % de C18:1 y menos de un 5 % de C18:2.

[0141] El aceite (lípidos) de microalgas (u otro microorganismo) también puede incluir otros constituyentes producidos por las microalgas, o incorporados en el aceite de microalgas del medio de cultivo. Estos otros componentes pueden estar presentes en cantidades variables según las condiciones de cultivo, la especie, el método de extracción utilizado para recuperar el aceite de la biomasa y otros factores que pueden afectar la composición del aceite. Entre los ejemplos no limitativos de tales constituyentes se incluyen los carotenoides, presentes en menos de 0,4 microgramos/ml; el licopeno, presente en menos de 0,001 microgramos/ml; el betacaroteno, presente en menos de 0,02 microgramos/ml; la clorofila, presente en menos de 0,02 miligramos por kilogramo de aceite; el gamma tocoferol, presente de 0,40 a 0,60 miligramos por 100 gramos de aceite; el campesterol, presente de 3 a 9 miligramos por 100 gramos de aceite; y los tocotrienoles, presentes en menos de 0,5 miligramos por gramo de aceite.

[0142] Los otros constituyentes pueden incluir, sin limitación, fosfolípidos, tocoferoles, tocotrienoles, carotenoides (por ejemplo, alfacaroteno, betacaroteno, licopeno, etc.), xantofilas (por ejemplo, luteína, zeaxantina, alfa-criptoxantina y beta-criptoxantina), y varios compuestos orgánicos o inorgánicos. En algunos casos, el aceite extraído de especies de *Prototheca* comprende entre 0,003 y 0,039 microgramos de luteína/gramo de aceite, menos de 0,003 microgramos de licopeno/gramo de aceite; y menos de 0,003 microgramos de betacaroteno/gramo de aceite.

III. MÉTODOS Y MATERIALES DE INGENIERÍA GENÉTICA

[0143] Los métodos descritos en este documento se pueden poner en práctica usando microalgas recombinantes u otros microbios oleaginosos recombinantes. En esta sección se describen métodos y materiales para modificar genéticamente microbios oleaginosos, como microalgas, ejemplificando específicamente las células de *Prototheca*, para hacer que las células hospedadoras recombinantes sean útiles en los métodos descritos en este documento, incluyendo, entre otros, células hospedadoras de *Prototheca moriformis*, *Prototheca zopfii*, *Prototheca krugani*, y *Prototheca stagnora* recombinantes. La descripción de estos métodos y materiales se divide en subsecciones para la comodidad del lector. En la subsección 1 se describen los métodos de transformación. En la subsección 2 se describen métodos de ingeniería genética que utilizan recombinación homóloga. En la subsección 3 se describen los vectores de expresión y los componentes.

1. Métodos de ingeniería - transformación

[0144] Las células se pueden transformar mediante cualquier técnica adecuada, incluyendo, por ejemplo, biolística, electroporación (véase Maruyama y col. (2004), *Biotechnology Techniques* 8:821-826), transformación de perlas de vidrio y transformación de filamentos de carburo de silicio. Otro método que se puede utilizar implica la formación de protoplastos y el uso de CaCl₂ y polietilenglicol (PEG) para introducir ADN recombinante en microalgas u otras células microbianas (véase Kim y col. (2002), *Mar. Biotechnol.* 4:63-73, que describe el uso de este método para la transformación de *Chorella ellipsoidea*). La cotransformación de microalgas se puede utilizar para introducir dos moléculas de vector distintas en una célula de manera simultánea (véase, por ejemplo, *Protist*, 2004 Dec; 155 (4): 381-93).

[0145] También pueden utilizarse métodos biolísticos (véase, por ejemplo, Sanford, *Trends In Biotech.* (1988) 6:299-302, patente de EE. UU. n.º 4,945,050); electroporación (Fromm y col., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. (EE. UU.)* (1985) 82:5824-5828), el uso de un rayo láser, la microinyección o cualquier otro método capaz de introducir ADN en una microalga para la transformación de microbios oleaginosos, como una célula de *Prototheca*.

2. Métodos de ingeniería - recombinación homóloga

[0146] La recombinación homóloga está relacionada con la capacidad de secuencias de ADN complementarias para alinear e intercambiar regiones de homología. En el proceso de recombinación homóloga, el ADN transgénico ("donante") que contiene secuencias homólogas a las secuencias genómicas a las que se dirige ("plantilla") se introduce en el organismo y luego se recombina en el genoma en el sitio de las secuencias homólogas genómicas correspondientes. Los pasos mecánicos de este proceso, en la mayoría de los casos, incluyen: (1) el emparejamiento de segmentos de ADN homólogos; (2) la introducción de roturas de doble cadena en la molécula de ADN donante; (3) la invasión de la molécula de ADN plantilla por los extremos libres del ADN del donante seguida de síntesis de

ADN; y (4) la resolución de eventos de reparación de ruptura de doble cadena que dan como resultado productos de recombinación finales.

5 [0147] La capacidad de llevar a cabo una recombinación homóloga en un organismo hospedador tiene muchas implicaciones prácticas para lo que se puede hacer a nivel genético molecular y es útil en la generación de un microbio oleaginoso que pueda producir aceites personalizados (lípidos). Por su propia naturaleza, la recombinación homóloga es un evento preciso de selección génica; por lo tanto, la mayoría de las líneas transgénicas generadas con la misma secuencias de direccionamiento serán esencialmente idénticas en términos de fenotipo, lo que requerirá la selección de muchos menos eventos de transformación. La recombinación homóloga también se dirige a eventos de inserción de genes en el cromosoma hospedador, lo que da como resultado una excelente estabilidad genética, incluso en ausencia de selección genética. Debido a que diferentes locus cromosómicos pueden afectar a la expresión génica, incluso de promotores/UTR heterólogos, la recombinación homóloga puede ser un método para consultar locus en un entorno genómico desconocido y para evaluar el impacto de un entorno genómico particular en la expresión génica.

15 [0148] Las aplicaciones de ingeniería genética particularmente útiles que utilizan la recombinación homóloga cooptan elementos reguladores específicos del hospedador, como promotores/UTR, para impulsar la expresión de genes heterólogos de una manera altamente específica. Por ejemplo, puede usarse la ablación o inactivación de genes/familias de genes de desaturasa con un gen heterólogo que codifica un marcador selectivo para aumentar el porcentaje global de ácidos grasos saturados producidos en la célula hospedadora. En el ejemplo 4 se describen las construcciones de direccionamiento de recombinación homóloga y un ejemplo práctico de tales ablaciones del gen de la desaturasa (inactivaciones o *knockouts*) generadas en *Prototheca moriformis*. Otro enfoque para disminuir la expresión de un gen endógeno es usar un método inducido por ARN de regulación a la baja o silenciamiento de la expresión génica que incluye, entre otros, un enfoque de ARNi o antisentido, así como un enfoque de ARNbc. Los enfoques antisentido, ARNi, ARNbc y ARN horquillado son ampliamente conocidos en la técnica e incluyen la introducción de una construcción de expresión que, cuando se expresa como ARNm, conduce a la formación de un ARN horquillado o una construcción de expresión que contiene una porción del gen diana que se transcribe en la orientación antisentido. Todos estos enfoques dan como resultado la disminución de la expresión del gen diana. En el ejemplo 4 también se describen construcciones de expresión y un ejemplo práctico de la regulación a la baja de un gen endógeno de desaturasa de ácidos grasos delta 12 (FADc) de *Prototheca moriformis* mediante un enfoque de ARN horquillado.

35 [0149] Gracias a que la recombinación homóloga es un evento preciso de direccionamiento génico, se puede usar para modificar cualquier nucleótido dentro de un gen o región de interés con precisión, siempre que se hayan identificado suficientes regiones flanqueantes. Por lo tanto, la recombinación homóloga puede usarse como medio para modificar secuencias reguladoras que afectan a la expresión génica de ARN y/o proteínas. También se puede usar para modificar regiones codificantes de proteínas para modificar actividades enzimáticas tales como especificidad de sustrato, afinidad y Km, efectuando así el cambio deseado en el metabolismo de la célula hospedadora. La recombinación homóloga proporciona un medio poderoso para manipular el genoma del hospedador, lo que da como resultado la selección de genes, la conversión de genes, la delección de genes, la duplicación de genes y la inversión de genes, y el intercambio de elementos reguladores de la expresión de genes, como promotores, potenciadores y 3'UTR.

45 [0150] La recombinación homóloga se puede lograr utilizando construcciones de direccionamiento que contienen fragmentos de secuencias endógenas para "dirigirse a" o actuar sobre el gen o la región de interés dentro del genoma de la célula hospedadora endógena. Dichas secuencias de direccionamiento pueden ubicarse en el extremo 5' del gen o región de interés, en el extremo 3' del gen/región de interés, o incluso flanquear el gen/la región de interés. Tales construcciones de direccionamiento pueden transformarse en la célula hospedadora como un ADN plasmídico superenrollado con un esqueleto de vector adicional, un producto de PCR sin un esqueleto de vector o como una molécula linealizada. En algunos casos, puede ser ventajoso exponer primero las secuencias homólogas dentro del ADN transgénico (ADN donante) con una enzima de restricción. Este paso puede aumentar la eficacia de la recombinación y disminuir la aparición de eventos no deseados. Otros métodos para aumentar la eficacia de la recombinación incluyen el uso de la PCR para generar ADN transgénico transformante que contiene extremos lineales homólogos a las secuencias genómicas sobre las que se desea actuar.

55 [0151] Para fines ilustrativos y sin intención limitativa, las regiones de secuencias de ADN donadoras que son útiles para la recombinación homóloga incluyen la región KE858 de ADN de *Prototheca moriformis*. KE858 es un fragmento genómico de 1,3 kb que abarca parte de la región codificante de una proteína que comparte homología con la familia de proteínas del ARN de transferencia (ARNt). Mediante transferencias de Southern se ha demostrado que la secuencia KE858 está presente en una sola copia en el genoma de *Prototheca moriformis* (UTEX 1435). Esta región

y los ejemplos del uso de esta región para el direccionamiento de la recombinación homóloga se han descrito en la Solicitud PCT N.º PCT/US2009/66142. Otra región útil del ADN donador es la secuencia genómica 6S.

3. Vectores y componentes de vectores

[0152] Los vectores para la transformación de microorganismos se pueden preparar mediante técnicas conocidas y familiares para los expertos en la materia a la vista de la descripción del presente documento. Un vector normalmente contiene uno o más genes, en donde cada gen codifica la expresión de un producto deseado (el producto génico) y está unido operativamente a una o más secuencias de control que regulan la expresión génica o dirigen el producto génico hacia una ubicación particular en la célula recombinante. Para ayudar al lector, esta subsección se divide en subsecciones. En la subsección A se describen secuencias de control que pueden estar contenidas en vectores. En la subsección B se describen genes típicamente contenidos en vectores, así como métodos de optimización de codones y genes preparados con ellos.

A. Secuencias de control

[0153] Las secuencias de control son ácidos nucleicos que regulan la expresión de una secuencia codificante o que dirigen un producto génico a una ubicación particular dentro o fuera de una célula. Las secuencias de control que regulan la expresión incluyen, por ejemplo, promotores que regulan la transcripción de una secuencia codificante y terminadores que terminan la transcripción de una secuencia codificante. Otra secuencia de control es una secuencia no traducida en 3' ubicada en el extremo de una secuencia codificante que codifica una señal de poliadenilación. Las secuencias de control que dirigen productos génicos a ubicaciones particulares incluyen aquellas que codifican péptidos señal, que dirigen la proteína a la que están unidas a una ubicación particular dentro o fuera de la célula.

[0154] Por lo tanto, un diseño de vector ejemplar para la expresión de un gen exógeno en una microalga u otro microbio oleaginoso contiene una secuencia de codificación para un producto génico deseado (por ejemplo, un marcador seleccionable, una enzima de modificación de la ruta de lípidos o una enzima de utilización de sacarosa) en unión operativa con un promotor activo de la microalga u otro microbio oleaginoso. Alternativamente, si el vector no contiene un promotor en unión operativa con la secuencia de codificación de interés, la secuencia de codificación se puede transformar en las células de manera que se una operativamente a un promotor endógeno en el punto de integración del vector. Se ha demostrado que el método de transformación sin promotores funciona en microalgas (véase, por ejemplo, *Plant Journal* 14: 4, (1998), págs. 441-447) y otros microbios.

[0155] Muchos promotores son activos en las microalgas, incluyendo promotores que son endógenos a las algas que se transforman, así como promotores que no son endógenos a las algas que se transforman (es decir, promotores de otras algas, promotores de plantas superiores y promotores de virus de plantas o virus de algas). Los promotores exógenos y/o endógenos ilustrativos que son activos en las microalgas (así como los genes de resistencia a los antibióticos funcionales en las microalgas) se describen en la publicación PCT N.º 2008/151149 y las referencias citadas en ella.

[0156] El promotor usado para expresar un gen exógeno puede ser el promotor unido de manera natural a ese gen o puede ser un promotor de gen heterólogo. Algunos promotores son activos en más de una especie de microalgas. Otros promotores son específicos para una especie. Los promotores ilustrativos incluyen promotores como la β -tubulina de *Chlamydomonas reinhardtii*, utilizada en los Ejemplos siguientes, y promotores virales, como los promotores derivados del virus del mosaico de la coliflor (CMV) y el virus de la *Chlorella*, que han demostrado ser activos en múltiples especies de microalgas (véase, por ejemplo, *Plant Cell Rep.* 2005 Mar;23(10-11):727-35; *J Microbiol.* 2005 Aug;43(4):361-5; *Mar Biotechnol (New York)*. 2002 Jan;4(1):63-73). Otro promotor que es apto para el uso en la expresión de genes exógenos en *Prototheca* es el promotor de glutamato deshidrogenasa/5'UTR de *Chlorella sorokiniana*. Normalmente, se utilizan al menos 10, 20, 30, 40, 50 o 60 nucleótidos o más de estas secuencias que contienen un promotor. Los promotores ilustrativos útiles para la expresión de genes exógenos en *Prototheca* se enumeran en el listado de secuencias de esta solicitud, como el promotor del gen HUP1 de *Chlorella* (SEQ ID N.º 1) y el promotor de nitrato reductasa de *Chlorella ellipsoidea* (SEQ ID N.º2). Los promotores de virus de *Chlorella* también se pueden usar para expresar genes en *Prototheca*, como la SEQ ID N.º 1-7 de la patente de EE. UU. n.º 6,395,965. Puede encontrarse promotores adicionales activos en *Prototheca*, por ejemplo, en *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;Oct 14 204 (1): 187-94; *Plant Mol Biol.* 1994 Oct; 26 (1): 85-93; *Virology.* 2004 Aug 15; 326 (1): 150-9; y *Virology.* 2004 Jan 5; 318 (1): 214-23.

[0157] Un promotor generalmente se puede caracterizar como constitutivo o inducible. Los promotores constitutivos son generalmente activos o funcionan para activar la expresión en todo momento (o en ciertos momentos del ciclo de vida celular) al mismo nivel. Los promotores inducibles, por el contrario, están activos (o se vuelven inactivos) o se regulan significativamente al alza o a la baja solo en respuesta a un estímulo. Ambos tipos de promotores tienen un

5 uso en los métodos descritos en este documento. Entre los promotores inducibles útiles en los métodos descritos en este documento se incluyen aquellos que median la transcripción de un gen unido operativamente en respuesta a un estímulo, como una molécula pequeña proporcionada exógenamente (por ejemplo, glucosa, como en la SEQ ID N.º 1), temperatura (calor o frío), falta de nitrógeno en los medios de cultivo, etc. Los promotores adecuados pueden activar la transcripción de un gen esencialmente silencioso o regular al alza, preferiblemente sustancialmente, la transcripción de un gen unido operativamente que se transcribe a un nivel bajo.

10 [0158] La inclusión de la secuencia de control de la región de terminación es opcional y, si se emplea, la elección será principalmente por conveniencia, ya que las regiones de terminación son relativamente intercambiables. La región de terminación puede ser nativa de la región de iniciación de la transcripción (el promotor), puede ser nativa de la secuencia de ADN de interés o puede obtenerse de otra fuente. Véase, por ejemplo, Chen y Orozco, *Nucleic Acids Res.* (1988) 16:8411.

15 [0159] Los métodos descritos en el presente documento también pueden hacer uso de vectores que contienen secuencias de control y genes recombinantes que proporcionan la expresión compartimentada de un gen de interés. Los orgánulos para el direccionamiento son los cloroplastos, los plastidios, las mitocondrias y el retículo endoplásmico. Además, los métodos descritos en este documento también pueden hacer uso de secuencias de control y genes recombinantes y vectores que los contienen descritos en este documento que permiten la secreción de una proteína fuera de la célula.

20 [0160] Las proteínas expresadas en el genoma nuclear de *Prototheca* se pueden dirigir al plastidio utilizando señales de direccionamiento a plastidios. Se conocen secuencias de direccionamiento a plastidios que son endógenas de *Chlorella*, como los genes del genoma nuclear de *Chlorella* que codifican proteínas que se dirigen al plastidio; véase, por ejemplo, los números de acceso de GenBank AY646197 y AF499684, y los vectores que contienen dichas secuencias de control se pueden usar en los métodos descritos en el presente documento para dirigir la expresión de una proteína a un plastidio de *Prototheca*.

25 [0161] Los ejemplos siguientes describen el uso de secuencias de direccionamiento a plastidios de algas para dirigir proteínas heterólogas al compartimento correcto de la célula hospedadora. Se crearon bibliotecas de ADN utilizando células de *Prototheca moriformis* y *Chlorella protothecoides*, y se describen en la Solicitud PCT N.º PCT/US2009/066142.

30 [0162] La expresión de un polipéptido en *Prototheca* o en otro microbio oleaginoso puede dirigirse al retículo endoplásmico. La inclusión de una señal de retención o clasificación adecuada en un vector de expresión garantiza que las proteínas se retengan en el retículo endoplásmico (RE) y no sigan hacia el aparato de Golgi. Por ejemplo, el vector IMPACTVECTOR1.3, de Wageningen UR-Plant Research International, incluye la conocida señal de clasificación o retención KDEL. Con este vector, la retención en el RE tiene una ventaja práctica porque se ha observado que mejora los niveles de expresión por quintuplicado. La razón principal de esto parece ser que el RE contiene concentraciones más bajas y/o diferentes proteasas responsables de la degradación postraduccional de las proteínas expresadas que las que están presentes en el citoplasma. Se conocen señales de retención en el RE funcionales en microalgas verdes. Por ejemplo, véase *Proc Natl Acad Sci EE. UU.* 2005 Apr 26; 102 (17): 6225-30.

35 [0163] Alternativamente, se puede direccionar un polipéptido para la secreción fuera de la célula en el medio de cultivo. Véase Hawkins y col., *Current Microbiology* vol. 38 (1999), págs. 335-341 para ver ejemplos de señales de secreción activas en *Chlorella* que también se pueden utilizar en otras microalgas, como *Prototheca*.

B. Genes y optimización de codones

40 [0164] Normalmente, un gen incluye un promotor, una secuencia codificante y secuencias de control de la terminación. Cuando se ensambla mediante tecnología de ADN recombinante, un gen puede denominarse casete de expresión y puede estar flanqueado por sitios de restricción para una inserción conveniente en un vector que se usa para introducir el gen recombinante en una célula hospedadora. El casete de expresión puede estar flanqueado por secuencias de ADN del genoma u otro ácido nucleico diana para facilitar la integración estable del casete de expresión en el genoma mediante recombinación homóloga. Alternativamente, el vector y su casete de expresión pueden permanecer sin integrar, en cuyo caso el vector normalmente incluye un origen de replicación, que es capaz de proporcionar la replicación del ADN del vector heterólogo.

45 [0165] Un gen común presente en un vector es un gen que codifica una proteína, cuya expresión permite diferenciar la célula recombinante que contiene la proteína de las células que no expresan la proteína. Tal gen, o su producto génico correspondiente, se denomina marcador seleccionable. Cualquiera de una amplia variedad de marcadores seleccionables puede emplearse en una construcción transgénica útil para transformar *Prototheca* o cualquier otro

microbio oleaginoso útil en los métodos descritos en este documento. Entre los ejemplos de marcadores seleccionables adecuados se incluyen el gen de resistencia G418, el gen de la nitrato reductasa (véase Dawson y col. (1997), *Current Microbiology* 35:356-362), el gen de la higromicina fosfotransferasa (HPT; véase Kim y col. (2002), *Mar. Biotechnol.* 4:63-73), el gen de la neomicina fosfotransferasa y el gen ble, que confiere resistencia a la fleomicina (Huang y col. (2007), *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72:197-205). Los métodos para determinar la sensibilidad de las microalgas y otros microbios oleaginosos a los antibióticos son ampliamente conocidos. Por ejemplo, véase *Mol Gen Genet.* 1996 Oct 16; 252 (5): 572-9.

[0166] También se pueden emplear otros marcadores seleccionables que no están basados en antibióticos en una construcción transgénica útil para transformar microalgas en general, incluyendo especies de *Prototheca*. Los genes que confieren la capacidad de utilizar algunas fuentes de carbono que antes no podían ser utilizadas por las microalgas también se pueden utilizar como marcador seleccionable. A modo de ilustración, las cepas de *Prototheca moriformis* suelen tener dificultades para crecer, si es que lo hacen, con sacarosa. El uso de una construcción que contiene un gen de sacarasa puede conferir la capacidad de los transformantes positivos para crecer en sacarosa como sustrato de carbono.

[0167] En los métodos descritos en el presente documento, el vector de expresión se puede usar para preparar una célula hospedadora recombinante que incluirá al menos dos, y a menudo tres, genes, si uno de los genes es un marcador seleccionable. Por ejemplo, una *Prototheca* modificada genéticamente puede crearse por transformación con vectores que comprenden, además de un marcador seleccionable, uno o más genes exógenos, como, por ejemplo, un gen de sacarasa o un gen de acil ACP-tioesterasa. Uno o ambos genes pueden expresarse usando un promotor inducible, lo que permite controlar el tiempo relativo de expresión de estos genes para mejorar la producción de lípidos y la conversión a ésteres de ácidos grasos. La expresión de dos o más genes exógenos puede estar bajo el control del mismo promotor inducible o bajo el control de diferentes promotores inducibles (o constitutivos). En esta última situación, se puede inducir la expresión de un primer gen exógeno durante un primer período de tiempo (durante el cual se puede inducir o no la expresión de un segundo gen exógeno), y se puede inducir la expresión de un segundo gen exógeno durante un segundo período de tiempo (durante el cual la expresión de un primer gen exógeno puede o no inducirse).

[0168] Los dos o más genes exógenos (además de cualquier marcador seleccionable) pueden ser: una acil-ACP tioesterasa y una acil-CoA/aldehído reductasa, cuya acción combinada produce un producto alcohólico. Además se proporcionan otras combinaciones de genes exógenos, incluyendo, sin limitación, una acil-ACP tioesterasa y una acil-CoA reductasa para generar aldehídos. El vector puede proporcionar la combinación de una acil-ACP tioesterasa, una acil-CoA reductasa y una aldehído graso descarboxilasa para generar alcanos. En cada uno de estos casos, uno o más de los genes exógenos pueden expresarse utilizando un promotor inducible.

[0169] Otros vectores ilustrativos que expresan dos o más genes exógenos incluyen los que codifican tanto un transportador de sacarosa como una enzima sacarasa y los que codifican tanto un marcador seleccionable como una sacarasa secretada. La *Prototheca* recombinante u otra microalga o célula microbiana transformada con cualquier tipo de vector produce lípidos a un menor coste de fabricación debido a la capacidad diseñada para usar caña de azúcar (y azúcares derivados de la caña de azúcar) como fuente de carbono. La inserción de los dos genes exógenos descritos anteriormente se puede combinar con la interrupción de la biosíntesis de polisacáridos a través de mutagénesis dirigida y/o aleatoria, que dirige un flujo de carbono aún mayor hacia la producción de lípidos. Individualmente y en combinación, la conversión trófica, la ingeniería para alterar la producción de lípidos y el tratamiento con enzimas exógenas alteran la composición lipídica producida por un microorganismo. La alteración puede ser un cambio en la cantidad de lípidos producidos, la cantidad de una o más especies de lípidos (ácidos grasos) producida en relación con otras especies de lípidos y/o los tipos de especies de lípidos producidos en el microorganismo. Por ejemplo, las microalgas pueden diseñarse para que produzcan una mayor cantidad y/o porcentaje de TAG.

[0170] Para la expresión óptima de una proteína recombinante, es beneficioso emplear secuencias de codificación que produzcan ARNm con codones utilizados preferentemente por la célula hospedadora que se va a transformar. Por lo tanto, la expresión adecuada de los transgenes puede requerir que el uso de codones del transgén coincida con el sesgo de codones específico del organismo en el que se expresa el transgén. Los mecanismos precisos que subyacen a este efecto son muchos, pero incluyen el equilibrio adecuado de los grupos de ARNt aminoacilados disponibles con las proteínas que se sintetizan en la célula, junto con una traducción más eficiente del ARN mensajero (ARNm) transgénico cuando se satisface esta necesidad. Cuando el uso de codones en el transgén no está optimizado, las reservas de ARNt disponibles no son suficientes para permitir una traducción eficiente del ARNm heterólogo, lo que da como resultado el estancamiento y la terminación ribosomal y la posible inestabilidad del ARNm transgénico.

[0171] En este documento se describen ácidos nucleicos con codones optimizados útiles para la expresión exitosa de proteínas recombinantes en *Prototheca*. El uso de codones en especies de *Prototheca* se analizó mediante el estudio de secuencias de ADNc aisladas de *Prototheca moriformis*. Este análisis representa la interrogación sobre 24 000 codones, que dio como resultado la Tabla 2 siguiente.

Tabla 2. Uso preferido de codones en cepas de *Prototheca*.

Ala	GCG	345 (0,36)	Asn	AAT	8 (0,04)
	GCA	66 (0,07)		AAC	201 (0,96)
	GCT	101 (0,11)	Pro	CCG	161 (0,29)
	GCC	442 (0,46)		CCA	49 (0,09)
Cys	TGT	12(0,10)	CCT	71(0,13)	
	TGC	105 (0,90)	CCC	267 (0,49)	
Asp	GAT	43 (0,12)	Gin	CAG	226 (0,82)
	GAC	316 (0,88)		CAA	48 (0,18)
Glu	GAG	377 (0,96)	Arg	AGG	33 (0,06)
	GAA	14 (0,04)		AGA	14 (0,02)
Phe	TTT	89 (0,29)	CGG	102 (0,18)	
		216 (0,71)	CGA	49 (0,08)	
	TTC	216 (0,71)	CGT	51(0,09)	
			CGC	331 (0,57)	
Gly	GGG	92 (0,12)	Ser	AGT	16(0,03)
	GGA	56 (0,07)		AGC	123 (0,22)
	GGT	76 (0,10)		TCG	152 (0,28)
	GGC	559 (0,71)		TCA	31(0,06)
His	CAT	42(0,21)	TCT	55 (0,10)	
	CAC	154 (0,79)	TCC	173 (0,31)	
Ile	ATA	4 (0,01)	Thr	ACG	184 (0,38)
	ATT	30 (0,08)		ACA	24 (0,05)
	ATC	338 (0,91)		ACT	21 (0,05)
				ACC	249 (0,52)
Lys	AAG	284 (0,98)	Val	GTG	308 (0,50)
	AAA	7(0,02)		GTA	9 (0,01)
Leu	TTG	26(0,04)		GTT	35 (0,06)
	TTA	3 (0,00)	GTC	262 (0,43)	
	CTG	447 (0,61)	Trp	TGG	107 (1,00)
	CTA	20(0,03)		Tyr	TAT
	CTT	45 (0,06)	TAC		180 (0,95)
	CTC	190 (0,26)			
Met	ATG	191 (1,00)			
			Terminador	TGA/T AG/T AA	

[0172] El gen del vector recombinante puede haberse sometido a optimización de codones con referencia a una cepa de microalgas que no sea una cepa de *Prototheca* u otra cepa microbiana. Por ejemplo, los métodos de

recodificación de genes para la expresión en microalgas se describen en la patente de EE.UU. n.º 7,135,290. Hay información adicional para la optimización de codones que está disponible, por ejemplo, en la base de datos de uso de codones de GenBank.

5 [0173] Si bien los métodos y materiales descritos en este documento permiten la introducción de cualquier gen exógeno en *Prototheca* u otras microalgas u otros microbios oleaginosos, los genes relacionados con la utilización de sacarosa y la modificación de la ruta de los lípidos son de particular interés para los microbios que no pueden utilizarla de forma natural o para los microbios que la utilizan de manera ineficaz, como se analiza en las siguientes secciones.

10 IV. UTILIZACIÓN DE SACAROSA

[0174] La célula de *Prototheca* recombinante o de otra microalga puede contener uno o más genes de utilización de sacarosa exógenos. Dichos uno o más genes que codifican una o más proteínas pueden seleccionarse del grupo que consiste en una fructoquinasa, una glucoquinasa, una hexoquinasa, una sacarasa, un transportador de sacarosa. Por ejemplo, la expresión de un transportador de sacarosa y una sacarasa permite a *Prototheca* o cualquier otra microalga u otra célula microbiana transportar sacarosa al interior de la célula desde el medio de cultivo e hidrolizar sacarosa para producir glucosa y fructosa. Opcionalmente, también se puede expresar una fructoquinasa en los casos en que la actividad de hexoquinasa endógena es insuficiente para la fosforilación máxima de fructosa. Los números de registro de Genbank CAD91334, CAB92307 y CAA53390 son ejemplos de transportadores de sacarosa adecuados. Los números de registro de Genbank P26984, P26420 y CAA43322 son ejemplos de fructoquinasas adecuadas.

[0175] En una forma de realización, los métodos descritos en este documento se ponen en práctica con una célula hospedadora de *Prototheca* que secreta una sacarasa. La secreción de una sacarasa obvia la necesidad de expresión de un transportador que pueda transportar sacarosa al interior de la célula. Esto se debe a que una invertasa secretada cataliza la conversión de una molécula de sacarosa en una molécula de glucosa y una molécula de fructosa, las cuales pueden ser transportadas y utilizadas por microbios útiles en los métodos descritos en este documento. Por ejemplo, la expresión de una sacarasa (como la SEQ ID N.º 3) con una señal de secreción (como la de SEQ ID N.º 4 (de levadura), la SEQ ID N.º 5 (de plantas superiores), la SEQ ID NO :6 (señal de secreción de consenso eucariota), y la SEQ ID N.º7 (combinación de secuencia señal de plantas superiores y consenso eucariota) genera actividad invertasa fuera de la célula. La expresión de dicha proteína, tal como lo permite la metodología de ingeniería genética descrita en este documento, permite que las células que ya son capaces de utilizar glucosa extracelular como fuente de energía utilicen sacarosa como fuente de energía extracelular.

[0176] Las especies de *Prototheca* que expresan una invertasa que se secreta en un medio que contiene sacarosa son una especie de microalgas preferida para la producción de aceite microbiano para su uso como fluido dieléctrico u otro lubricante (para la producción de aceites alimentarios, algunos consumidores pueden preferir el aceite producido con microbios no recombinantes). La expresión y el direccionamiento extracelular de esta proteína completamente activa permite que las células hospedadoras resultantes crezcan en sacarosa, mientras que sus equivalentes no transformadas no pueden. Por lo tanto, en la práctica de los métodos descritos en este documento se pueden utilizar células recombinantes de *Prototheca* con un gen de invertasa con codones optimizados, incluyendo, entre otros, el gen de invertasa de levadura, integrado en su genoma de manera que el gen de invertasa se exprese según lo evaluado por la actividad de invertasa y la hidrólisis de sacarosa. Los genes de invertasa son útiles como marcadores seleccionables en *Prototheca* y otras células recombinantes de microalgas, ya que tales células pueden crecer en sacarosa, mientras que sus equivalentes no transformadas no pueden; y los métodos para seleccionar células hospedadoras recombinantes usando una invertasa son un marcador seleccionable poderoso para la genética molecular de algas.

[0177] La expresión exitosa de una sacarasa en *Prototheca* también demuestra que las proteínas heterólogas (recombinantes) pueden expresarse en una célula de alga y transitar con éxito fuera de la célula y al medio de cultivo en una forma completamente activa y funcional. Por lo tanto, están disponibles métodos y reactivos para expresar una amplia y diversa gama de proteínas heterólogas en microalgas y secretarlas al exterior de la célula hospedadora. Dichas proteínas incluyen, por ejemplo, enzimas industriales tales como, por ejemplo, lipasas, proteasas, celulasas, pectinasas, amilasas, esterasas, oxidorreductasas, transferasas, lactasas, isomerasas e invertasas.

[0178] Entre los ejemplos de sacarosas adecuadas se incluyen las identificadas por los números de acceso de Genbank CAB95010, NP_012104 y CAA06839. Los ejemplos no limitantes de invertasas adecuadas se enumeran a continuación en la Tabla 3. Las secuencias de aminoácidos para cada invertasa enumerada se incluyen en el Listado de secuencias que aparece más adelante. En algunos casos, el gen de utilización de sacarosa exógeno adecuado

para usar en los métodos y vectores descritos en el presente documento codifica una sacarasa que tiene al menos un 40, 50, 60, 75 o 90 % o más de identidad de aminoácidos con una sacarasa seleccionada de la Tabla 3.

Tabla 3. Sacarasa.

Descripción	Organismo	N.º acceso GenBank	SEQ ID N.º
Invertasa	<i>Chicorium intybus</i>	Y11124	SEQ ID N.º20
Invertasa	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	AB011433	SEQ ID N.º21
Beta-fructofuranosidasa (invertasa)	<i>Pichia anomala</i>	X80640	SEQ ID N.º22
Invertasa	<i>Debaryomyces occidentalis</i>	X17604	SEQ ID N.º23
Invertasa	<i>Oryza sativa</i>	AF019113	SEQ ID N.º24
Invertasa	<i>Allium cepa</i>	AJ006067	SEQ ID N.º25
Invertasa	<i>Beta vulgaris subsp. Vulgaris</i>	AJ278531	SEQ ID N.º26
Beta-fructofuranosidasa (invertasa)	<i>Bifidobacterium breve UCC2003</i>	AAT28190	SEQ ID N.º27
Invertasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NP_012104	SEQ ID N.º8 (nucleótido)
			SEQ ID N.º28 (aminoácido)
Invertasa A	<i>Zymomonas mobilis</i>	AAO38865	SEQ ID N.º29

5 [0179] La secreción de una invertasa al medio de cultivo por *Prototheca* permite que las células crezcan tanto en la melaza de desecho del procesamiento de la caña de azúcar como en la glucosa pura de grado reactivo; el uso de este producto de desecho de bajo valor del procesamiento de la caña de azúcar puede proporcionar ahorros significativos en los costes de producción de lípidos y otros aceites. Por lo tanto, los métodos descritos en este documento pueden implicar el uso de un cultivo microbiano que contenga una población de *Prototheca* u otros microorganismos de microalgas, y un medio de cultivo que comprenda (i) sacarosa y (ii) una enzima sacarasa. La sacarosa del cultivo puede provenir de sorgo, remolacha azucarera, caña de azúcar, melaza o material celulósico despolimerizado (que opcionalmente puede contener lignina). Si bien los microbios ejemplificados aquí se modifican de manera que puedan utilizar sacarosa, los métodos y reactivos descritos en este documento se pueden aplicar de manera que las materias primas, como la celulosa, sean utilizables por un microbio hospedador diseñado con la capacidad de secretar celulasas, pectinasas, isomerasas o similares, de modo que los productos de descomposición de las reacciones enzimáticas ya no sean simplemente tolerados, sino que el hospedador los utilice como fuente de carbono.

20 V. INGENIERÍA DE LA RUTA DE LOS LÍPIDOS

25 [0180] Además de alterar la capacidad de *Prototheca* (u otras microalgas u otras células microbianas) para utilizar materias primas como materias primas que contienen sacarosa, las *Prototheca* recombinantes (u otras microalgas u otras células microbianas) que se han modificado para alterar las propiedades y/o proporciones de los lípidos producidos son útiles en los métodos descritos en el presente documento. La ruta puede modificarse además, o alternativamente, para alterar las propiedades y/o proporciones de diversas moléculas lipídicas producidas a través del procesamiento enzimático de lípidos e intermedios en la ruta de los ácidos grasos. En varios casos, las células recombinantes tienen, en comparación con sus equivalentes no transformadas, una producción de lípidos aumentada u optimizada por unidad de volumen y/o por unidad de tiempo, longitud de cadena de carbono (por ejemplo, para productos químicos industriales, incluidos, entre otros, fluidos dieléctricos, y otras aplicaciones que requieren materia prima lipídica), número reducido de enlaces dobles o triples, opcionalmente a cero, y aumento de la relación hidrógeno:carbono de una especie particular de lípido (ácido graso) o de una población de lípidos distintos.

35 [0181] En casos particulares, una o más enzimas clave que controlan los puntos de ramificación en el metabolismo para la síntesis de ácidos grasos se han regulado al alza o a la baja para mejorar la producción de lípidos. La regulación al alza se puede lograr, por ejemplo, mediante la transformación de células con construcciones de expresión en las que se expresa un gen que codifica la enzima de interés, por ejemplo, utilizando un promotor fuerte y/o elementos potenciadores que aumentan la transcripción. Dichas construcciones pueden incluir un marcador seleccionable de modo que los transformantes puedan someterse a selección, que también puede usarse para la amplificación de la construcción y un aumento concomitante en el nivel de expresión de la enzima codificada. Los ejemplos de enzimas adecuadas para la regulación al alza según los métodos descritos en el presente incluyen la

piruvato deshidrogenasa, que desempeña un papel en la conversión del piruvato en acetil-CoA (entre los ejemplos, algunos de microalgas, se incluyen los números de acceso de Genbank NP_415392; AAA53047; Q1XDM1; y CAF05587). La regulación al alza de la piruvato deshidrogenasa puede aumentar la producción de acetil-CoA y, por lo tanto, aumentar la síntesis de ácidos grasos. La Acetil-CoA carboxilasa cataliza el paso inicial en la síntesis de ácidos grasos. En consecuencia, esta enzima se puede regular para aumentar la producción de ácidos grasos (entre los ejemplos, algunos de microalgas, se incluyen los números de acceso de Genbank BAA94752; AAA75528; AAA81471; YP_537052; YP_536879; NP_045833 y BAA57908). La producción de ácidos grasos también se puede aumentar mediante la regulación al alza de la proteína transportadora de acilo (ACP), que transporta las cadenas de acilo en crecimiento durante la síntesis de ácidos grasos (entre los ejemplos, algunos de microalgas, se incluyen los números de acceso de Genbank A0T0F8; P51280; NP_849041; YP_874433). La glicerol-3-fosfato aciltransferasa cataliza el paso que limita la tasa de la síntesis de ácidos grasos. La regulación al alza de esta enzima puede aumentar la producción de ácidos grasos (los ejemplos, algunos de microalgas incluyen los números de acceso de Genbank AAA74319; AAA33122; AAA37647; P44857; y ABO94442).

[0182] La regulación al alza y/o a la baja de genes se puede aplicar a reguladores globales que controlan la expresión de los genes de las rutas biosintéticas de ácidos grasos. En consecuencia, uno o más reguladores globales de la síntesis de ácidos grasos pueden regularse al alza o a la baja, según corresponda, para inhibir o mejorar, respectivamente, la expresión de una pluralidad de genes sintéticos de ácidos grasos y, en última instancia, para aumentar la producción de lípidos. Entre los ejemplos se incluyen proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides (SREBP), como SREBP-1a y SREBP-1c (para ver ejemplos, consúltense los números de acceso de Genbank NP_035610 y Q9WTN3).

[0183] Los métodos descritos en este documento también se pueden poner en práctica con células de *Prototheca* recombinantes (u otras microalgas u otros microbios) que se han modificado para que contengan uno o más genes exógenos que codifican enzimas que modifican los lípidos como, por ejemplo, acil-ACP tioesterasas (véase la Tabla 4), acil-CoA/aldehído reductasas (véase la Tabla 6), acil-CoA reductasas, aldehído graso descarboxilasa, aldehído graso reductasas, desaturasas (tales como estearoil-ACP desaturasas y acil desaturasas) y escualeno sintasas (consúltense el número de acceso de GenBank AF205791). En algunos casos, los genes que codifican una acil-ACP tioesterasa y una proteína transportadora de acilo expresada de forma natural se transforman en una célula de *Prototheca* (u otra microalga u otra célula microbiana), opcionalmente con uno o más genes que codifican otras enzimas que modifican los lípidos. En otros casos, la ACP y la acil-ACP tioesterasa pueden tener una afinidad entre sí que otorga una ventaja cuando las dos se usan juntas en los microbios y los métodos descritos en este documento, independientemente de si se expresan o no de forma conjunta de forma natural en un tejido u organismo particular. Por lo tanto, en algunas formas de realización, la presente invención contempla tanto pares coexpresados de forma natural de estas enzimas como aquellos que comparten una afinidad para interactuar entre sí para facilitar la escisión de una cadena de carbono de longitud específica de la ACP.

[0184] En otros casos, un gen exógeno que codifica una desaturasa se transforma en la célula de *Prototheca* (u otra microalga u otra célula microbiana) junto con uno o más genes que codifican otras enzimas que modifican los lípidos para proporcionar modificaciones con respecto a la saturación de lípidos. En otro caso, se sobreexpresa un gen endógeno de desaturasa (por ejemplo, mediante la introducción de copias adicionales del gen) en una célula de *Prototheca* (u otra microalga u otra célula microbiana). La estearoil-ACP desaturasa (véanse, por ejemplo, los números de acceso de GenBank AAF15308; ABM45911 y AAY86086), por ejemplo, cataliza la conversión de estearoil-ACP en oleoil-ACP. La regulación al alza de este gen puede aumentar la proporción de ácidos grasos monoinsaturados producidos por una célula, mientras que la regulación a la baja puede reducir la proporción de monoinsaturados. Con fines ilustrativos, las estearoil-ACP desaturasas (SAD) son responsables de la síntesis de ácidos grasos C18:1 a partir de precursores C18:0. Otra familia de desaturasas son las desaturasas de acilos grasos (FAD), incluidas las desaturasas de ácidos grasos delta 12. Estas desaturasas también proporcionan modificaciones con respecto a la saturación de lípidos. Con fines ilustrativos, las desaturasas de ácidos grasos delta 12 son responsables de la síntesis de ácidos grasos C18:2 a partir de precursores C18:1. De manera similar, la expresión de una o más glicerolípido desaturasas puede controlarse para alterar la relación de ácidos grasos insaturados a saturados tales como ácido graso ω -6 desaturasa, ácido graso ω -3 desaturasa o oleato ω -6 desaturasa. En algunos casos, la desaturasa se puede seleccionar con referencia a una longitud de cadena de carbono deseada, de modo que la desaturasa sea capaz de realizar modificaciones específicas de ubicación dentro de un sustrato con una longitud de carbono específica, o sustratos que tengan una longitud de carbono dentro de un rango específico. En otro caso, si el perfil de ácidos grasos deseado es un aumento de los monoinsaturados (como C16:1 y/o C18:1), la sobreexpresión de una SAD o la expresión de una SAD heteróloga puede combinarse con el silenciamiento o la inactivación (por ejemplo, a través de mutación, ARNi, ARN horquillado, inactivación de un gen endógeno de desaturasa, etc.) de una acilo graso desaturasa (FAD). En el ejemplo 4 siguiente se describe la ablación dirigida o la inactivación de estearoil-ACP desaturasas y desaturasas de ácidos grasos delta 12 y también describe el uso de construcciones antisentido de ARN horquillado para disminuir la expresión de un gen de desaturasa endógeno.

[0185] Por lo tanto, en casos particulares, los microbios de la presente invención se manipulan genéticamente para que expresen uno o más genes exógenos seleccionados de una acil-ACP tioesterasa, una acil-CoA/aldehído reductasa, una acil-CoA reductasa, una aldehído graso reductasa, una desaturasa, una aldehído graso descarboxilasa o una proteína portadora de acilo expresada de forma natural. Los métodos de expresión adecuados se describen anteriormente para la expresión de un gen de lipasa, incluidos, entre otros métodos, la expresión inducible y la expresión compartimentada. Una acil-ACP tioesterasa escinde un ácido graso de una proteína transportadora de acilo (ACP) durante la síntesis de lípidos. A través de un procesamiento enzimático adicional, el ácido graso escindido se combina luego con una coenzima para producir una molécula de acil-CoA. Esta acil-CoA es el sustrato para la actividad enzimática de una acil-CoA reductasa para producir un aldehído, así como para una acil-CoA/aldehído reductasa para producir un alcohol. El aldehído producido por la acción de la acil-CoA reductasa identificada anteriormente es el sustrato para una mayor actividad enzimática por una aldehído graso reductasa para producir un alcohol, o una aldehído graso descarboxilasa para producir un alcano o alqueno.

[0186] En algunos casos, los ácidos grasos, los glicerolípidos o los correspondientes alcoholes primarios, aldehídos, alcanos o alquenos, generados por los métodos descritos en este documento, contienen 16 o 18 átomos de carbono. Los ácidos grasos preferidos para la producción de fluidos dieléctricos o los correspondientes alcoholes, aldehídos, alcanos y alquenos contienen 16-18 átomos de carbono. En algunos casos, los ácidos grasos anteriores son saturados (sin enlaces dobles o triples carbono-carbono; monoinsaturados (enlace doble simple); poliinsaturados (dos o más enlaces dobles; y pueden ser lineales (no cíclicos) o ramificados o una mezcla de los dos tipos). Para los fluidos dieléctricos, se prefieren los ácidos grasos monoinsaturados, especialmente el ácido oleico (C18:1). Para aumentar la producción de lípidos que tengan la longitud de cadena y/o el grado de saturación deseados, se puede diseñar la célula de la microalga para que sobreexpresa una tioesterasa con la especificidad de longitud de cadena deseada, elimine la producción de tioesterasas con especificidad de longitud de cadena más corta o reduzca la expresión de tales genes, y/o inactive los genes de desaturasa responsables del grado de saturación en los lípidos deseados.

[0187] Varias enzimas descritas anteriormente suelen tener una especificidad preferencial para la hidrólisis de un sustrato que contiene un número específico de átomos de carbono. Por ejemplo, una acil-ACP tioesterasa puede tener preferencia por escindir un ácido graso que tiene 12 átomos de carbono de la ACP. En algunos casos, la ACP y la tioesterasa de longitud específica pueden tener una afinidad entre sí que las hace particularmente útiles como combinación (por ejemplo, los genes exógenos de ACP y tioesterasa pueden coexpresarse de forma natural en un tejido u organismo en particular del cual se derivan). Por lo tanto, en varios casos, la célula de *Prototheca* recombinante (u otra microalga u otra célula microbiana) de la invención puede contener un gen exógeno que codifica una proteína con especificidad para catalizar una actividad enzimática (por ejemplo, escisión de un ácido graso de una ACP, reducción de una acil-CoA a un aldehído o un alcohol, o conversión de un aldehído en un alcano) con respecto al número de átomos de carbono contenidos en el sustrato. La especificidad enzimática puede ser, en varios casos, para un sustrato que tiene de 8 a 34 átomos de carbono y, preferiblemente, de 16 a 18 átomos de carbono.

[0188] Otras acil-ACP tioesterasas de adecuadas para usar con los microbios y los métodos descritos en este documento incluyen, entre otros, las enumeradas en la Tabla 4.

Tabla 4. Acil-ACP tioesterasas grasas y números de acceso de GenBank.

Acil-ACP tioesterasa de <i>Umbellularia californica</i> (GenBank #AAC49001)
Acil-ACP tioesterasa de <i>Cinnamomum camphora</i> (GenBank #Q39473)
Acil-ACP tioesterasa de <i>Umbellularia californica</i> (GenBank #Q41635)
Acil-ACP tioesterasa de <i>Myristicafragrans</i> (GenBank #AAB71729)
Acil-ACP tioesterasa de <i>Myristicafragrans</i> (GenBank #AAB71730)
Acil-ACP tioesterasa de <i>Elaeis guineensis</i> (GenBank #ABD83939)
Acil-ACP tioesterasa de <i>Elaeis guineensis</i> (GenBank #AAD42220)
Acil-ACP tioesterasa de <i>Populus tomentosa</i> (GenBank #ABC47311)
Acil-ACP tioesterasa de <i>Arabidopsis thaliana</i> (GenBank #NP_172327)
Acil-ACP tioesterasa de <i>Arabidopsis thaliana</i> (GenBank #CAA85387)
Acil-ACP tioesterasa de <i>Arabidopsis thaliana</i> (GenBank #CAA85388)
Acil-ACP tioesterasa de <i>Gossypium hirsutum</i> (GenBank #Q9SQI3)
Acil-ACP tioesterasa de <i>Cuphea lanceolata</i> (GenBank #CAA54060)
Acil-ACP tioesterasa de <i>Cuphea hookeriana</i> (GenBank #AAC72882)
Acil-ACP tioesterasa de <i>Cuphea calophylla</i> subsp. <i>mesostemon</i> (GenBank #ABB71581)
Acil-ACP tioesterasa de <i>Cuphea lanceolata</i> (GenBank #CAC19933)
Acil-ACP tioesterasa de <i>Elaeis guineensis</i> (GenBank #AAL15645)

Acil-ACP tioesterasa de *Cuphea hookeriana* (GenBank #Q39513)
 Acil-ACP tioesterasa de *Gossypium hirsutum* (GenBank #AAD01982)
 Acil-ACP tioesterasa de *Vitis vinifera* (GenBank #CAN81819)
 Acil-ACP tioesterasa de *Garcinia mangostana* (GenBank #AAB51525)
 Acil-ACP tioesterasa de *Brassicajuncea* (GenBank #ABI18986)
 Acil-ACP tioesterasa de *Madhuca longifolia* (GenBank #AAX51637)
 Acil-ACP tioesterasa de *Brassica napus* (GenBank #ABH11710)
 Acil-ACP tioesterasa de *Oryza sativa* (grupo cultivar indica) (GenBank #EAY86877)
 Acil-ACP tioesterasa de *Oryza sativa* (grupo cultivar japónica) (GenBank #NP_001068400)
 Acil-ACP tioesterasa de *Oryza sativa* (grupo cultivar indica) (GenBank #EAY99617)
 Acil-ACP tioesterasa de Acil-ACP tioesterasa de *Cuphea hookeriana* (GenBank #AAC49269)
 Acil-ACP tioesterasa de *Ulmus Americana* (GenBank #AAB71731)
 Acil-ACP tioesterasa de *Cuphea lanceolata* (GenBank #CAB60830)
 Acil-ACP tioesterasa de *Cuphea palustris* (GenBank #AAC49180)
 Acil-ACP tioesterasa de *Iris germanica* (GenBank #AAG43858)
 Acil-ACP tioesterasa de *Iris germanica* (GenBank #AAG43858.1)
 Acil-ACP tioesterasa de *Cuphea palustris* (GenBank #AAC49179)
 Acil-ACP tioesterasa de *Myristica fragrans* (GenBank# AAB71729)
 Acil-ACP tioesterasa de *Myristica fragrans* (GenBank# AAB71729.1)
 Acil-ACP tioesterasa de *Cuphea hookeriana* (GenBank #U39834)
 Acil-ACP tioesterasa de *Umbellularia californica* (GenBank # M94159)
 Acil-ACP tioesterasa de *Cinnamomum camphora* (GenBank #U31813)
 Acil-ACP tioesterasa de *Ricinus communis* (GenBank#ABS30422.1)

[0189] Los productos químicos a base de bioaceite, como los fluidos dieléctricos, tienen composiciones de ácidos grasos con alto contenido de ácido oleico (C18:1) que se originan a partir de ésteres naturales (es decir, aceites de semillas) como el aceite de girasol y el aceite de canola. En la Tabla 5 se muestran los perfiles de ácidos grasos de los aceites de semillas comerciales comunes. Todos los datos de aceites de semillas comerciales que aparecen a continuación se recopilieron de US Pharmacopeias Food and Chemicals Codes, 7th Ed. 2010-2011.

Tabla 5. Perfiles lipídicos de aceites de semillas comerciales.

	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:0-diOH	C18:1-OH	C18:2	C18:3 α
<i>R. communis</i> (Aceite de ricino)	0	0	0	0	0,9-1,6	1,0-1,8	3,7-6,7	0,4-1,3	83,6-89,0	0	0,2-0,6
<i>C. nucifera</i> (Aceite de coco)	5,0-9,0	4,0-8,0	44-52	15-21	8,0-11,0	1,0-4,0	5,0-8,0	0	0	0-2,5	0
<i>Z. Mays</i> (Aceite de maíz)	0	0	0	< 1,0	8,0-19,0	0,5-4,0	19-50	0	0	38-65	< 2,0
<i>G. barbadense</i> (Aceite de algodón)	0	0	< 0,1	0,5-2,0	17-29	1,0-4,0	13-44	0	0	40-63	0,1-2,1
<i>B. rapa</i> , <i>B. napus</i> , <i>B. juncea</i> (Canola)	0	0	< 0,1	< 0,2	< 6,0	< 2,5	> 50	0	0	< 40	< 14
<i>O. europea</i> (Aceituna)	0	0	0	< 0,1	6,5-20,0	0,5-5,0	56-85	0	0	3,5-20,0	< 1,2
<i>A. hypogaea</i> (Mani)	0	0	< 0,1	< 0,2	7,0-16,0	1,3-6,5	35-72	0	0	13,0-43	< 0,6
<i>E. guineensis</i> (Nuez de palma)	3,0-5,0	2,5-6,0	40-52	14,0-18,0	7,0-10,0	1,0-3,0	11,0-19,0	0	0	0,5-4,0	0
<i>E. guineensis</i> (Palma)	0	0	0	0,5-5,9	32,0-47,0	2,0-8,0	34-44	0	0	7,2-12,0	0
<i>C. tinctorius</i> (Cártamo)	0	0	< 0,1	< 0,1	2,0-10,0	1,0-10,0	7,0-16,0	0	0	72-81	< 1,5
<i>H. Annus</i> (Girasol)	0	0	< 0,1	< 0,5	3,0-10,0	1,0-10,0	14-65	0	0	20-75	< 0,5
<i>G. max.</i> (Haba de soja)	0	0	< 0,1	< 0,5	7,0-12,0	2,0-5,5	19-30	0	0	48-65	5,0-10,0
<i>L. usitatissimum</i> (Linaza)	0	0	< 0,1	< 0,5	2,0-9,0	2,0-5,0	8,0-60	0	0	40-80	< 5,0
<i>B. parkii</i> (Karité)	0	0	0	0	3,8-4,1	41,2-56,8	34,0-46,9	0	0	3,7-6,5	0

[0190] Las acil-CoA/aldehído reductasas adecuadas para su uso con los microbios y los métodos descritos en el presente documento incluyen, entre otros, las enumeradas en la Tabla 6.

5 Tabla 6. acil-CoA/aldehído reductasas enumeradas por sus números de acceso de GenBank.

AAC45217, YP_047869, BAB85476, YP_001086217, YP_580344, YP_001280274, YP_264583, YP_436109, YP_959769, ZP_01736962, ZP_01900335, ZP_01892096, ZP_01103974, ZP_01915077, YP_924106, YP_130411, ZP_01222731, YP_550815, YP_983712, YP_001019688, YP_524762, YP_856798, ZP_01115500, YP_001141848, NP_336047, NP_216059, YP_882409, YP_706156, YP_001136150, YP_952365, ZP_01221833, YP_130076, NP_567936, AAR88762, ABK28586, NP_197634, CAD30694, NP_001063962, BAD46254, NP_001030809, EAZ10132, EAZ43639, EAZ07989, NP_001062488, CAB88537, NP_001052541, CAH66597, CAE02214, CAH66590, CAB88538, EAZ39844, AAZ06658, CAA68190, CAA52019 y BAC84377

10 [0191] Las acil-ACP tioesterasas son los terminadores de la biosíntesis de ácidos grasos de las plantas superiores (y algunas especies de microalgas) y, en la mayoría de las especies de plantas, esto lo llevan a cabo miembros de la familia de genes *FatA*, cuyo papel es terminar el alargamiento en la etapa de C16:0 a C18:0. En especies que sintetizan ácidos grasos de cadena más corta (como *Cuphea*, *Elaeis*, *Myristica*, o *Umbellularia*), un grupo diferente de acil-ACP tioesterasas codificadas por genes *FatB* lleva a cabo este paso de terminación.

15 [0192] Otras enzimas adecuadas para usar en los métodos descritos en este documento incluyen aquellas que tienen al menos un 70 % de identidad de aminoácidos con una de las proteínas enumeradas en las Tablas 6 y 8, y que muestran la actividad enzimática deseada correspondiente (por ejemplo, la escisión de un ácido graso de una proteína portadora de acilo, la reducción de un acil-CoA a un aldehído o un alcohol, o la conversión de un aldehído en un alcano). En casos adicionales, la actividad enzimática está presente en una secuencia que tiene al menos alrededor del 75 %, al menos alrededor del 80 %, al menos alrededor del 85 %, al menos alrededor del 90 %, al menos alrededor del 95 % o al menos alrededor del 99 % de identidad con una de las secuencias descritas anteriormente, todas las cuales se incorporan al presente documento por referencia.

20 [0193] Al seleccionar la combinación deseada de genes exógenos que expresar (o genes endógenos que inactivar o ambos), se puede adaptar el aceite generado por el microbio, que luego se puede extraer de la biomasa acuosa. Por ejemplo, el microbio puede contener: (i) un gen exógeno que codifica una acil-ACP tioesterasa; (ii) opcionalmente, una proteína transportadora de acilo coexpresada de manera natural o una proteína transportadora de acilo que tiene afinidad por la acil-ACP tioesterasa de ácido graso; (iii) un gen de desaturasa endógeno mutado, en el que la mutación inactiva el gen de desaturasa o la proteína desaturasa, tal como una desactivación de desaturasa; (iv) la sobreexpresión de una proteína transportadora de esteroil acil desaturasa endógena o la expresión de una SAD heteróloga; y (v) cualquier combinación de los anteriores.

25 [0194] Los genes que codifican tales enzimas, como las acil-ACP tioesterasas, se pueden obtener de células que ya se sabe que poseen una producción significativa de lípidos, como *Chlorella protothecoides*. Los genes que ya se sabe que tienen una función en la producción de lípidos, por ejemplo, un gen que codifica una enzima que satura los enlaces dobles, pueden transformarse individualmente en células receptoras. Los métodos para identificar genes que pueden alterar (mejorar) la producción de lípidos en microalgas se describen en la publicación PCT N.º 2008/151149, que se incorpora a la presente por referencia.

30 [0195] Por lo tanto, en algunos casos, en la práctica de la presente invención se puede utilizar una célula de *Prototheca* u otra microalga u otra célula microbiana que haya sido manipulada genéticamente para expresar una enzima de la ruta de los lípidos a un nivel alterado en comparación con una célula de tipo salvaje de la misma especie. En algunos casos, la célula produce más lípidos en comparación con la célula de tipo salvaje cuando ambas células se cultivan en las mismas condiciones. En algunos casos, la célula ha sido manipulada genéticamente y/o seleccionada para que exprese una enzima de la ruta de los lípidos a un nivel más alto que la célula de tipo salvaje. En algunos casos, la enzima de la ruta de los lípidos se selecciona del grupo que consiste en piruvato deshidrogenasa, acetil-CoA carboxilasa, proteína transportadora de acilo y glicerol-3 fosfato aciltransferasa. En algunos casos, la célula ha sido manipulada genéticamente y/o seleccionada para que exprese una enzima de la ruta de los lípidos a un nivel más bajo que la célula de tipo salvaje. En un caso en el que la célula expresa la enzima de la ruta de los lípidos a un nivel más bajo, la enzima de la ruta de los lípidos comprende citrato sintasa.

35 [0196] En algunos casos, la célula ha sido manipulada genéticamente y/o seleccionada para que exprese un regulador global de la síntesis de ácidos grasos a un nivel alterado en comparación con la célula de tipo salvaje, por lo que los niveles de expresión de una pluralidad de genes sintéticos de ácidos grasos están alterados en comparación a la célula de tipo salvaje. En algunos casos, la enzima de la ruta de los lípidos comprende una enzima

que modifica un ácido graso. En algunos casos, la enzima de la ruta de los lípidos se selecciona de una esteroil-ACP desaturasa y una glicerolípido desaturasa. En algunos casos, la célula ha sido manipulada genéticamente y/o seleccionada para que exprese un nivel más bajo de una enzima de la ruta de los lípidos, o para que no exprese una enzima específica de la ruta de los lípidos (es decir, cuando una enzima de la ruta de los lípidos ha sido inaplicada o reemplazada con un gen exógeno).

[0197] En otro caso se utiliza un microbio productor de aceite que contiene uno o más genes exógenos y/o uno o más genes endógenos inactivados, en el que los genes exógenos o endógenos codifican proteína(s) seleccionada(s) del grupo que consiste en una acil-ACP tioesterasa, una acil-CoA reductasa, una aldehído graso reductasa, una acil-CoA/aldehído reductasa, una aldehído graso descarboxilasa, una desaturasa y una proteína portadora de acilo. En otro caso, un gen de desaturasa endógeno se sobreexpresa en un microbio que contiene uno o más de los genes exógenos anteriores. El gen exógeno puede estar en unión operativa con un promotor, que es inducible o reprimible en respuesta a un estímulo. En algunos casos, el estímulo se selecciona del grupo que consiste en una molécula pequeña proporcionada exógenamente, calor, frío y nitrógeno limitado o nulo en los medios de cultivo. En algunos casos, el gen exógeno se expresa o se dirige de otro modo a un compartimento celular. El compartimento celular se puede seleccionar del grupo que consiste en un cloroplasto, un plastidio y una mitocondria. En algunas formas de realización, el microbio es *Prototheca moriformis*, *Prototheca krugani*, *Prototheca stagnora* o *Prototheca zopffii*.

[0198] El gen exógeno o el gen endógeno inactivado puede codificar una acil-ACP tioesterasa de ácido graso. En algunos casos, la tioesterasa codificada por el gen exógeno o endógeno inactivado cataliza la escisión de un ácido graso de 8 a 18 carbonos de una proteína transportadora de acilo (ACP). En algunos casos, la tioesterasa codificada por el gen exógeno o el gen endógeno inactivado cataliza la escisión de un ácido graso de 10 a 14 carbonos de una ACP. La tioesterasa codificada por el gen exógeno o el gen endógeno inactivado puede catalizar la escisión de un ácido graso de 12 carbonos de una ACP. En algunos casos, la tioesterasa codificada por el gen exógeno cataliza la escisión de un ácido graso de 16-18 carbonos de una ACP.

[0199] El gen exógeno puede codificar una grasa acil-CoA/aldehído reductasa. En algunos casos, la reductasa codificada por el gen exógeno cataliza la reducción de una acil-CoA de 8 a 18 carbonos a un alcohol primario correspondiente. En algunos casos, la reductasa codificada por el gen exógeno o el gen endógeno inactivado cataliza la reducción de una acil-CoA de 10 a 14 carbonos a un alcohol primario correspondiente. La reductasa codificada por el gen exógeno o el gen endógeno inactivado puede catalizar la reducción de una acil-CoA de 12 carbonos a dodecanol.

[0200] En la aplicación de los métodos descritos en este documento se puede utilizar una célula de *Prototheca* recombinante (u otra célula microalgal o microbiana) que contenga dos genes exógenos (o dos genes endógenos inactivados), en donde un primer gen exógeno o un gen endógeno inactivado codifica una acil-ACP tioesterasa y un segundo gen exógeno o un gen endógeno inactivado codifica una proteína seleccionada del grupo consiste en una acil-CoA reductasa, una acil-CoA/aldehído reductasa y una proteína transportadora de acilo. En algunos casos, los dos genes exógenos están cada uno en unión operativa con un promotor, que es inducible en respuesta a un estímulo. En algunos casos, cada promotor es inducible en respuesta a un estímulo idéntico, como nitrógeno limitado o nulo en los medios de cultivo. La limitación o falta total de nitrógeno en los medios de cultivo estimula la producción de aceite en algunos microorganismos como *Prototheca* y otras microalgas y otras especies microbianas, y se puede utilizar como desencadenante para inducir la producción de aceite (lípidos) a niveles elevados. Cuando se usa en combinación con los métodos de ingeniería genética descritos en el presente documento, el lípido como porcentaje del peso en seco de las células se puede llevar a niveles altos, como al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 % y al menos el 75 %.

[0201] Los nuevos aceites (lípidos) y los fluidos dieléctricos derivados de ellos descritos en este documento son distintos de otros aceites naturales que tienen un alto contenido de ácidos grasos C16 y C18, como el aceite de girasol y de canola.

[0202] La tioesterasa codificada por el primer gen exógeno puede catalizar la escisión de un ácido graso de 8 a 18 carbonos de una ACP. Además, en aquellos casos en los que se desean aceites de cadena más larga, la expresión de uno o más genes con una longitud de cadena más corta (es decir, por debajo de C14, como C12, C10 y/o C8) y/o genes de ACP correspondientes, se reduce (a través de la alteración de su expresión) o se elimina (por inactivación, por ejemplo).

[0203] En los diversos casos descritos anteriormente, la *Prototheca* (u otra microalga u otra célula microbiana) puede contener al menos un gen exógeno o al menos un gen endógeno inactivado (o diseñado para reducir la expresión) que codifica una enzima de la ruta de los lípidos. En algunos casos, la enzima de la ruta de los lípidos se selecciona del grupo que consiste en una esteroil-ACP desaturasa, una ácido graso desaturasa, una glicerolípido desaturasa,

una piruvato deshidrogenasa, una acetil-CoA carboxilasa, una proteína transportadora de acilo y una glicerol-3 fosfato aciltransferasa. En otros casos, la célula de *Prototheca* u otra célula contiene una enzima que modifica los lípidos seleccionada del grupo que consiste en una acil-ACP tioesterasa, una acil-CoA/aldehído reductasa, una acil-CoA reductasa, una aldehído graso reductasa, una aldehído graso descarboxilasa y/o una proteína transportadora de acilo.

VI. PRODUCCIÓN DE ACEITE MICROBIANO Y PRODUCTOS DERIVADOS DE ESTE

1. Producción de aceite microbiano

[0204] Para la producción de aceite microbiano según los métodos descritos en el presente documento, el aceite crudo (lípidos) sin procesar producido por las células microbianas se recolecta, o se recoge de otro modo, por cualquier medio conveniente. El aceite se puede aislar por extracción de células completas, por ejemplo. En este método, las células primero se rompen y luego los lípidos y ácidos grasos intracelulares y asociados a la membrana celular/pared celular, así como los hidrocarburos extracelulares, pueden separarse de la masa celular, por ejemplo mediante el uso de centrifugación como se ha descrito antes. Los lípidos intracelulares producidos en los microorganismos se extraen, en muchos casos, después o durante el proceso de lisis de las células microbianas.

[0205] Más específicamente, después de completar el cultivo, los microorganismos normalmente se separan del caldo de fermentación. A menudo, la separación se realiza mediante centrifugación para generar una pasta concentrada de biomasa microbiana. La biomasa se puede lavar opcionalmente con una solución de lavado (por ejemplo, agua DI) para eliminar el caldo de fermentación y los residuos. Opcionalmente, la biomasa microbiana lavada también se puede secar (secar en horno, liofilizar, etc.) antes de la ruptura celular. Alternativamente, las células se pueden lisar sin separación de parte o todo el caldo de fermentación cuando se completa la fermentación. Por ejemplo, las células pueden estar en una proporción de menos de 1:1 v:v de células a líquido extracelular cuando se lisan las células.

[0206] Los microorganismos que contienen un lípido pueden lisarse para producir un lisado. Como se detalla en el presente documento, el paso de lisis de un microorganismo (también denominado lisis celular) se puede lograr por cualquier medio conveniente, incluida la lisis inducida por calor, la adición de una base, la adición de un ácido, el uso de enzimas como proteasas y enzimas de degradación de polisacáridos como amilasas, ultrasonidos, lisis mecánica, choque osmótico, infección con un virus lítico y/o expresión de uno o más genes líticos. La lisis se realiza para liberar moléculas intracelulares que han sido producidas por el microorganismo. Cada uno de estos métodos para lisar un microorganismo se puede usar como un solo método o en combinación de manera simultánea o secuencial. La extensión de la ruptura celular se puede observar mediante análisis microscópico. Utilizando uno o más de los métodos descritos en el presente documento, normalmente se observa más del 70 % de ruptura celular. Preferiblemente, la ruptura celular es superior al 80 %, más preferiblemente superior al 90 % y más preferiblemente alrededor del 100 %.

[0207] El microorganismo se puede lisar después del crecimiento, por ejemplo, para aumentar la exposición del aceite microbiano para la extracción o el procesamiento posterior. Si se utiliza un gen de lipasa exógeno, el momento de la expresión de la lipasa (por ejemplo, a través de un promotor inducible) o la lisis celular puede ajustarse para optimizar la producción de lípidos y/o hidrocarburos. A continuación, se describen varias técnicas de lisis. Estas técnicas se pueden utilizar individualmente o en combinación.

[0208] El paso de lisis de un microorganismo puede comprender el calentamiento de una suspensión celular que contiene el microorganismo. En este caso, el caldo de fermentación que contiene los microorganismos (o una suspensión de microorganismos aislados del caldo de fermentación) se calienta hasta que los microorganismos, es decir, las paredes celulares y las membranas de los microorganismos, se degraden o se rompan. Por lo general, las temperaturas aplicadas son de al menos 50 °C. Para una lisis celular más eficiente, se pueden utilizar temperaturas más altas, como al menos 30 °C, al menos 60 °C, al menos 70 °C, al menos 80 °C, al menos 90 °C, al menos 100 °C, al menos 110 °C, al menos 120 °C, o al menos 130 °C o superiores. La lisis de células por tratamiento térmico se puede realizar poniendo en ebullición el microorganismo. Alternativamente, el tratamiento térmico (sin ebullición) se puede realizar en un autoclave. El lisado tratado con calor se puede enfriar para un tratamiento posterior. La ruptura celular también se puede realizar mediante tratamiento con vapor, es decir, mediante la adición de vapor presurizado. El tratamiento con vapor de microalgas para la ruptura celular se describe, por ejemplo, en la patente de EE. UU. 6,750,048. En algunos casos, el tratamiento con vapor se puede lograr rociando vapor en el fermentador y manteniendo el caldo a la temperatura deseada durante menos de 90 minutos, preferiblemente menos de 60 minutos y más preferiblemente menos de 30 minutos.

- 5 [0209] El paso de lisis de un microorganismo puede comprender añadir una base a una suspensión celular que contiene el microorganismo. La base debe ser lo suficientemente fuerte para hidrolizar al menos una parte de los compuestos proteicos de los microorganismos utilizados. Las bases que son útiles para solubilizar proteínas se conocen en la técnica de la química. Las bases ejemplares que son útiles en los métodos descritos en el presente documento incluyen, entre otros, hidróxidos, carbonatos y bicarbonatos de litio, sodio, potasio, calcio y mezclas de los mismos. Una base preferida es KOH. El tratamiento de base de microalgas para la ruptura celular se describe, por ejemplo, en la patente de EE. UU. 6,750,048.
- 10 [0210] El paso de lisis de un microorganismo puede comprender agregar un ácido a una suspensión celular que contiene el microorganismo. La lisis ácida se puede efectuar usando un ácido a una concentración de 10-500 mN o preferiblemente 40-160 nM. La lisis ácida se realiza preferiblemente por encima de la temperatura ambiente (por ejemplo, a 40-160°, es decir, una temperatura de 50-130°). Para temperaturas moderadas (por ejemplo, de temperatura ambiente a 100 °C y particularmente de temperatura ambiente a 65°), el tratamiento ácido se puede combinar de manera útil con sonicación u otros métodos de ruptura celular.
- 15 [0211] El paso de lisis de un microorganismo puede comprender lisar el microorganismo usando una enzima. Las enzimas preferidas para lisar un microorganismo son las proteasas y las enzimas que degradan los polisacáridos, como la hemicelulasa (por ejemplo, la hemicelulasa de *Aspergillus niger*; Sigma Aldrich, St. Louis, MO; #H2125), pectinasa (por ejemplo, pectinasa de *Rhizopus sp.*; Sigma Aldrich, St. Louis, MO; #P2401), Mannaway 4.0 L (Novozymes), la celulasa (por ejemplo, celulosa de *Trichoderma viride*; Sigma Aldrich, St. Louis, MO; #C9422) y la driselasa (por ejemplo, driselasa de *Basidiomycetoz sp.*; Sigma Aldrich, St. Louis, MO; #D9515).
- 20 [0212] La lisis se puede lograr utilizando una enzima como, por ejemplo, una celulasa como una enzima degradadora de polisacáridos, opcionalmente de *Chlorella* o un virus de *Chlorella*, y/o una proteasa, tal como proteasa de *Streptomyces griseus*, quimotripsina, proteinasa K, proteasas enumeradas en Degradation of Polylactide by Commercial Proteases, Oda Y y col., Journal of Polymers and the Environment, vol. 8, 2000 Jan 1, pp. 29-32(4), Alcalase 2.4 FG (Novozymes) y Flavourzyme 100 L (Novozymes). También se puede usar cualquier combinación de una proteasa y una enzima degradadora de polisacáridos, incluida cualquier combinación de las proteasas anteriores y enzimas degradadoras de polisacáridos.
- 25 [0213] En otro caso, la lisis se puede realizar utilizando una prensa extrusora. En este proceso, la biomasa se hace pasar a través de un dispositivo de tipo tornillo a alta presión, lisando las células y haciendo que el lípido intracelular se libere y se separe de la proteína y la fibra (y otros componentes) de la célula.
- 30 [0214] El paso de lisis de un microorganismo se puede realizar usando ultrasonido, es decir, mediante sonicación. Por lo tanto, las células también pueden lisarse con sonido de alta frecuencia. El sonido se puede producir electrónicamente y transportar a través de una punta metálica a una suspensión celular adecuadamente concentrada. Esta sonicación (o ultrasonicación) rompe la integridad celular en función de la creación de cavidades en la suspensión celular.
- 35 [0215] El paso de lisis de un microorganismo se puede realizar mediante lisis mecánica. Las células pueden lisarse mecánicamente y, opcionalmente, homogeneizarse para facilitar la recolección de hidrocarburos (por ejemplo, lípidos). Por ejemplo, se puede usar un disruptor de presión para bombear una suspensión que contiene células a través de una válvula de orificio restringido. Se aplica alta presión (hasta 1500 bar), seguida de una expansión instantánea a través de una boquilla de salida. La ruptura de la célula se logra mediante tres mecanismos diferentes: impacto en la válvula, alto cizallamiento del líquido en el orificio y caída repentina de la presión en la descarga, lo que provoca una explosión de la célula. El método libera moléculas intracelulares. Alternativamente, se puede utilizar un molino de bolas. En un molino de bolas, las células se agitan en suspensión con pequeñas partículas abrasivas, como perlas. Las células se rompen debido a las fuerzas de cizallamiento, la molienda entre las perlas y las colisiones con las perlas. Las perlas rompen las células para liberar el contenido celular. Las células también pueden romperse por fuerzas de cizallamiento, como con el uso de mezclas (por ejemplo, con una licuadora Waring o de alta velocidad), la prensa francesa o incluso la centrifugación en caso de paredes celulares débiles, para romper las células.
- 40 [0216] El paso de lisis de un microorganismo se puede realizar aplicando un choque osmótico (es decir, suspendiendo las células del microorganismo en una solución hipotónica).
- 45 [0217] El paso de lisis de un microorganismo puede comprender la infección del microorganismo con un virus lítico. Se conoce una amplia variedad de virus para la lisis de microorganismos adecuados para usar en los métodos descritos en el presente documento, y la selección y el uso de un virus lítico particular para un microorganismo particular está dentro del nivel de experiencia en la técnica. Por ejemplo, el virus de *paramecium bursaria chlorella*
- 50
- 55
- 60

(PBCV-1) es el prototipo de un grupo (familia Phycodnaviridae, género Chlorovirus) de virus de ADN de doble cadena grandes, icosaédricos, formadores de placa, que se replican y lisan algunas algas verdes unicelulares eucariotas similares a la *Chlorella*. En consecuencia, cualquier microalga susceptible puede lisarse infectando el cultivo con un virus de *Chlorella* adecuado. Los métodos para infectar especies de *Chlorella* con un virus de *Chlorella* se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Adv. Virus Res 2006;66:293-336; Virology, 1999 Apr 25; 257 (1): 15-23; Virology, 2004 Jan 5; 318 (1): 214-23; Nucleic Acids Symp. Ser. 2000;(44):161-2; J.Virol. 2006 March ;80(5):2437-44; y Annu. Rev. Microbiol. 1999;53:447-94.

[0218] El paso de lisis de un microorganismo puede comprender la autólisis. En este caso, se manipula genéticamente un microorganismo para que produzca una proteína lítica que lisará el microorganismo. Este gen lítico se puede expresar usando un promotor inducible de modo que las células puedan crecer primero hasta una densidad deseable en un fermentador, seguido de la inducción del promotor para expresar el gen lítico para lisar las células. El gen lítico puede codificar una enzima degradadora de polisacáridos. En ciertos otros casos, el gen lítico es un gen de un virus lítico. Así, por ejemplo, un gen lítico de un virus de *Chlorella* puede expresarse en una célula de alga; véase Virology 260, 308-315 (1999); FEMS Microbiology Letters 180 (1999) 45-53; Virology 263, 376-387 (1999); y Virology 230, 361-368 (1997). La expresión de genes líticos se realiza preferiblemente usando un promotor inducible, como un promotor activo en microalgas que es inducido por un estímulo como la presencia de una molécula pequeña, luz, calor y otros estímulos.

[0219] Están disponibles varios métodos para separar lípidos de lisados celulares producidos por los métodos anteriores. Por ejemplo, los lípidos y los derivados de lípidos como los aldehídos grasos, los alcoholes grasos y los hidrocarburos como los alcanos se pueden extraer con un disolvente hidrófobo como el hexano (véase Frenz y col. 1989, Enzyme microb. Technol., 11:717). Los lípidos y derivados de lípidos también se pueden extraer mediante licuefacción (véase, por ejemplo, Sawayama y col. 1999, Biomass and Bioenergy 17:33-39 y Inou y col. 1993, Biomass and Bioenergy 6(4):269-274); licuefacción de petróleo (véase, por ejemplo, Minowa y col. 1995, Fuel 74(12):1735-1738); y extracción con CO₂ supercrítico (véase, por ejemplo, Mendes y col. 2003, Inorganica Chimica Acta 356:328-334). Miao y Wu describen un protocolo de recuperación de lípidos de microalgas de un cultivo de *Chlorella protothecoides* en el que las células se recolectaron por centrifugación, se lavaron con agua destilada y se secaron por liofilización. El polvo celular resultante se pulverizó en un mortero y luego se extrajo con *n*-hexano. Miao y Wu, Biosource Technology (2006) 97:841-846.

[0220] Así, los lípidos, derivados de lípidos e hidrocarburos generados por los microorganismos descritos en este documento pueden recuperarse mediante extracción con un disolvente orgánico. En algunos casos, el disolvente orgánico preferido es el hexano. Normalmente, el disolvente orgánico se añade directamente al lisado sin separación previa de los componentes del lisado. El lisado generado por uno o más de los métodos descritos anteriormente se puede poner en contacto con un disolvente orgánico durante un período de tiempo suficiente para permitir que los componentes lipídicos y/o hidrocarburos formen una solución con el disolvente orgánico. En algunos casos, la solución se puede refinar aún más para recuperar los componentes de lípidos o hidrocarburos específicos deseados. Los métodos de extracción con hexano son ampliamente conocidos en la técnica.

[0221] Otros métodos para extraer lípidos de microorganismos se describen en la solicitud PCT n.º US10/031108, que se incorpora a la presente por referencia.

[0222] Los lípidos y derivados de lípidos tales como aldehídos grasos, alcoholes grasos e hidrocarburos tales como alcanos producidos por células como se describe en este documento pueden modificarse mediante el uso de una o más enzimas, incluida una lipasa. Cuando los hidrocarburos están en el entorno extracelular de las células, se pueden añadir una o más enzimas a ese entorno en condiciones en las que la enzima modifica el hidrocarburo o completa su síntesis a partir de un precursor de hidrocarburo. Alternativamente, los hidrocarburos pueden aislarse parcial o completamente del material celular antes de la adición de uno o más catalizadores tales como enzimas. Dichos catalizadores se agregan exógenamente y su actividad ocurre fuera de la célula o *in vitro*.

2. Procesamiento adicional de aceite microbiano

[0223] De este modo, los lípidos e hidrocarburos producidos por las células *in vivo*, o modificados enzimáticamente *in vitro*, como se describe en este documento, pueden seguir procesándose opcionalmente por medios convencionales. El procesamiento puede incluir el "craqueo" para reducir el tamaño y, por lo tanto, aumentar la relación hidrógeno:carbono de las moléculas de hidrocarburo. Los métodos de craqueo catalítico y térmico se utilizan habitualmente en el procesamiento de aceites de hidrocarburos y triglicéridos. Los métodos catalíticos implican el uso de un catalizador, como un catalizador ácido sólido. El catalizador puede ser sílice-alúmina o una zeolita, que da como resultado la rotura heterolítica o asimétrica de un enlace carbono-carbono para dar como resultado un carbocatión y un anión hidruro. Estos productos intermedios reactivos luego se reordenan o se transfieren con otro

5 hidrocarburo. De este modo, las reacciones pueden regenerar los intermedios para dar como resultado un mecanismo de cadena de autopropagación. Los hidrocarburos también pueden procesarse para reducir, opcionalmente a cero, el número de enlaces dobles o triples carbono-carbono que tienen. Los hidrocarburos también se pueden procesar para quitarles o eliminarles un anillo o una estructura cíclica. Los hidrocarburos también se pueden procesar para aumentar la relación hidrógeno:carbono. Esto puede incluir la adición de hidrógeno ("hidrogenación") y/o el "craqueo" de hidrocarburos en hidrocarburos más pequeños.

10 [0224] Una vez que se extraen los lípidos, estos pueden someterse, según los métodos descritos en el presente documento, a uno o más pasos de procesamiento. Estos pasos de procesamiento son distintos de los pasos de refinado realizados en el petróleo crudo (por ejemplo, petróleo y otras fuentes) cuando se producen combustibles. Estos pasos de procesamiento son, en algunos aspectos, comparables a los que se realizan en los aceites de semillas durante la producción para el consumo humano. En algunas formas de realización, los lípidos extraídos se desgoman para extraer lecitina y otros fosfolípidos. En otras formas de realización, los lípidos extraídos se refinan usando una base o un metal alcalino. En otras formas de realización más, los lípidos extraídos se pasan a través de una arcilla blanqueadora, normalmente una arcilla ácida. En otras formas de realización, los lípidos extraídos se desodorizan para eliminar o reducir las impurezas volátiles como aldehídos y cetonas. En otros casos más, los lípidos extraídos se acondicionan para el invierno para eliminar o reducir ceras o grasas saturadas. Los pasos de procesamiento anteriores se pueden realizar en cualquiera y todas las combinaciones en los lípidos extraídos, dependiendo de las características del producto deseado. Los lípidos extraídos que se han refinado (por ejemplo, con una base o un metal alcalino), blanqueado (por ejemplo, con una arcilla blanqueadora) y/o desodorizado generalmente se denominan aceite RBD. El aceite RBD producido a partir de lípidos extraídos de microalgas y/o levaduras oleaginosas descritos en este documento es útil en una variedad de aplicaciones industriales, incluida la producción de fluidos dieléctricos.

25 [0225] En algunos casos, se realiza el desgomado para eliminar contaminantes como los fosfolípidos del aceite. En algunos casos, el desgomado del aceite extraído es parte del refinado, blanqueo y desodorización (o RBD). El proceso de RBD elimina o reduce el olor, color y/o sabor del aceite extraído. En algunos casos, el proceso de refinado suele constar de dos pasos, el desgomado y un paso de neutralización que elimina los ácidos grasos libres (FFA) del aceite mediante extracción cáustica con hidróxido de sodio. El paso de blanqueo puede implicar mezclar el aceite con varias arcillas blanqueadoras para absorber el color, los metales traza y los compuestos de azufre. El paso de desodorización puede ser un proceso de destilación que ocurre a baja presión y alta temperatura. En un proceso de destilación ilustrativo, el aceite se pone al vacío y se calienta con vapor para eliminar cualquier resto de sabor u olor y ácidos grasos libres. La desodorización también se puede lograr mediante el tratamiento con carbón activado.

35 [0226] Los pasos mencionados anteriormente pueden servir para reducir el punto de fluidez. En varios casos, el punto de fluidez del aceite microbiano (lípidos) se puede reducir a aproximadamente -10 grados C, aproximadamente -15 grados C, aproximadamente -20 grados C, aproximadamente -25 grados C, aproximadamente 30 grados C, aproximadamente -35 grados C, o aproximadamente -40 grados C. Además, el punto de fluidez del aceite microbiano puede estar dentro de cualquier rango limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo, alrededor de -10 grados C a -40 grados C o alrededor de -15 grados C a aproximadamente -35 grados C, etc. La reducción en el punto de fluidez puede ocurrir debido a que estos pasos reducen la proporción relativa de la fracción saturada, que consiste principalmente en triglicéridos palmíticos y esteáricos, conocida como fracción de estearina. El fraccionamiento del aceite reduce la concentración de triglicéridos saturados del aceite. El fraccionamiento puede realizarse mediante fraccionamiento en seco, como en el proceso de preparación para el invierno conocido en la industria del aceite vegetal. En este proceso, el aceite microbiano (por ejemplo, de algas) primero se refina, se blanquea y se desodoriza mediante métodos similares a los que se utilizan en la industria del aceite vegetal. Esto da como resultado un aceite con un punto de fluidez en el rango de -5 a -10 grados C, por ejemplo -8 grados C.

50 [0227] A continuación, la temperatura del aceite RBD puede reducirse de forma controlada hasta que se formen núcleos cristalinos. A continuación, el aceite se puede mantener a esa temperatura de cristalización durante varias horas para facilitar el crecimiento de los cristales. Luego, los cristales se eliminan por filtración para dar como resultado dos fracciones: una fase sólida que contiene parte o la mayor parte de la fracción de estearina y una fase líquida que contiene principalmente la fracción de oleína. Esto da como resultado un aceite con un punto de fluidez en el rango de -8 a -15 grados C, por ejemplo -11 grados C. La fase líquida se puede someter a fraccionamiento nuevamente a una temperatura de cristalización más baja para efectuar una mayor eliminación de estearina. La fracción líquida purificada resultante, equivalente a una súper oleína, como se conoce comúnmente en la industria del aceite vegetal, tiene mejores propiedades térmicas que el aceite microbiano nativo. Por ejemplo, un segundo fraccionamiento puede dar como resultado aceite con un punto de fluidez en el rango de -15 grados a -25 grados C, por ejemplo -20 grados C. El aceite resultante es excepcionalmente útil en una variedad de aplicaciones, incluyendo,

de manera importante, aplicaciones alimentarias, en las que el aceite microbiano se puede utilizar como un sustitutivo más barato y, a menudo, más saludable, en su totalidad o en parte, de los aceites animales y vegetales.

3. Productos derivados de aceites microbianos

5 [0228] Los aceites microbianos descritos en este documento también se pueden usar para producir productos, como lubricantes, fluidos hidráulicos, aceites industriales o fluidos dieléctricos. Entre los aceites industriales comunes se incluyen lubricantes para espadas de motosierras, fluidos para trabajar metales, lubricantes de calidad alimentaria, aceites para engranajes, aceites marinos, lubricantes para motores, aceites para tractores, lubricantes para equipos agrícolas, aceites para ascensores, aceites para desmoldeo y similares. Los fluidos dieléctricos se utilizan típicamente para enfriar y/o aislar eléctricamente componentes eléctricos (especialmente en equipos de distribución de energía eléctrica de alta tensión), como, por ejemplo, reconectores automáticos, condensadores, disyuntores, cables de transmisión llenos de fluido de alta tensión, componentes de distribución de energía, equipos de conmutación (por ejemplo, un interruptor de ruptura de carga de alta tensión, como los descritos en USPN 6,797,909), transformadores, componentes de transmisión y reguladores de tensión.

10 [0229] Los fluidos dieléctricos tradicionales incluyen los lubricantes a base de aceite mineral. Estos incluyen los aceites de base del Grupo 1, II y II+, que son aceites de base de petróleo que se han refinado convencionalmente o se han hidrotratado ligeramente y que tienen un índice de viscosidad (VI) de menos de 120. Estos también incluyen los aceites de base del Grupo III (incluyendo "aceite de motor sintético" en los EE. UU.) que son productos derivados del petróleo convencional altamente refinados. Los aceites de base del Grupo III pueden fabricarse mediante hidroprocesamiento (hidrocraqueo y/o hidroisomerización) de aceites de base del Grupo 1 o Grupo II/II+ y contienen menos saturados, azufre y nitrógeno que los aceites de base del Grupo I, II o II+ y tienen un VI superior a 120. La ASTM (American Society of Testing and Materials) establece especificaciones para fluidos dieléctricos y otras composiciones de hidrocarburos (como combustible diésel (ASTM D975), combustible para aviones (ASTM D1655) y biodiésel (ASTM D6751) según cualquier de una serie de factores, como el punto de ebullición, el índice de cetano, el punto de turbidez, el punto de inflamación, la viscosidad, el punto de anilina, el contenido de azufre, el contenido de agua, el contenido de cenizas, la corrosión de tira de cobre y los residuos de carbono.

20 [0230] Los fluidos dieléctricos de origen biológico se pueden preparar mediante una variedad de procesos. Por ejemplo, un proceso, que comienza con aceite vegetal crudo, incluye los pasos de desgomado, refinación alcalina, blanqueo, desodorización, hidrogenación, preparación para el invierno (para producir aceite vegetal RBD), tratamiento con arcilla para eliminar trazas de compuestos polares y materiales ácidos (véase la patente de EE. UU. n.º 6,274,067), y combinación con aditivos para producir fluidos dieléctricos de origen biológico.

25 [0231] Entre las propiedades clave de los fluidos dieléctricos se incluyen la viscosidad, la inflamabilidad, la reactividad, la miscibilidad, la capacidad de aislamiento eléctrico, la biodegradabilidad y el coste de fabricación. Si bien estas y otras propiedades se explican a continuación, el lector puede apreciar mejor algunas de las ventajas de ciertos aceites descritos en este documento al comprender algunas de las ventajas y desventajas de los fluidos dieléctricos de origen biológico tradicionales frente a los fluidos dieléctricos de base de aceite mineral. En cuanto a la viscosidad, los fluidos dieléctricos de origen biológico generalmente tienen una viscosidad y un punto de fluidez más altos y, por lo tanto, propiedades a baja temperatura más pobres en comparación con los fluidos dieléctricos a base de aceite mineral. Sin embargo, la viscosidad de estos últimos puede variar de lote a lote debido a la inconsistencia y complejidad de los compuestos en varias fuentes de aceite mineral. Los fluidos dieléctricos de origen biológico generalmente tienen puntos de inflamación y fuego más altos (al menos dos veces) en comparación con los fluidos dieléctricos de base de aceite mineral. Los fluidos dieléctricos de origen biológico generalmente tienen una estabilidad hidrolítica, térmica y oxidativa inferior, y un índice de acidez más alto (alrededor de dos veces) en comparación con los fluidos dieléctricos a base de aceite mineral. Los fluidos dieléctricos de origen biológico generalmente son más biodegradables y tienen menor toxicidad en comparación con los fluidos dieléctricos de base de aceite mineral y están hechos de un recurso renovable, en lugar de no renovable. Los fluidos dieléctricos de origen biológico generalmente cuestan más de producir y requieren más aditivos en comparación con los fluidos dieléctricos con base de aceite mineral.

30 [0232] Los nuevos fluidos dieléctricos que se proporcionan en este documento, en algunos casos, tienen todas las ventajas de los fluidos dieléctricos tradicionales de origen biológico con menos, y en algunos casos, ninguna de las desventajas. Estas y otras ventajas de los presentes métodos pueden apreciarse mejor después de tener en cuenta la siguiente descripción de las propiedades generales de los fluidos dieléctricos.

35 [0233] De manera idónea, la viscosidad de un fluido dieléctrico debería variar lo menos posible con la temperatura. La viscosidad es una medida de la resistencia de un fluido al flujo o corte ("espesor") y se mide en cinemática (kv) y absoluta (dinámica) (cSt o mm²/s @ 40 y 100 °C). (ASTM D2270-04; ASTM D445; ASTM D88). Generalmente, se

- desea el lubricante menos viscoso que fuerce adecuadamente la separación de dos superficies móviles. La viscosidad a veces se considera la característica más importante de un fluido hidráulico. Si la viscosidad es demasiado alta, aumentan la fricción, la caída de presión, el consumo de energía y la generación de calor. Si la viscosidad es demasiado baja, es posible que aumenten las fugas internas a temperaturas de funcionamiento más altas. La película de aceite puede ser insuficiente para evitar un desgaste excesivo o un posible gripado de las piezas móviles. Algunas viscosidades ilustrativas (en unidades cSt) de fluido dieléctrico derivado de varias fuentes son: derivado de aceite mineral: 20 a 40 °C y 4 a 100 °C; derivados del aceite de soja: 30 a 40 °C y 7,6 a 100 °C; derivados del aceite de girasol: 40 a 40 °C y 8,7 a 100 °C; y derivados de aceite de colza (canola): 33 a 40 °C. (Siniawski y col.; J. Synthetic Lubrication; 24, 101-110 (2007); Schneider; J. Sci. Food Agric., 86, 1769-1780 (2006)).
- En casos particulares, los fluidos dieléctricos pueden tener viscosidades similares a las de los fluidos dieléctricos derivados de las fuentes anteriores. En casos ilustrativos, el fluido dieléctrico tiene una viscosidad a 40 °C de menos de aproximadamente 110 cSt, por ejemplo, en el rango de 20-30 cSt y/o una viscosidad a 100 °C en el rango de aproximadamente 2 a aproximadamente 15 cSt, por ejemplo, 4-8 cSt.
- [0234] El índice de viscosidad (VI, un número sin unidades) es una medida de la variación de la viscosidad con la variación de la temperatura. Para VI, se compara el kv del aceite a 40 °C con dos aceites de referencia (con VI de 0 y 100), donde todos los aceites tienen el mismo kv a 100 °C (ASTM D2270). El valor VI generalmente debe ser lo más alto posible. Los valores altos de VI indican que la viscosidad del aceite cambia poco con la temperatura. En general: un VI bajo está por debajo de 35; un VI medio es de 35 a 80; un VI alto es de 80 a 110; un VI muy alto es de 110 a 125; un super VI es de 125 a 160; y un VI súper alto es igual o superior a 160. Los VI de fluidos dieléctricos derivados de varios materiales de partida incluyen: derivados de aceite mineral: 103; derivados del aceite de soja: 246; y derivados del aceite de girasol: 206. (Siniawski y col.; J. Synthetic Lubrication; 24, 101-110 (2007)). En casos particulares, los fluidos dieléctricos pueden tener VI similares a los de los fluidos dieléctricos derivados de las fuentes anteriores.
- [0235] El punto de fluidez es la temperatura más baja a la que se verterá o fluirá un líquido (°C) (ASTM D97). El punto de fluidez debe ser al menos 10 °C inferior a la temperatura ambiente prevista más baja a la que se utilizará el fluido dieléctrico. Los puntos de fluidez de los fluidos dieléctricos derivados de diversos materiales de partida incluyen: derivados del aceite mineral: -50 °C; derivados del aceite de soja: -9°C; derivados del aceite de girasol: -12°C; y derivados del aceite de colza (canola): -21°C. (Siniawski y col.; J. Synthetic Lubrication; 24, 101-110 (2007)). En casos particulares, los fluidos dieléctricos pueden tener puntos de fluidez similares a los de los fluidos dieléctricos derivados de las fuentes anteriores. En varios casos, el punto de fluidez de un fluido dieléctrico con base de aceite microbiano puede ser de aproximadamente -10 grados C, aproximadamente -15 grados C, aproximadamente -20 grados C, aproximadamente -25 grados C, aproximadamente 30 grados C, aproximadamente -35 grados C, o alrededor de -40 grados C. Además, el punto de fluidez del fluido dieléctrico con base de aceite microbiano puede estar dentro de cualquier rango limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo, aproximadamente -10 grados C a -40 grados C o aproximadamente -15 grados C a aproximadamente -35 grados C, etc.
- [0236] Por ejemplo, y como se ha descrito anteriormente, el aceite RBD producido según los métodos descritos en este documento se puede producir fácilmente con puntos de fluidez de aproximadamente -8 °C o menos. Este punto de fluidez se puede reducir aún más mezclando el aceite RBD con un depresor del punto de fluidez para lograr aceites con puntos de fluidez en el rango de -15 a -20 °C o menos en función de la cantidad de depresor del punto de fluidez que se agregue al aceite. La fracción de oleína de un solo fraccionamiento produce fácilmente aceite con un punto de fluidez de aproximadamente -11 °C, que puede reducirse mezclando la fracción de oleína con un depresor del punto de fluidez para lograr aceites con puntos de fluidez en el rango de -16 a -20 °C o menos en función de la cantidad de depresor del punto de fluidez añadido al aceite. La fracción de oleína de un segundo fraccionamiento ("super oleína") produce fácilmente aceite con un punto de fluidez de aproximadamente -20 °C, que puede reducirse mezclando la fracción de super oleína con un depresor del punto de fluidez para lograr aceites con puntos de fluidez por debajo de -20 °C, es decir, -26 °C o menos en función de la cantidad de depresor del punto de fluidez que se haya agregado al aceite. Existe en el mercado una amplia variedad de depresores del punto de fluidez, que se pueden adquirir de Chevron, Oronite, Infineum, General Electric, RohmMax Evonik y otros. Los depresores del punto de fluidez ilustrativos para usar con los aceites microbianos (lípidos) descritos en este documento incluyen VISCOPLEX® 10-310 o 1-133 (Rohmax-Evonik Additives GmbH), u otros poli(alquil) acrilatos y poli(metil)acrilatos como INFINEUM® V-351 (Infineum UK limited), PMA-D110 y PMA D.
- [0237] La lubricidad (propiedades antidesgaste) de un fluido dieléctrico es importante, ya que se produce un desgaste prematuro cuando la viscosidad del fluido es insuficiente y la película del fluido no evita el contacto con la superficie (ASTM D2882). En algunos casos, los fluidos dieléctricos pueden tener buena lubricidad (equivalente o mejor que la norma ASTM D2882).
- [0238] La volatilidad, o la tendencia de un aceite a vaporizarse (atm de vapor frente a °C), también es importante para un fluido dieléctrico. En general, se prefiere una volatilidad más baja. En algunos casos, los fluidos dieléctricos

pueden tener una volatilidad tan baja como la de los fluidos dieléctricos tradicionales con base de aceite mineral y de origen biológico, e incluso más baja.

- 5 [0239] La inflamabilidad del fluido dieléctrico es importante. En general, se prefiere una inflamabilidad más baja (véase "Bio-Based Lubricants: A Market Opportunity Study Update" United Soybean Board, Nov. 2008, Omni Tech International, Ltd., www.soynewuses.org/downloads/reports/BioBasedLubricantsMarketStudy.pdf). En casos particulares, los fluidos dieléctricos pueden tener una inflamabilidad tan baja como los fluidos dieléctricos basados en aceite mineral y biodieléctricos tradicionales, e incluso más baja.
- 10 [0240] El punto de inflamación es la temperatura más baja (°C) a la que un aceite se vaporiza para formar una mezcla inflamable en el aire. En las normas ASTM D3278, D3828, D56 y D93 se describen las especificaciones de punto de inflamación adecuadas para fluidos dieléctricos. Para evitar la ignición del aceite, el punto de inflamación generalmente debe ser lo más alto posible. Los puntos de inflamación de los fluidos dieléctricos derivados de diversas fuentes incluyen: derivados del aceite mineral: 147 °C; y derivados de TAG (típico): 324 °C. (New Safety Dielectric Coolants for Distribution and Power Transformers, www.cooperpower.com/Library/pdf/00048.pdf). En algunos casos, los fluidos dieléctricos pueden tener puntos de inflamación similares a los de los fluidos dieléctricos derivados de las fuentes anteriores e iguales o superiores a las especificaciones ASTM D1310 y ASTM D92.
- 15 [0241] El punto de ignición es la temperatura más baja (°C) a la que un aceite continuará ardiendo durante al menos 5 segundos después de la ignición por una llama abierta. En las normas ASTM D1310 y ASTM D92 se describen las especificaciones del punto de inflamación adecuadas para fluidos dieléctricos. Para evitar la ignición del aceite, el punto de combustión debe ser lo más alto posible. Los puntos de inflamación de los fluidos dieléctricos derivados de varias fuentes incluyen: derivados del aceite mineral: 165 °C; y derivados de TAG (típicos): 360 °C. (New Safety Dielectric Coolants for Distribution and Power Transformers, www.cooperpower.com/Library/pdf/00048.pdf) En algunos casos, los fluidos dieléctricos pueden tener puntos de ignición similares a los de los fluidos dieléctricos derivados de las fuentes anteriores e iguales o superiores a las especificaciones ASTM D1310 y ASTM D92. En algunos casos, ese punto de combustión está por encima de los 300 °C, por ejemplo, de 300 °C a 450 °C.
- 20 [0242] La reactividad de un fluido dieléctrico es importante; el fluido dieléctrico no debe reaccionar (o debe tener una baja reactividad) con ácidos/bases, calor y aire.
- 25 [0243] La reactividad hidrolítica se refiere a la susceptibilidad de un fluido a la descomposición en presencia de ácidos o bases. En las normas ASTM D2619 y ASTM D943 se describe la reactividad hidrolítica adecuada para fluidos dieléctricos. En los TAG, los grupos funcionales susceptibles son los ésteres y los grupos funcionales sensibles al ácido/base. En casos particulares, los fluidos dieléctricos pueden tener una baja reactividad hidrolítica (equivalente o mejor que en ASTM D2619 y/o ASTM D943).
- 30 [0244] La estabilidad térmica se refiere a la susceptibilidad de un fluido dieléctrico a la descomposición térmica. En los fluidos dieléctricos derivados del bioaceite, la inestabilidad térmica generalmente se debe a los hidrógenos β del glicerol, lo que finalmente da como resultado productos de eliminación. En casos particulares, los fluidos dieléctricos pueden tener una alta estabilidad térmica (igual o superior a la de los fluidos dieléctricos tradicionales derivados de bioaceites).
- 35 [0245] La susceptibilidad oxidativa se refiere a la susceptibilidad de un fluido dieléctrico a reaccionar con oxígeno para formar productos de oxidación. En ASTM D943 y ASTM D2272 se describe la estabilidad oxidativa adecuada para fluidos dieléctricos. Se desea una baja susceptibilidad a la oxidación; los valores más altos indican más lubricantes oxidativos. En algunos casos, los fluidos dieléctricos pueden tener una susceptibilidad oxidativa baja (por ejemplo, ASTM D943 o ASTM D2272).
- 40 [0246] El número de neutralización (índice de acidez/valor ácido) es una medida de la cantidad de ácido en un aceite o fluido dieléctrico. Los ácidos se forman cuando los aceites (o fluidos dieléctricos) se oxidan con el tiempo y el uso. Los ácidos surgen en los lubricantes de origen biológico a partir de la oxidación, la termólisis de ésteres o la hidrólisis de ácido/base. En las normas ASTM D947, ASTM D3487 y ASTM D6871 se describen números de neutralización adecuados para fluidos dieléctricos. Por lo general, el índice de acidez debe ser lo más bajo posible. El índice de acidez del aceite mineral estándar es 0,03 y el del aceite de origen biológico es 0,06. (Ester Transformer Fluids, IEEE/PES Transformer Committee Meeting, October 7, 2003, www.transformerscommittee.org/info/F03/F03-EsterFluids.pdf). En casos particulares, los fluidos dieléctricos pueden tener índices de acidez bajos (por ejemplo, ASTM D947, ASTM D3487 o ASTM D6871).
- 45 [0247] La miscibilidad se refiere a la capacidad de un fluido para mezclarse con otros fluidos. De manera idónea, un fluido dieléctrico debe poder mezclarse bien con otros lubricantes, fluidos y aditivos, pero no con agua. La
- 50
- 55
- 60

demulsibilidad se refiere a cómo de bien un fluido hidráulico se resiste a mezclarse con agua. La demulsibilidad es óptima en un fluido dieléctrico. La miscibilidad con los lubricantes y aditivos deseados es óptima en un fluido dieléctrico. En algunos casos, los fluidos dieléctricos pueden tener buena miscibilidad y demulsibilidad.

5 [0248] Los fluidos dieléctricos deben tener buenas propiedades de aislamiento eléctrico, es decir, deben evitar la
 10 disipación de corriente eléctrica. Las pruebas del factor de potencia de aislamiento se realizan en transformadores
 para medir las pérdidas dieléctricas (medidas en %). Este valor informa sobre el estado del transformador: humedad,
 sequedad, deterioro del aislante, condición de los devanados, barreras, cambiadores de tomas, aisladores pasantes
 15 y aceite. Los valores del factor de potencia asociados con un fluido dieléctrico deben ser lo más bajos posible,
 típicamente del 0,5 % o menos. Por ejemplo, el factor de potencia del aceite nuevo enviado desde una refinería no
 debe superar el 0,05 % a 25 °C ni el 0,3 % a 100 °C. (Norma IEEE C57, 106-1991 citada en
 www.nttworldwide.com/tech2209.htm). Para aceite nuevo en equipos nuevos que funcionan a 69 kV o menos, el
 factor de potencia no debe ser superior al 0,15 % a 25 °C y no superior al 1,5 % a 100 °C; operando de 69 kV a
 288 kV o menos, el factor de potencia no debe ser superior al 0,10 % a 25 °C y no superior al 1,0 % a 100 °C;
 20 funcionando a 345 kV o más, el factor de potencia no debe ser superior al 0,05 % a 25 °C y no superior al 0,3 % a
 100 °C. El aceite nuevo para interruptores automáticos debe tener un factor de potencia no superior al 0,05 % a
 25 °C y no superior al 0,3 % a 100 °C. El aceite utilizado en los interruptores automáticos no debe tener un factor de
 potencia superior al 1,0 % a 25 °C. algunos casos, los fluidos dieléctricos pueden tener requisitos de factor de
 potencia favorables.

20 [0249] La rigidez dieléctrica se refiere a la máxima fuerza de campo eléctrico que el fluido dieléctrico (aislante
 eléctrico) puede resistir antes de romperse. La rigidez dieléctrica se mide en unidades de MV/m (permisividad
 relativa) y en la norma ASTM D877 se proporcionan especificaciones adecuadas para fluidos dieléctricos. Para su
 uso como aislante eléctrico, la rigidez dieléctrica del lubricante debe ser lo más alta posible. En casos particulares,
 25 los fluidos dieléctricos pueden tener fuerzas dieléctricas iguales o superiores a las especificadas por la norma ASTM
 D877.

30 [0250] El factor de disipación es una medida de la pérdida eléctrica debida al fluido dieléctrico cuando se utiliza como
 aislante eléctrico y se mide en unidades de % a 25 °C. En la norma ASTM D924 se proporcionan especificaciones
 adecuadas para los fluidos dieléctricos. Como aislante eléctrico, el valor del factor de disipación debe ser lo más bajo
 posible. En algunos casos, los fluidos dieléctricos pueden tener factores de disipación iguales o superiores a los
 especificados por la norma ASTM D924.

35 [0251] La conductividad eléctrica es una medida de la capacidad de un fluido dieléctrico, cuando se utiliza como
 aislante eléctrico, para conducir una corriente eléctrica y se mide en unidades de $S \cdot m^{-1}$. En la norma ASTM D2624
 se proporcionan especificaciones adecuadas para fluidos dieléctricos. Como aislante, el valor de la conductividad
 eléctrica del fluido dieléctrico debe ser lo más bajo posible. Los fluidos dieléctricos pueden tener una conductividad
 eléctrica favorable en comparación con los especificados en la norma ASTM D2624.

40 [0252] Para su uso en transformadores eléctricos y otras aplicaciones, las propiedades térmicas del fluido dieléctrico
 deben ser tales que el calor se transfiera de manera eficiente. El calor específico se refiere a la capacidad térmica de
 una sustancia y se mide en unidades de cal/gm°C. En la norma ASTM D-2766 se proporcionan especificaciones
 adecuadas para fluidos dieléctricos. Los valores de calor específico más altos permiten una transferencia de calor y
 un enfriamiento más eficientes. Los valores de calor específico para los fluidos dieléctricos derivados del aceite
 45 mineral son generalmente de alrededor de 0,39 y, para los fluidos dieléctricos derivados de TAG, alrededor de 0,45.
 (Safety Dielectric Coolants for Distribution and Power Transformers, www.cooperpower.com/Library/pdf/00048.pdf).
 Los fluidos dieléctricos pueden tener valores de calor específico iguales o superiores a 0,39 y/o que cumplan con las
 especificaciones de la norma ASTM D2624.

50 [0253] Las propiedades ambientales de un fluido dieléctrico son importantes. Generalmente, se deben emplear
 fluidos dieléctricos seleccionados para mitigar los efectos ambientales de un vertido u otro accidente. La
 biodegradabilidad se refiere a la propiedad de un fluido dieléctrico de descomponerse en dióxido de carbono y agua
 en el medio ambiente y generalmente se mide en unidades de % por 28 días. En las normas OECD 301B y ASTM D-
 6046 se proporcionan especificaciones de biodegradabilidad adecuadas para fluidos dieléctricos. Los valores de
 55 biodegradabilidad fácilmente biodegradables son generalmente ~ 100 %; los valores de biodegradabilidad
 inherentemente biodegradables son generalmente 20-70 %; y los valores de biodegradabilidad no biodegradables
 son generalmente insignificantes al 0 %. Los fluidos dieléctricos derivados del aceite mineral generalmente tienen
 valores de biodegradabilidad en el rango de 15 a 35 %, y los fluidos dieléctricos derivados de bioaceite generalmente
 tienen valores de biodegradabilidad en el rango de 70 a 100 %. Los fluidos dieléctricos pueden tener valores de
 60 biodegradabilidad en el rango de 70-100 % (véase Renewable Lubricants Manual: Biobased Oils, Fluids, & Greases
 www.renewablelubricants.com/ RenewableLubricantsManual_Biodegradable.html#Introduction).

- 5 [0254] El índice de yodo (o número de yodo) es una medida del grado de insaturación de un aceite. Más específicamente, el índice de yodo es la masa de yodo que consumen los enlaces insaturados de un aceite. Los aceites secantes tienen índices de yodo relativamente altos, de alrededor de 175 o más. Los aceites de soja tienen valores de aproximadamente 130 y los aceites de oliva tienen valores de yodo de aproximadamente 80. Los valores de yodo se determinan de forma rutinaria en la técnica. Los métodos estándar para determinar los valores de yodo incluyen ASTM D5768-02 (2006) y DIN 53241. En varios casos, un aceite microbiano en un producto a base de aceite microbiano, por ejemplo, un fluido dieléctrico, puede tener un índice de yodo de entre aproximadamente 25 y 10 aproximadamente 200, por ejemplo, alrededor de 50, alrededor de 75, alrededor de 100, alrededor de 125, alrededor de 150 o alrededor de 175. Además, el índice de yodo puede estar dentro de cualquier rango limitado por cualquiera de estos valores, por ejemplo, alrededor de 25 a alrededor de 175, alrededor de 50 a alrededor de 200, alrededor de 50 a alrededor de 175, etc.
- 15 [0255] La insaturación de ácidos grasos también se puede modificar. El aumento de la insaturación disminuye los puntos de congelación/vertido. La monoinsaturación, como la que se observa en los biolubricantes con alto contenido de ácido oleico, actualmente es óptima y representa un equilibrio entre el punto de fluidez y la reactividad oxidativa. Los aceites monoinsaturados reaccionan con el aire, pero mucho más lentamente que los ácidos grasos poliinsaturados o PUFA. Los ejemplos de PUFA incluyen ácido araquidónico (ARA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA). Los ácidos grasos diinsaturados y poliinsaturados son muy susceptibles a la 20 oxidación y no son adecuados para aplicaciones eléctricas. Un problema con los fluidos dieléctricos derivados de aceites vegetales es la presencia de ácidos grasos poliinsaturados (por ejemplo, ácido linoleico y ácido linolénico). Una ventaja de los fluidos dieléctricos descritos en este documento es que el aceite microbiano que comprenden (o del que se derivan) contiene menos ácidos grasos di- y poliinsaturados que los fluidos dieléctricos derivados de otros bioaceites y, en algunos casos, nada de esos ácidos.
- 25 [0256] El perfil de lípidos del fluido dieléctrico suele ser muy similar al perfil de lípidos del aceite de alimentación. Se prefieren altas cantidades de ácidos grasos monoinsaturados de cadena más larga (C16-C18) para su uso como fluidos dieléctricos. Los ácidos grasos poliinsaturados (como C18:2, C18:3, ARA, EPA y DHA) no son los preferidos debido a la oxidación y la producción de productos de oxidación. Los ácidos grasos saturados tienden a ser sólidos o líquidos con un alto punto de congelación, lo que hace que los ácidos grasos saturados no sean deseables en grandes cantidades en los fluidos dieléctricos. En varios casos, el aceite microbiano (lípidos) útil en los fluidos dieléctricos tiene al menos alrededor del 50 % de C18:1, por ejemplo, al menos alrededor del 55 %, al menos alrededor del 60 %, al menos alrededor del 65 %, al menos alrededor del 70 %, como mínimo al menos alrededor del 75 %, al menos alrededor del 80 %, al menos alrededor del 85 % y al menos alrededor del 90 % C18:1. En estos u 30 otros casos, el aceite microbiano (lípidos) tiene menos del 10 % de C18:2, por ejemplo, menos del 7,5 %, menos del 5 %, menos del 2,5 % y menos del 1 % de C18:2. El aceite microbiano puede tener cualquier combinación de porcentajes de C18:1 y C18:2 que suman 100 % o menos. Por ejemplo, el aceite microbiano puede tener al menos un 50 % de C18:1 y menos de un 10 % de C18:2 o al menos un 80 % de C18:1 y menos de un 5 % de C18:2.
- 35 [0257] Con fines ilustrativos, se proporcionan aceites de TAG de microbios oleaginosos que contienen menos del 2 % de C18:2 (véase el Ejemplo 4), en comparación con el 20-75 % del aceite de girasol y el 48-65 % del aceite de soja. También se proporcionan aceites de TAG con menos del 0,5 % de C18:3, en comparación con el 5-10 % del aceite de soja.
- 40 [0258] Estas y otras propiedades de un fluido dieléctrico se pueden obtener, manipular y/o variar según los métodos descritos en este documento para proporcionar un producto, como un lubricante, un fluido hidráulico, un aceite industrial o un fluido dieléctrico, adecuado para cualquier aplicación. Por ejemplo, se puede manipular genéticamente microbios oleaginosos, como se ha descrito anteriormente, para alterar la longitud de la cadena, la saturación y/o la composición de los diversos ácidos grasos del lípidos. En algunos casos, un aceite microbiano útil como se describe 45 en este documento lo produce un microbio manipulado genéticamente que se ha manipulado para que exprese uno o más genes exógenos. Por ejemplo, el microbio modificado genéticamente puede ser *Prototheca* (por ejemplo, *Prototheca moriformis*) o *Chlorella*. Los genes exógenos ilustrativos incluyen aquellos que codifican sacarasa y/o acil-ACP tioesterasa.
- 50 [0259] Además, los lípidos extraídos de microalgas o levaduras oleaginosas pueden someterse a diversas modificaciones químicas para lograr una propiedad deseada en un fluido dieléctrico. Las alteraciones típicas incluyen la alteración de la longitud de la cadena de ácidos grasos (FA). Los ácidos grasos de cadena más corta tienen puntos de fluidez reducidos. Las modificaciones químicas también pueden usarse para reducir la insaturación e incluyen alquilación, adición de radicales, acilación, reacciones alder-eno, hidroformilación, hidrogenación selectiva, 55 oligomerización, hidroaminometilación, aciloxilación y epoxidación. Además, o como alternativa, se puede mezclar un
- 60

aditivo, como un depresor del punto de fluidez, con el aceite microbiano procesado para lograr una propiedad deseada, por ejemplo, el punto de fluidez. Los aditivos ilustrativos se analizan con mayor detalle a continuación.

5 [0260] Como se ha mencionado antes, en casos particulares, el aceite microbiano crudo extraído de un microbio oleaginoso típicamente se "enriquece" antes de incorporarlo a un producto descrito en este documento. Por ejemplo, puede haber contaminantes en los lípidos microbianos que pueden cristalizarse y/o precipitarse y caer de la solución como sedimento. La formación de sedimentos es particularmente un problema cuando se usa un fluido dieléctrico a temperaturas más bajas. El sedimento o los precipitados pueden causar problemas tales como disminución del flujo, obstrucción, etc. En la técnica se conocen procesos que se ocupan específicamente de la eliminación de estos
10 contaminantes y sedimentos para producir un producto de mayor calidad. Entre los ejemplos de dichos procesos se incluyen el pretratamiento del aceite para eliminar contaminantes tales como fosfolípidos y ácidos grasos libres (por ejemplo, desgomado, refinado cáustico y filtración con adsorbente de sílice).

15 [0261] La preparación para el invierno se puede utilizar para enriquecer el aceite microbiano. Existen varios enfoques para preparar un fluido dieléctrico para el invierno. Un enfoque es mezclar el fluido con otros fluidos dieléctricos. Otro enfoque es utilizar aditivos que pueden reducir el punto de congelación. El fraccionamiento en seco también se puede utilizar para reducir la proporción relativa de la fracción saturada (la fracción de estearina). Al enfriar el aceite, se pueden cristalizar los saturados y luego filtrar los cristales. El fraccionamiento separa selectivamente un fluido en componentes o fracciones individuales, lo que permite la eliminación o inclusión de fracciones específicas. Otros
20 métodos de fraccionamiento incluyen el fraccionamiento de urea, el fraccionamiento de solventes y la destilación térmica.

25 [0262] Luego se puede agregar tierra de diatomeas u otro material filtrante como arcilla blanqueadora al líquido enfriado para formar una suspensión, que luego se puede filtrar a través de una hoja de presión u otro tipo de filtro para eliminar las partículas. Luego, el líquido filtrado puede pasar a través de un filtro de residuos para eliminar los sedimentos restantes y la tierra de diatomeas, con el fin de producir un producto final. Alternativamente, o además, este producto, o el aceite microbiano producido al final de cualquiera de los pasos del proceso anterior, se puede mezclar con un depresor del punto de fluidez para producir un producto, como un fluido dieléctrico.

30 [0263] Un método para producir un aceite lubricante o un fluido dieléctrico puede ser un método que comprende los pasos de (a) cultivar un microorganismo que contiene lípidos usando métodos descritos en este documento, (b) lisar un microorganismo que contiene lípidos para producir un lisado, (c) aislar la composición lipídica del microorganismo lisado, y (d) enriquecer la composición lipídica aislada, con lo que se produce un aceite lubricante o fluido dieléctrico. Típicamente, el paso (d) incluirá uno o más pasos de refinado, blanqueo y/o desodorización y uno o más pasos de
35 fraccionamiento para reducir la proporción relativa de la fracción saturada eliminando los triglicéridos palmítico y/o esteárico. En otro caso, el aceite lubricante o fluido dieléctrico resultante del paso (d) se mezcla con un depresor del punto de fluidez.

40 [0264] Opcionalmente, se pueden mezclar otros aditivos para aumentar la estabilidad oxidativa de los lípidos aislados con el aceite microbiano, lubricante o fluido dieléctrico producido por estos métodos. Los ejemplos de tales aditivos incluyen antioxidantes tales como tocoferoles (vitamina E, por ejemplo, alfa-, beta- y/o delta-tocoferol), ácido ascórbico (vitamina C). Los antioxidantes adecuados están disponibles en el mercado. La empresa BASF comercializa una línea de antioxidantes adecuados a base de fenol y a base de aminas con la marca IRGANOX®. IRGANOX L109, IRGANOX L64, IRGANOX L57, otros antioxidantes IRGANOX y otros compuestos a base de
45 aminas y fenol son adecuados como aditivos antioxidantes para los aceites y productos, incluidos los fluidos dieléctricos. Otros ejemplos no excluyentes de antioxidantes incluyen butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), monobutilhidroquinona terciaria (TBHQ), butilhidroanisol, tetrahidrobutrofenona, palmitato de ascorbilo y galato de propilo. En algunos casos, un producto a base de aceite microbiano, por ejemplo, un fluido dieléctrico, incluye adicionalmente un antioxidante del 0,1 % al 5 % en peso, y preferiblemente del 0,5 % al 2 %.

50 [0265] Otros aditivos que se pueden añadir opcionalmente a los lípidos aislados para su uso como productos tales como fluidos dieléctricos son desactivadores de iones metálicos, inhibidores de corrosión, aditivos antidesgaste y/o protectores contra la hidrólisis. Algunos aditivos ampliamente utilizados en fluidos dieléctricos se describen en Schneider, 2006, J Science Food and Agriculture; 86: 1769-1780.). Los desactivadores de iones metálicos tienen dos
55 funciones principales. Suprimen el ataque químico en la superficie del metal y también pasivan la superficie del metal para suprimir cualquier residuo que pueda actuar como catalizador para la formación de radicales (electrones desapareados). Los desactivadores de metales están disponibles en el mercado. Por ejemplo, la empresa BASF ofrece una línea de desactivadores de metales, incluida la línea de desactivadores de metales IRGAMET®. La empresa RTVANDERBILT vende la línea de desactivadores de metales CUVAN®. Otros ejemplos de desactivadores de metales incluyen triazoles derivatizados incluyendo 1-(di-isooctilaminometil)-1,2,4-triazol, 1-(2-metoxiprop-2-il)toliltriazol, 1-(1-ciclohexiloxipropil)toliltriazol, 1-(1-ciclohexiloxiheptil)toliltriazol, 1-(1-ciclohexiloxibutil)toliltriazol, 1-
60

[bis(2-etilhexil)aminometil-4-metilbenzotriazol, boros derivatizados incluyendo borato de trietilo, borato de tripropilo, borato de triisopropilo, borato de tributilo, borato de tripentilo, borato de trihexilo, borato de triciclohexilo, borato de trioctilo, borato de triisooctilo y otros desactivadores metálicos de hidrazina derivatizados, por ejemplo, 2',3-bis[[3-[3,5-di-tert-butil-4-hidroxifenil]propionil]]proponiohidrazina, y similares). En algunos casos, un producto a base de aceite microbiano, por ejemplo, un fluido dieléctrico, incluye adicionalmente uno o más desactivadores de metales en una proporción del 0,1 % al 5 % en peso, y preferiblemente del 0,5 % al 2 %.

[0266] Por lo tanto, los fluidos dieléctricos preparados según los métodos descritos en este documento pueden contener varios aditivos, incluidos, entre otros, uno o más de los siguientes aditivos: (a) un antioxidante, incluidos, entre otros, BHT y otros fenoles; (b) un desactivador de iones metálicos tales como Cu, Zn y similares, incluidos, entre otros, benzotriazol; (c) inhibidores de la corrosión, incluidos, entre otros, sulfonatos de éster y ésteres de ácido succínico; (d) desemulsionantes; (e) aditivos antidesgaste, incluidos, entre otros, ditiofosfato de zinc; (f) aditivos para reducir el punto de fluidez, incluidos, entre otros, copolímeros de anhídrido maleico y estireno, poli(alquil)acrilatos, incluidos, entre otros, polimetacrilatos; y (g) compuestos que protegen contra la hidrólisis, incluyendo pero sin limitarse a carbodiimidias.

[0267] En algunos casos, un método produce un producto que incluye un aceite microbiano que tiene un punto de fluidez entre aproximadamente -10 °C y aproximadamente -40 °C, y en el que la composición de ácidos grasos del aceite microbiano es al menos 50 % de C18:1 y menos del 10 % de C18:2. El método implica cultivar un microbio modificado genéticamente diseñado para expresar uno o más genes exógenos hasta que el microbio tenga al menos un 10 % de aceite en peso en seco. Los microbios modificados genéticamente ilustrativos incluyen *Prototheca* (por ejemplo, *Prototheca moriformis*) o *Chlorella*. Los genes exógenos ilustrativos incluyen aquellos que codifican sacarasa y/o acil-ACP tioesterasa. En algunos casos, el microbio manipulado genéticamente expresa al menos dos genes exógenos, por ejemplo, que codifican la sacarasa y acil-ACP tioesterasa, que codifican dos acil-ACP tioesterasas diferentes, o que codifican sacarasa y dos acil-ACP tioesterasas diferentes. Una vez que el microbio tiene al menos un 10 % de aceite en peso en seco, el aceite se separa del microbio y se somete a refinado, blanqueo, desodorización o desgomado para producir aceite RBD. Opcionalmente, se puede agregar al aceite RBD un antioxidante, un desactivador de iones metálicos, un inhibidor de la corrosión, un desemulsionante, un aditivo antidesgaste, un depresor del punto de fluidez y/o un compuesto antihidrólisis para producir el producto deseado.

[0268] En casos particulares, un método de fraccionamiento produce un aceite microbiano adecuado para su incorporación en productos (por ejemplo, un fluido dieléctrico) que tiene un punto de fluidez entre aproximadamente -10 °C y aproximadamente -40 °C, y en donde la composición de ácidos grasos del aceite microbiano es al menos 50 % de C18:1 y menos de 10 % de C18:2. El método implica someter un aceite microbiano inicial (es decir, "primero") a refinado, blanqueo, desodorización o desgomado para producir aceite RBD, en el que el aceite RBD se caracteriza por un punto de fluidez inicial y una primera temperatura, lo que reduce la temperatura del aceite RBD a una segunda temperatura, y filtrar el aceite RBD a la segunda temperatura para proporcionar un segundo aceite microbiano caracterizado por un segundo punto de fluidez que es más bajo que el punto de fluidez inicial, donde el segundo punto de fluidez está entre aproximadamente -10 °C y aproximadamente -40 °C, y en donde la composición de ácidos grasos del segundo aceite microbiano es al menos 50 % de C18:1 y menos de 10 % de C18:2. Una primera temperatura ilustrativa está entre más de 15 °C y aproximadamente 50 °C, y una segunda temperatura ilustrativa está entre aproximadamente -15 °C y aproximadamente 15 °C. Se puede añadir un aditivo antidesgaste, un depresor del punto de fluidez y/o un compuesto antihidrólisis al segundo aceite microbiano para producir un producto deseado. En variaciones de estos casos, el primer aceite microbiano se produce cultivando un microbio modificado genéticamente para que exprese uno o más genes exógenos hasta que el microbio tenga al menos un 10 % de aceite por peso en seco y luego separando el aceite del microbio para producir el primer aceite microbiano. Este método se puede emplear para producir, por ejemplo, un lubricante, un fluido hidráulico, un aceite industrial o un fluido dieléctrico. En algunos casos, cuando el producto es un fluido dieléctrico, el fluido incluye uno o más de un antioxidante, un desactivador de iones metálicos, un inhibidor de la corrosión, un desemulsionante, un aditivo antidesgaste, un depresor del punto de fluidez o un compuesto antihidrólisis.

[0269] En un caso, se produce un fluido dieléctrico mezclando aceites y/o fluidos dieléctricos derivados de microbios oleaginosos con aceites o fluidos dieléctricos existentes. Los aceites y fluidos dieléctricos existentes pueden ser de origen vegetal o animal (o ambos, por ejemplo, petróleo).

[0270] Por lo tanto, se puede usar una variedad de métodos en los que se utilizan lípidos de microbios oleaginosos para producir fluidos dieléctricos y otros productos útiles en una variedad de aplicaciones industriales y de otro tipo. Los ejemplos de procesos para modificar el aceite producido por los métodos descritos en este documento incluyen, pero no se limitan a, hidrólisis del aceite, hidroprocesamiento del aceite y esterificación del aceite. Otras modificaciones químicas de lípidos de microalgas incluyen, sin limitación, epoxidación, oxidación, hidrólisis, sulfatación, sulfonación, etoxilación, propoxilación, amidación y saponificación. La modificación del aceite de

microalgas produce productos oleoquímicos básicos que pueden modificarse aún más para dar productos oleoquímicos derivados seleccionados para una función deseada. De manera similar a la descrita anteriormente con referencia a los procesos de producción de combustible, estas modificaciones químicas también se pueden realizar en los aceites generados a partir de los cultivos microbianos descritos en este documento.

5 [0271] En algunos casos, un fluido dieléctrico descrito en este documento se emplea en un sistema eléctrico, como un transformador, que incluye un tanque que alberga un conjunto de núcleo/bobina de transformador, en el que el fluido dieléctrico rodea el conjunto de núcleo/bobina. En variaciones de tales casos, el tanque también incluye un material absorbente de oxígeno que está en contacto con los gases del tanque, pero aislado del contacto con el fluido aislante dieléctrico. Los materiales absorbentes de oxígeno adecuados son aquellos que son capaces de reducir la concentración de oxígeno libre en la atmósfera que rodea al fluido dieléctrico dentro del tanque y que a su vez reducen la presencia de oxígeno disuelto en el propio fluido. Dichos compuestos pueden denominarse compuestos captadores de oxígeno. Los compuestos captadores de oxígeno útiles incluyen los comúnmente empleados en la industria del envasado de alimentos. Entre los representantes de compuestos útiles de captación de oxígeno se incluyen los siguientes: sulfito de sodio; sulfato de cobre pentahidratado; una combinación de carbón y polvo de hierro activado; mezclas de hidrosulfito, hidróxido de calcio, bicarbonato de sodio y carbón activado; un polvo de haluro metálico que recubre la superficie de un polvo metálico; y combinaciones de compuestos alcalinos, tales como hidróxido de calcio, con carbonato de sodio o bicarbonato de sodio. También se consideran útiles las mezclas y combinaciones de una o más de las composiciones anteriores. También son útiles como compuestos captadores de oxígeno aquellas composiciones proporcionadas según la patente de EE. UU. n.º 2,825,651, que se incorpora por referencia, que incluye una composición captadora de oxígeno que comprende una mezcla de una sal de sulfito y un acelerador tal como sulfato de cobre hidratado, cloruro estannoso u óxido de cobalto. Otra clase útil de compuestos captadores de oxígeno incluye aquellas composiciones que comprenden una sal de manganeso, hierro, cobalto o níquel, un compuesto alcalino y un sulfito o compuesto delicuescente, tal como se describe en la patente de EE. UU. n.º 4,384,972, que también se incorpora por referencia. Los compuestos captadores de oxígeno preferidos incluyen (o incluyen como su componente base) al menos un óxido de hierro básico, tal como un óxido de hierro ferroso, o están hechos de mezclas de materiales de óxido de hierro. Las composiciones útiles que contienen óxido de hierro están disponibles en el mercado, por ejemplo, con el nombre comercial "Ageless" de Mitsubishi Gas Chemical Company de Duncan, Carolina del Sur (EE. UU.) y con el nombre comercial "Freshmax" de Multisorb Technologies, Inc. de Buffalo, Nueva York (EE. UU.). Son útiles los agentes absorbentes de oxígeno que comprenden una mezcla de sales ferrosas y un modificador de oxidación y/o un compuesto de sulfito o sulfato metálico.

35 [0272] La invención, tal como se define en las reivindicaciones, se ejemplifica en los siguientes ejemplos, que se ofrecen con el fin de ilustrar, pero no limitar, la invención reivindicada.

VIII. EJEMPLOS

EJEMPLO 1: Métodos para cultivar *Prototheca*

40 [0273] Se cultivaron cepas de *Prototheca* para lograr un alto porcentaje de aceite por peso celular seco. Las células criopreservadas se descongelaron a temperatura ambiente y se añadieron 500 ul de células a 4,5 ml de medio (4,2 g/L de K₂HPO₄, 3,1 g/l de NaH₂PO₄, 0,24 g/L de MgSO₄·7H₂O, 0,25 g/L de ácido cítrico monohidrato, 0,025 g/L de CaCl₂·2H₂O, 2 g/L de extracto de levadura) más glucosa al 2 % y se cultivaron durante 7 días a 28 °C con agitación (200 r.p.m.) en una placa de 6 pocillos. Los pesos celulares en seco se determinaron centrifugando 1 ml de cultivo a 14 000 r.p.m. durante 5 minutos en un tubo Eppendorf pesado previamente. Se descartó el sobrenadante del cultivo y se lavó el sedimento celular resultante con 1 ml de agua desionizada. El cultivo se centrifugó de nuevo, se descartó el sobrenadante y los sedimentos celulares se pusieron a -80 °C hasta que se congelaron. A continuación, las muestras se liofilizaron durante 24 horas y se calcularon los pesos celulares en seco. Para la determinación de los lípidos totales en los cultivos, se extrajeron 3 ml de cultivo y se sometieron a análisis utilizando un sistema Ankom (Ankom Inc., Macedon, NY) según el protocolo del fabricante. Las muestras se sometieron a extracción por solvente con un extractor Amkom XT10 según el protocolo del fabricante. Los lípidos totales se determinaron como la diferencia de masa entre las muestras secas hidrolizadas con ácido y las muestras secas extraídas con disolvente. Las medidas de porcentaje del peso celular en seco de aceite se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Porcentaje de aceite por peso celular en seco

Especie	Cepa	% de aceite
<i>Prototheca stagnora</i>	UTEX 327	13,14
<i>Prototheca moriformis</i>	UTEX 1441	18,02
<i>Prototheca moriformis</i>	UTEX 1435	27,17

[0274] Se genotiparon muestras de microalgas de múltiples cepas del género *Prototheca*. El ADN genómico se aisló de la biomasa de algas como sigue. Se centrifugaron células (aproximadamente 200 mg) de cultivos líquidos durante 5 minutos a 14 000 x g. A continuación, las células se resuspendieron en agua destilada estéril, se centrifugaron durante 5 minutos a 14 000 x g y se descartó el sobrenadante. Se añadió una sola perla de vidrio de ~2 mm de diámetro a la biomasa y los tubos se pusieron a -80 °C durante al menos 15 minutos. Se retiraron las muestras y se añadieron 150 µl de tampón de trituración (Sarkosyl al 1 %, sacarosa 0,25 M, NaCl 50 mM, EDTA 20 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, 0,5 µg/ul de RNasa A). Los gránulos se resuspendieron mediante agitación vorticial breve, seguido de la adición de 40 µl de NaCl 5M. Las muestras se agitaron brevemente en un agitador vorticial, seguido de la adición de 66 µl de CTAB al 5 % (bromuro de cetiltrimetilamonio) y una breve agitación vorticial final. A continuación, las muestras se incubaron a 65 °C durante 10 minutos, después de lo cual se centrifugaron a 14 000 x g durante 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se extrajo una vez con 300 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 12:12:1, seguido de centrifugación durante 5 minutos a 14 000 x g. La fase acuosa resultante se transfirió a un tubo nuevo que contenía 0,7 vol de isopropanol (190 µl), se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos o durante la noche a 4 °C. El ADN se recuperó mediante centrifugación a 14 000 x g durante 10 minutos. A continuación, el sedimento resultante se lavó dos veces con etanol al 70 %, seguido de un lavado final con etanol al 100 %. Los sedimentos se secaron al aire durante 20-30 minutos a temperatura ambiente seguido de resuspensión en 50 µl de TrisCl 10 mM, EDTA 1 mM (pH 8,0).

[0275] Cinco µl de ADN de algas total, preparado como se ha descrito anteriormente, se diluyeron 1:50 en Tris 10 mM, pH 8,0. Las reacciones de PCR, volumen final de 20 µl, se establecieron como sigue. Se añadieron diez µl de master mix 2 x iProof HF (BIO-RAD) a 0,4 µl de cebador SZ02613 (5'-TGTTGAAGAATGAGCCGGCGAC-3' (SEQ ID N.º 9) a una concentración de solución madre de 10 mM). Esta secuencia de cebadores va desde la posición 567-588 en el número de acceso de Gen Bank L43357 y está altamente conservada en plantas superiores y genomas de plastidios de algas. A esto le siguió la adición de 0,4 µl del cebador SZ02615 (5'-CAGTGAGCTATTACGCACTC-3' (SEQ ID N.º10) a una concentración de reserva de 10 mM). Esta secuencia de cebador es complementaria a la posición 1112-1093 en el número de acceso de Gen Bank L43357 y está altamente conservada en plantas superiores y genomas de plastidios de algas. A continuación, se agregaron 5 µl de ADN total diluido y 3,2 µl de dH₂O. Las reacciones de PCR se realizaron de la siguiente manera: 98 °C, 45"; 98 °C, 8"; 53 °C, 12"; 72 °C, 20" durante 35 ciclos seguidos de 72 °C durante 1 min y mantenimiento a 25 °C. Para la purificación de los productos de PCR, se añadieron 20 µl de Tris 10 mM, pH 8,0 a cada reacción, seguido de extracción con 40 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 12:12:1, agitación en agitador vorticial y centrifugación a 14 000 xg durante 5 minutos. Las reacciones de PCR se aplicaron a columnas S-400 (GE Healthcare) y se centrifugaron durante 2 minutos a 3000 x g. Los productos de PCR purificados se clonaron posteriormente con TOPO en PCR8/GW/TOPO y se seleccionaron los clones positivos en placas LB/Spec. El ADN plasmídico purificado se secuenció en ambas direcciones usando cebadores directos e inversos M13. En total, se seleccionaron doce cepas de *Prototheca* para obtener las secuencias de ADN de su ARNr 23S, y las secuencias se enumeran en el Listado de secuencias. A continuación, se incluye un resumen de las cepas y los números de lista de secuencias. Se analizó la divergencia global de las secuencias con respecto a la secuencia UTEX 1435 (SEQ ID N.º 15). Surgieron dos pares (UTEX 329/UTEX 1533 y UTEX 329/UTEX 1440) como los más divergentes. En ambos casos, la alineación por pares dio como resultado una identidad de secuencia por pares del 75,0 %. El porcentaje de identidad de secuencia con UTEX 1435 también se incluye a continuación:

Especie	Cepa	% identidad de nucleótidos	SEQ ID N.º
<i>Prototheca kruegani</i>	UTEX 329	75,2	SEQ ID N.º11
<i>Prototheca wickerhamii</i>	UTEX 1440	99	SEQ ID N.º12
<i>Prototheca stagnora</i>	UTEX 1442	75,7	SEQ ID N.º13
<i>Prototheca moriformis</i>	UTEX 288	75,4	SEQ ID N.º14
<i>Prototheca moriformis</i>	UTEX 1439; 1441; 1435; 1437	100	SEQ ID N.º15
<i>Prototheca wickerhamii</i>	UTEX 1533	99,8	SEQ ID N.º16
<i>Prototheca moriformis</i>	UTEX 1434	75,9	SEQ ID N.º17
<i>Prototheca zopfii</i>	UTEX 1438	75,7	SEQ ID N.º18
<i>Prototheca moriformis</i>	UTEX 1436	88,9	SEQ ID N.º19

[0276] Se analizó el perfil de lípidos de las muestras de lípidos de un subconjunto de las cepas enumeradas anteriormente mediante HPLC. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 10.

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

Cepa	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1
UTEX 327	0	12,01	0	0	50,33	17,14	0	0	0
UTEX 1441	1,41	29,44	0,70	3,05	57,72	12,37	0,97	0,33	0

UTEX 1435	1,09	25,77	0	2,75	54,01	11,90	2,44	0	0
-----------	------	-------	---	------	-------	-------	------	---	---

[0277] Aceite extraído de *Prototheca moriformis* UTEX 1435 (mediante extracción con solvente o utilizando una prensa extrusora) se analizó para determinar los carotenoides, clorofila, tocoferoles, otros esteroides y tocotrienoles. Los resultados se resumen a continuación en la Tabla 11.

5

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

	Aceite prensado (mcg/ml)	Aceite extraído con disolvente (mcg/ml)
cis-luteína	0,041	0,042
transluteína	0,140	0,112
trans-zeaxantina	0,045	0,039
cis-zeaxantina	0,007	0,013
t-alfa-critoxantina	0,007	0,010
t-beta-critoxantina	0,009	0,010
t-alfa-caroteno	0,003	0,001
c-alfa-caroteno	no se detectó	no se detectó
t-beta-caroteno	0,010	0,009
9-cis-beta-caroteno	0,004	0,002
Licopeno	no se detectó	no se detectó
Carotenoides totales	0,267	0,238
Clorofila	<0,01 mg/kg	<0,01 mg/kg
Tocoferoles y esteroides		
	Aceite prensado (mg/100g)	Aceite extraído con disolvente (mg/100g)
Gamma tocoferol	0,49	0,49
Campesterol	6,09	6,05
estigmasterol	47,6	47,8
Beta-sitosterol	11,6	11,5
Otros esteroides	445	446
Tocotrienoles		
	Aceite prensado (mg/g)	Aceite extraído con disolvente (mg/g)
alfa tocotrienol	0,26	0,26
beta tocotrienol	<0,01	<0,01
gamma tocotrienol	0,10	0,10
Tocotrienol detallado	<0,01	<0,01
Tocotrienoles totales	0,36	0,36

[0278] Se refinó y blanqueó aceite extraído de *Prototheca moriformis*, de cuatro lotes separados, usando métodos estándar de procesamiento de aceite vegetal. Brevemente, el aceite crudo extraído de *Prototheca moriformis* se clarificó en un decantador horizontal, donde se separaron los sólidos del aceite. El aceite clarificado se transfirió luego a un tanque con ácido cítrico y agua y se dejó reposar por aproximadamente 24 horas. Después de 24 horas, la mezcla en el tanque formó 2 capas separadas. La capa inferior estaba compuesta por agua y gomas que luego se eliminaban por decantación antes de transferir el aceite desgomado a un tanque de blanqueo. Luego se calentó el aceite junto con otra dosis de ácido cítrico. A continuación, se añadió arcilla de blanqueo al tanque de blanqueo y la mezcla se calentó más al vacío para evaporar el agua que estaba presente. Luego, la mezcla se bombeó a través de un filtro de hojas para eliminar la arcilla blanqueadora. Luego, el aceite filtrado se pasó a través de un filtro de pulido final de 5 µm y luego se recogió para su almacenamiento hasta su uso. Luego se analizó el aceite refinado y blanqueado (RB) para detectar los carotenoides, clorofila, esteroides, tocotrienoles y tocoferoles. Los resultados de estos análisis se resumen en la Tabla 12 a continuación. "Nd" denota que no se detectó y la sensibilidad de detección se enumera a continuación:

Sensibilidad de detección

25 [0279]

Carotenoides (mcg/g) nd = <0,003 mcg/g

Clorofila (mcg/g) nd = <0,03 mcg/g

Esteroides (%) nd = 0,25 %

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

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

	Lote A	Lote B	Lote C	Lote D
Carotenoides (mcg/g)				
Luteína	0,025	0,003	nd	0,039
Zeaxantina	nd	nd	nd	nd
Cis-luteína/zeaxantina	nd	nd	nd	nd
Trans-alfa-criptoxantina	nd	nd	nd	nd
Trans-beta-criptoxantina	nd	nd	nd	nd
Trans-alfa-caroteno	nd	nd	nd	nd
Cis-alfa-caroteno	nd	nd	nd	nd
Trans-beta-caroteno	nd	nd	nd	nd
Cis-beta-caroteno	nd	nd	nd	nd
Licopeno	nd	nd	nd	nd
Sin identificar	0,219	0,066	0,050	0,026
Carotenoides totales	0,244	0,069	0,050	0,065
Clorofila (mcg/g)				
Clorofila A	0,268	0,136	0,045	0,166
Clorofila B	nd	nd	nd	nd
Clorofila total	0,268	0,136	0,045	0,166
Esteroides (%)				
Brassicasterol	nd	nd	nd	nd
Campesterol	nd	nd	nd	nd
Estigmasterol	nd	nd	nd	nd
Beta-sitosterol	nd	nd	nd	nd
Esteroides totales	nd	nd	nd	nd
Tocoferoles (mcg/g)				
Alfa-tocoferol	23,9	22,8	12,5	8,2
Beta-tocoferol	3,72	nd	nd	nd
Gamma-tocoferol	164	85,3	43,1	38,3
Delta-tocoferol	70,1	31,1	18,1	14,3
Tocoferoles totales	262	139,2	73,7	60,8
Tocotrienoles (mcg/g)				
Alfa-tocotrienol	190	225	253	239
Beta-tocotrienol	nd	nd	nd	nd
Gamma-tocotrienol	47,3	60,4	54,8	60,9
Delta-tocotrienol	12,3	16,1	17,5	15,2
Tocotrienoles totales	250	302	325	315

- 5 [0280] También se analizaron los mismos cuatro lotes de aceite de *Prototheca moriformis* en busca de oligoelementos y los resultados se resumen a continuación en la Tabla 13.

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

	Lote A	Lote B	Lote C	Lote D
Análisis elemental (ppm)				
Calcio	0,08	0,07	< 0,04	0,07
Fósforo	< 0,2	0,38	< 0,2	0,33
Sodio	< 0,5	0,55	< 0,5	< 0,5
Potasio	1,02	1,68	< 0,5	0,94
Magnesio	< 0,04	< 0,04	< 0,04	0,07
Manganeso	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
Hierro	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02
Zinc	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02
Cobre	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
Azufre	2,55	4,45	2,36	4,55
Plomo	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2
Silicio	0,37	0,41	0,26	0,26

Níquel	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2
Cloruro orgánico	< 1,0	< 1,0	< 1,0	2,2
Cloruro inorgánico	< 1,0	< 1,0	< 1,0	< 1,0
Nitrógeno	4,4	7,8	4,2	6,9
Litio	< 0,02	< 0,02	< 0,02	< 0,02
Boro	0,07	0,36	0,09	0,38
Aluminio	-	< 0,2	< 0,2	< 0,2
Vanadio	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
Color Lovibond (°L)				
Rojo	5,0	4,3	3,2	5,0
Amarillo	70,0	70,0	50,0	70,0
Mono y diglicéridos por HPLC (%)				
Diglicéridos	1,68	2,23	1,25	1,61
Monoglicéridos	0,03	0,04	0,02	0,03
Ácidos grasos libres (FFA)	1,02	1,72	0,86	0,83
Jabones	0	0	0	
Triglicéridos Oxidados y Polimerizados				
Triglicéridos Oxidados (%)	3,41	2,41	4,11	1,00
Triglicéridos Polimerizados (%)	1,19	0,45	0,66	0,31
Valor de peróxido (meg/kg)	0,75	0,80	0,60	1,20
Valor de p-anisidina (adimensional)	5,03	9,03	5,44	20,1
Agua y otras impurezas (%)				
Humedad según método Karl Fisher	0,8	0,12	0,07	0,18
Compuestos polares totales	5,02	6,28	4,54	5,23
Materia insaponificable	0,92	1,07	0,72	1,04
Impurezas insolubles	<0,01	<0,01	0,01	< 0,01
Aceite total (%)				
Aceite neutro	98,8	98,2	99,0	98,9

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

5 [0281] Se prepararon microportadores de oro de Seashell de 550 nanómetros según el protocolo del fabricante. El plásmido (20 µg) se mezcló con 50 µl de tampón de unión y 60 µl (30 mg) de portadores de oro S550d y se incubó en hielo durante 1 min. Se añadió tampón de precipitación (100 µl) y la mezcla se incubó en hielo durante 1 min más. Después de agitar con agitador vorticial, las partículas recubiertas de ADN se sedimentaron por rotación a 10 000 r.p.m. en una microcentrifuga Eppendorf 5415C durante 10 segundos. El sedimento de oro se lavó una vez con 500 µl de etanol frío al 100 %, se sedimentó mediante centrifugación breve en la microcentrifuga y se resuspendió con 50 µl de etanol enfriado con hielo. Después de una breve sonicación (1-2 segundos), se transfirieron inmediatamente 10 µl de partículas recubiertas de ADN a la membrana transportadora.

15 [0282] Las cepas de *Prototheca* se cultivaron en medio de proteosa (2 g/l de extracto de levadura, NaNO₃ 2,94 mM, CaCl₂·2H₂O 0,17 mM, MgSO₄·7H₂O 0,3 mM, K₂HPO₄ 0,4 mM, KH₂PO₄ 1,28 mM, NaCl 0,43 mM) con glucosa al 2 % en un agitador giratorio hasta alcanzar una densidad celular de 2x10⁶ células/ml. Las células se recogieron, se lavaron una vez con agua destilada estéril y se resuspendieron en 50 µl de medio. Se extendieron 1x10⁷ células en el tercio central de una placa de medio de proteosa no selectiva. Las células se bombardearon con el sistema de suministro de partículas biolísticas PDS-1000/He (Bio-Rad). Se usaron discos de ruptura (1350 psi) y las placas se colocaron 6 cm por debajo del conjunto pantalla/macroportador. Se permitió que las células se recuperaran a 25 °C durante 12-24 h. Tras la recuperación, las células se rasparon de las placas con una espátula de goma, se mezclaron con 100 µl de medio y se extendieron sobre placas que contenían la selección de antibiótico adecuada. Después de 7-10 días de incubación a 25 °C, eran visibles en las placas colonias que representaban células transformadas. Las colonias se recogieron y se colocaron en placas de agar selectivas (fuente de antibiótico o de carbono) para una segunda ronda de selección.

25

EJEMPLO 3: Expresión de genes heterólogos de acil-ACP tioesterasa en células de microalgas

[0283] Los métodos y resultados de la expresión del gen heterólogo de la tioesterasa en células de microalgas, incluidas especies de *Prototheca*, se han descrito previamente en la Solicitud PCT N.º PCT/US2009/66412, que se incorpora a la presente por referencia. En este ejemplo se describen resultados utilizando otros genes/productos genéticos de tioesterasa de especies de plantas superiores.

[0284] Una acil-ACP tioesterasa de *Ricinus communis* se introdujo en un contexto genético de *Prototheca moriformis* UTEX 1435 y la secuencia de ADNc con codones optimizados (SEQ ID N.º 87) y las secuencias de aminoácidos (del N.º de acceso GenBank ABS30422.1) (SEQ ID N.º 88) se enumeran en el Listado de secuencias. La construcción de expresión contenía secuencias de direccionamiento de recombinación homóloga 5' (SEQ ID N.º100) y 3' (SEQ ID N.º101) (que flanquean la construcción) a la región genómica 6S para la integración en el genoma nuclear y una región codificante *suc2* de sacarasa de *S. cerevisiae* bajo el control del promotor de β -tubulina/5'UTR de *C. reinhardtii* y la 3' UTR de nitrato reductasa de *Chlorella vulgaris*. Este casete de expresión *suc2* de *S. cerevisiae* se enumera como la SEQ ID N.º 78 y sirvió como marcador de selección. La región de codificación de *R. communis* estaba bajo el control del promotor Amt03/5'UTR de *Prototheca moriformis* (SEQ ID N.º84) y la 3'UTR de nitrato reductasa de *C. vulgaris* (SEQ ID N.º85). El péptido de tránsito nativo de *Ricinus communis* también se reemplazó con el péptido de tránsito de estearoil desaturasa de *C. protothecoides* (SEQ ID N.º 86) y la secuencia de ADNc de la tioesterasa con el péptido de tránsito reemplazado se enumera como la SEQ ID N.º 87. La totalidad del casete de expresión de *Ricinus communis* se denominó pSZ1375 y se transformó en un contexto genético de *Prototheca moriformis*. Los clones positivos se cribaron en placas con sacarosa como única fuente de carbono. Se seleccionó un subconjunto de los clones positivos y se cultivó en condiciones de producción de lípidos y se determinaron los perfiles de lípidos (ácidos grasos) usando métodos de transesterificación directa como se ha descrito anteriormente. Los perfiles de ácidos grasos de los clones seleccionados se resumen en la Tabla 14 siguiente.

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

Cepa	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
tipo salvaje	0,01	0,03	0,98	24,65	3,68	62,48	6,26
clon A de pSZ1375	0,01	0,03	0,91	18,34	2,55	67,93	8,35
clon B de pSZ1375	0,01	0,03	0,97	18,51	2,47	67,83	8,25
clon C de pSZ1375	0,01	0,03	0,93	18,65	2,84	67,58	7,90
clon D de pSZ1375	0,01	0,03	0,92	18,90	2,30	67,48	8,37

[0285] Los resultados muestran que los transformantes con el transgén de tioesterasa de *Ricinus communis* tienen niveles alterados de ácidos grasos C16:0 y, en menor medida, de ácidos grasos C18:0, en comparación con la cepa de tipo salvaje. Además, hubo un aumento concomitante en el nivel de ácidos grasos C18:1 en comparación con el nivel de tipo salvaje.

EJEMPLO 4: Alteración de los niveles de ácidos grasos saturados en las microalgas *Prototheca moriformis***A. Disminución de la expresión de estearoil ACP desaturasa y desaturasa de ácidos grasos delta 12 mediante un enfoque de inactivación génica**

[0286] Como parte de un cribado genómico utilizando un enfoque bioinformático basado en ADNc, transcriptoma Illumina y secuenciación Roche 454 de ADN genómico de *Prototheca moriformis* (UTEX 1435), se identificaron dos grupos específicos de genes implicados en la desaturación de ácidos grasos: estearoil ACP desaturasas (SAD) y desaturasas de ácidos grasos delta 12 ($\Delta 12$ FAD). Las enzimas estearoil ACP desaturasa forman parte de la ruta de síntesis de lípidos y funcionan para introducir enlaces dobles en las cadenas de acilo graso, por ejemplo, la síntesis de ácidos grasos C18:1 a partir de ácidos grasos C18:0. Las desaturasas de ácidos grasos delta 12 también forman parte de la ruta de síntesis de lípidos y funcionan para introducir enlaces dobles en ácidos grasos ya insaturados, por ejemplo, la síntesis de ácidos grasos C18:2 a partir de ácidos grasos C18:1. El análisis de transferencia Southern utilizando sondas basadas en las dos clases de genes de desaturasa de ácidos grasos identificados durante los procesos bioinformáticos indicó que cada clase de genes de desaturasa probablemente estaba compuesta por varios miembros de la familia. Además, los genes que codifican estearoil ACP desaturasas se dividieron en dos familias distintas. Sobre la base de estos resultados, se diseñaron tres construcciones de interrupción génica para interrumpir múltiples miembros de la familia de genes al dirigirse a regiones codificantes más conservadas dentro de cada familia de enzimas desaturasas.

[0287] Se diseñaron tres construcciones de direccionamiento de recombinación homóloga utilizando: (1) porciones altamente conservadas de la secuencia codificante de los miembros de la familia de la desaturasa de ácidos grasos

delta 12 (d12FAD) y (2) dos construcciones dirigidas a cada una de las dos familias distintas de SAD, cada una con regiones conservadas de las secuencias codificantes de cada familia. Esta estrategia está diseñada para incrustar un gen marcador seleccionable (el casete *tal2* de sacarasa de *S. cerevisiae* que confiere la capacidad de hidrolizar la sacarosa) en estas regiones codificantes altamente conservadas (dirigidas a varios miembros de la familia) en lugar de una estrategia clásica de reemplazo de genes en la que la recombinación homóloga se dirigiría a las regiones flanqueantes del gen deseado.

[0288] Todas las construcciones se introdujeron en las células mediante transformación biolística usando los métodos descritos anteriormente y las construcciones se linealizaron antes de inyectarlas en las células. Los transformantes se seleccionaron en placas/medios que contenían sacarosa y los cambios en el perfil de ácidos grasos se analizaron usando el método descrito anteriormente. Las secuencias relevantes de cada una de las tres construcciones de direccionamiento se enumeran a continuación.

Descripción	SEQ ID N.º
Secuencia 5' de la construcción de direccionamiento a d12fad	SEQ ID N.º 30
Secuencia 3' de la construcción de direccionamiento a d12fad	SEQ ID N.º 31
Secuencia de ADNc de la construcción de direccionamiento a d12fad	SEQ ID N.º 32
Secuencia 5' de la construcción de direccionamiento a SAD2A	SEQ ID N.º 33
Secuencia 3' de la construcción de direccionamiento a SAD2A	SEQ ID N.º 34
Secuencia de ADNc de la construcción de direccionamiento a SAD2A	SEQ ID N.º 35
Secuencia 5' de la construcción de direccionamiento a SAD2B	SEQ ID N.º 36
Secuencia 3' de la construcción de direccionamiento a SAD2B	SEQ ID N.º 37
Secuencia de adnc de la construcción de direccionamiento a SAD2B	SEQ ID N.º 38

[0289] Se seleccionaron clones positivos representativos de transformaciones con cada una de las construcciones y se determinaron los perfiles de ácidos grasos para estos clones (expresados en % de área), que se resumen en la Tabla 15 a continuación.

Tabla 15. Perfiles de ácidos grasos para desaturasas inactivadas.

Ácido graso	d12FAD inactivada	SAD2A inactivada	SAD2B inactivada	UTEX 1435 de tipo salvaje
C8:0	0	0	0	0
C10:0	0,01	0,01	0,01	0,01
C12:0	0,03	0,03	0,03	0,03
C14:0	1,08	0,985	0,795	1,46
C16:0	24,42	25,335	23,66	29,87
C18:0	6,85	12,89	19,555	3,345
C18:1	58,35	47,865	43,115	54,09
C18:2	7,33	10,27	9,83	9,1
C18:3 alfa	0,83	0,86	1	0,89
C20:0	0,48	0,86	1,175	0,325

[0290] Cada una de las construcciones tuvo un impacto medible en la clase deseada de ácido graso, y en los tres casos los niveles de C18:0 aumentaron notablemente, particularmente con las dos SADm inactivadas. La comparación adicional de múltiples clones de SAD inactivadas indicó que las líneas de SAD2B inactivadas tenían reducciones significativamente mayores en ácidos grasos C18:1 que los niveles de ácidos grasos C18:1 observados con las líneas de SAD2A inactivadas.

[0291] Se generaron inactivaciones adicionales de desaturasa de ácidos grasos Δ 12(FAD) en una *Prototheca moriformis* (UTEX 1435) utilizando los métodos descritos anteriormente. Para identificar posibles homólogos de Δ 12FAD, se usaron los siguientes cebadores para amplificar una región genómica que codifica una supuesta FAD:

Cebador 1 5'-TCACTTCATGCCGGCGGTCC-3' SEQ ID N.º74
 Cebador 2 5'-GCGCTCCTGCTTGGCTCGAA-3' SEQ ID N.º75

[0292] Las secuencias resultantes de la amplificación genómica del ADN genómico de *Prototheca moriformis* mediante los cebadores anteriores fueron muy similares, pero esto indicó la existencia de múltiples genes o alelos de Δ 12FAD en *Prototheca moriformis*.

[0293] En función de este resultado, se diseñaron dos construcciones de interrupción génica para eliminar uno o más genes de Δ 12FAD. La estrategia fue incorporar un casete de sacarasa (*suc2* de *S. cerevisiae*), lo que confiere la

capacidad de hidrolizar la sacarosa como un marcador seleccionable, en regiones codificantes altamente conservadas en lugar de utilizar una estrategia clásica de reemplazo génico. La primera construcción, denominada pSZ1124, contenía secuencias genómicas de direccionamiento 5' y 3' que flanqueaban un promotor de β -tubulina de *C. reinhardtii* que impulsa la expresión del gen *suc2S* de *S. cerevisiae* y una 3'UTR de nitrato reductasa de *Chlorella vulgaris* (casete *suc2* de *S. cerevisiae*). La segunda construcción, denominada pSZ1125, contenía secuencias genómicas de direccionamiento 5' y 3' que flanqueaban un promotor de β -tubulina de *C. reinhardtii* que impulsa la expresión del gen *suc2S* de *S. cerevisiae* y una 3'UTR de nitrato reductasa de *Chlorella vulgaris*. Las secuencias relevantes de las construcciones se enumeran en el Listado de secuencias:

Secuencia genómica de direccionamiento 5' pSZ1124 (FAD2B)	SEQ ID N.º 76
Secuencia genómica de direccionamiento 3' pSZ1124 (FAD2B)	SEQ ID N.º 77
Casete <i>suc2</i> de <i>S. cerevisiae</i>	SEQ ID N.º 78
Secuencia genómica de direccionamiento 5' pSZ1125 (FAD2C)	SEQ ID N.º 79
Secuencia genómica de direccionamiento 3' pSZ1125 (FAD2C)	SEQ ID N.º 80

[0294] pSZ1124 y pSZ1125 se introdujeron cada una en un contexto de *Prototheca moriformis* y se seleccionaron clones positivos en función de la capacidad para hidrolizar sacarosa. En la Tabla 16 se resumen los perfiles de ácidos grasos (en % de área, generados utilizando los métodos descritos anteriormente) obtenidos en dos líneas transgénicas en las que se utilizaron los vectores de direccionamiento pSZ1124 y pSZ1125.

Tabla 16. Perfiles de ácidos grasos de $\Delta 12$ FAD inactivadas.

	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3a
Original	0,01	0,03	1,15	26,13	1,32	4,39	57,20	8,13	0,61
FAD2B	0,02	0,03	0,80	12,84	1,92	0,86	74,74	7,08	0,33
FAD2C	0,02	0,04	1,42	25,85	1,65	2,44	66,11	1,39	0,22

[0295] El clon transgénico que contenía la construcción FAD2B (pSZ1124) dio un resultado muy interesante e inesperado en el perfil de lípidos, ya que los niveles de C18:2, que se esperaba que disminuyeran, solo disminuyeron en aproximadamente un % de área. Sin embargo, los niveles de ácidos grasos C18:1 aumentaron significativamente, casi exclusivamente a expensas de los niveles de C16:0, que disminuyeron significativamente. El clon transgénico que contenía la construcción FAD2C (pSZ1125) también produjo un cambio en el perfil de ácidos grasos: los niveles de C18:2 se redujeron significativamente junto con un aumento correspondiente en los niveles de C18:1.

B. Enfoque de ARN horquillado para la regulación a la baja de desaturasa de ácidos grasos delta 12 (FADc) en células de *Prototheca*

[0296] Se introdujeron vectores que regulaban a la baja la expresión génica de FADc (gen de desaturasa de ácidos grasos delta 12) en un contexto genético de *Prototheca moriformis* UTEX 1435. El gen de sacarasa *suc2* de *Saccharomyces cerevisiae* se utilizó como marcador seleccionable, confiriendo la capacidad de crecer en sacarosa como única fuente de carbono a los clones positivos, y se usaron dos tipos de construcciones. El primer tipo de construcción utilizó una porción del primer exón de la región codificante de FADc unida en *cis* a su primer intrón seguida de una unidad repetida del primer exón en orientación inversa. Este tipo de construcción se diseñó para formar una horquilla cuando se expresa como ARNm. Se crearon dos construcciones de este primer tipo, una activada por el promotor de Amt03 de *Prototheca moriformis* (SEQ ID N.º 84), denominado pSZ1468, y una segunda activada por el promotor de β -tubulina de *Clamidomomas reinhardtii* (SEQ ID N.º 89), denominado pSZ1469. El segundo tipo de construcción utilizó el gran exón 2 de FADc en la orientación antisentido activado por el promotor Amt03 de *Prototheca moriformis* (SEQ ID N.º 84), denominado pSZ1470, o activado por el promotor de β -tubulina de *Clamidomomas reinhardtii* (SEQ ID N.º 89), denominado pSZ1471. Las cuatro construcciones tenían un casete de sacarasa *suc2* de *S. cerevisiae* (SEQ ID N.º 78) y secuencias de direccionamiento de recombinación homóloga 5' (SEQ ID N.º 100) y 3' (SEQ ID N.º 101) (que flanquean la construcción) a la región genómica 6S para la integración en el genoma nuclear. Las secuencias de las porciones FADc de cada construcción de ARN horquillado junto con las porciones relevantes de cada construcción se enumeran en el Listado de secuencias como:

Descripción	SEQ ID N.º
Casete de ARN horquillado FADc pSZ1468	SEQ ID N.º 90
Porciones relevantes de la construcción pSZ1468	SEQ ID N.º 91
Casete de ARN horquillado FADc pSZ1469	SEQ ID N.º 92
Porciones relevantes de la construcción pSZ1469	SEQ ID N.º 93
Exón 2 de un casete de ARN horquillado FADc pSZ1470	SEQ ID N.º 94
Porciones relevantes de la construcción pSZ1470	SEQ ID N.º 95
Exón 2 de un casete de ARN horquillado FADc pSZ1471	SEQ ID N.º 96

[0297] Cada una de las cuatro construcciones se transformó en un contexto de *Prototheca moriformis* y los clones positivos se examinaron utilizando placas con sacarosa como única fuente de carbono. Se seleccionaron clones positivos de cada transformación y se seleccionó un subconjunto para determinar el impacto de los casetes de horquilla y antisentido contenidos en pSZ1468, pSZ1469, pSZ1470 y pSZ1471 en los perfiles de ácidos grasos. Los clones seleccionados de cada transformación se cultivaron en condiciones de producción de lípidos y los perfiles de ácidos grasos se determinaron usando métodos de transesterificación directa como se ha descrito anteriormente. Los perfiles de ácidos grasos representativos de cada una de las transformaciones se resumen a continuación en la Tabla 17. Las células de tipo salvaje 1 y 2 eran células de *Prototheca moriformis* sin transformar que se analizaron con cada uno de los transformantes como control negativo.

Tabla 17. Perfiles de ácidos grasos de células de *Prototheca moriformis* que contienen construcciones de ARN horquillado para regular a la baja la expresión del gen de desaturasa de ácidos grasos delta 12 (FADc).

Cepa	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
tipo salvaje 1	0,01	0,03	1,20	27,08	4,01	57,58	7,81
Clon A de pSZ1468	0,01	0,04	1,33	25,95	3,68	65,60	1,25
Clon B de pSZ1468	0,01	0,03	1,18	23,43	2,84	65,32	4,91
Clon C de pSZ1468	0,01	0,04	1,34	23,18	4,27	63,65	5,17
Clon D de pSZ1468	0,01	0,03	1,24	23,00	3,85	61,92	7,62
Clon A de pSZ1470	0,01	0,03	1,23	24,79	4,33	58,43	8,92
Clon B de pSZ1470	0,01	0,03	1,26	24,91	4,14	57,59	9,64
Clon C de pSZ1470	0,01	0,03	1,21	23,35	4,75	58,52	9,70
tipo salvaje 2	0,01	0,03	0,98	24,65	3,68	62,48	6,26
Clon A de pSZ1469	0,01	0,03	1,05	21,74	2,71	71,33	1,22
Clon B de pSZ1469	0,01	0,03	1,01	22,60	2,98	70,19	1,27
Clon C de pSZ1469	0,01	0,03	1,03	19,82	2,38	72,95	1,82
Clon D de pSZ1469	0,01	0,03	1,03	20,54	2,66	70,96	2,71
Clon A de pSZ1471	0,01	0,03	1,03	18,42	2,63	66,94	8,55
Clon B de pSZ1471	0,01	0,03	0,94	18,61	2,58	67,13	8,66
Clon C de pSZ1471	0,01	0,03	1,00	18,31	2,46	67,41	8,71
Clon D de pSZ1471	0,01	0,03	0,93	18,82	2,54	66,84	8,77

[0298] Los resultados anteriores muestran que las construcciones de horquilla pSZ1468 y pSZ1469 mostraron los fenotipos esperados: una reducción en los niveles de ácidos grasos C18:2 y un aumento en los niveles de ácidos grasos C18:1 en comparación con el tipo salvaje 1 y el tipo salvaje 2, respectivamente. Las construcciones antisentido, pSZ1470 y pSZ1471 no dieron como resultado una disminución en los niveles de ácidos grasos C18:2, sino que mostraron un ligero aumento en comparación con el tipo salvaje 1 y el tipo salvaje 2, respectivamente, y una ligera disminución en los niveles de ácidos grasos C16:0.

C. Expresión de una esteroil-ACP desaturasa exógena

[0299] La esteroil-ACP desaturasa de *Olea europea* se introdujo (número de acceso de GenBank AAB67840.1) en un contexto genético de *Prototheca moriformis* UTEX1435. La construcción de expresión contenía secuencias de direccionamiento de recombinación homóloga en 5' (SEQ ID N.º100) y 3' (SEQ ID N.º101) (que flanquean la

construcción) a la región genómica 6S para la integración en el genoma nuclear y una región *suc2* codificante de sacarasa *S. cerevisiae* bajo el control del promotor de β -tubulina/5'UTR de *Reinhardtii* y nitrato reductasa 3' UTR de *Chlorella vulgaris*. Este casete de expresión *suc2* de *S. cerevisiae* se enumera como la SEQ ID N.º 78 y sirvió como marcador de selección. La región de codificación de esteroil-ACP desaturasa de *Olea europea* estaba bajo el control del promotor Amt03/5'UTR de *Prototheca moriformis* (SEQ ID N.º84) y 3'UTR de nitrato reductasa de *C. vulgaris*, y el péptido de tránsito nativo se reemplazó con el péptido de tránsito de esteroil-ACP desaturasa de *Chlorella protothecoides* (SEQ ID N.º 86). Las secuencias de ADNc con codones optimizados y las secuencias de aminoácidos (con el péptido de tránsito reemplazado) se enumeran en el Listado de secuencias como la SEQ ID N.º 98 y la SEQ ID N.º 99, respectivamente. La totalidad del casete de expresión SAD de *O. europaea* se denominó pSZ1377 y se transformó en un contexto genético de *Prototheca moriformis*. Los clones positivos se cribaron en placas con sacarosa como única fuente de carbono. Se seleccionó un subconjunto de los clones positivos y se cultivó en condiciones de producción de lípidos y se determinaron los perfiles de ácidos grasos utilizando métodos de transesterificación directa como se ha descrito anteriormente. Los perfiles de ácidos grasos de los clones seleccionados se resumen en la Tabla 18 a continuación.

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

Cepa	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2
tipo salvaje	0,88	22,82	3,78	64,43	6,54
clon A de pSZ1377	0,94	18,60	1,50	69,45	7,67
clon B de pSZ1377 0,93		18,98	1,35	69,12	7,67
clon C de pSZ1377	0,93	19,01	2,31	68,56	7,43

[0300] Los resultados anteriores demuestran que la introducción de una desaturasa heteróloga, en este caso una esteroil-ACP desaturasa de *Olea europea*, puede resultar en niveles más altos de ácidos grasos C18:1 y una disminución concomitante en los niveles de ácidos grasos C18:0 y C16:0.

EJEMPLO COMPARATIVO 5: Cultivo de levadura oleaginosas

[0301] Las cepas de levaduras oleaginosas usadas en este Ejemplo y posteriores se obtuvieron de la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), ubicada en Inhoffenstrabe 7B, 38124 Braunschweig, Alemania, o del Centraalbureau voor Schimmelscultures (CBS) ubicado en P.O. Box 85167, 3508 Utrecht, Países Bajos. Ciento ochenta y cinco cepas de levaduras oleaginosas se analizaron para detectar su tasa de crecimiento y producción de lípidos.

[0302] Todas las cepas se convirtieron en axénicas por siembra en estría en colonias individuales en placas de agar YPD (medio YPD como se describe a continuación con 2 % de agar añadido). Se recogieron colonias individuales de las placas YPD de cada cepa y se cultivaron hasta la fase logarítmica tardía en medio YPD (10 g de extracto de bacto-levadura, 20 g de bacto-peptona y 20 g de glucosa/1 L de volumen final en agua destilada) en un agitador rotatorio a 200 r.p.m. a 30 °C.

[0303] Para la evaluación de la productividad de lípidos, se añadieron 2 ml de medio YPD a un tubo de biorreactor tarado de 50 ml (MidSci, Inc.) y se inoculó a partir de una reserva congelada de cada cepa. Luego, los tubos se colocaron en una incubadora a 30 °C y se cultivaron durante 24 horas, agitando a 200 r.p.m. para generar un cultivo de semillas. Después de 24 horas, se añadieron 8 ml de medio Y1 (base nitrogenada de levadura sin aminoácidos, Difco) que contenía tampón de fitalato 0,1 M, pH 5,0 y se mezcló bien pipeteando con cuidado. El cultivo resultante se dividió en partes iguales en un segundo tubo de biorreactor tarado. Cada uno de los cultivos duplicados resultantes de 5 ml se colocaron luego en una incubadora a 30 °C con agitación a 200 r.p.m. durante 5 días. A continuación, se recogieron las células para determinar la productividad de lípidos y el perfil de lípidos. Se usaron 3 ml del cultivo para la determinación del peso celular en seco y el contenido de lípidos totales (productividad de lípidos) y se usó 1 ml para la determinación del perfil de ácidos grasos. En cualquier caso, los cultivos se colocaron en tubos y se centrifugaron a 3500 r.p.m. durante 10 minutos para sedimentar las células. Después de decantar el sobrenadante, se agregaron 2 ml de agua desionizada a cada tubo y se usaron para lavar el sedimento celular resultante. Los tubos se volvieron a centrifugar a 3500 r.p.m. durante 10 minutos para sedimentar las células lavadas, luego se decantó el sobrenadante y los sedimentos celulares se colocaron en un congelador a -70 °C durante 30 minutos. A continuación, los tubos se transfirieron a un liofilizador durante la noche para que se secaran. Al día siguiente, se registró el peso del tubo cónico más la biomasa seca resultante del cultivo de 3mL y el sedimento celular resultante

se sometió a extracción de lípidos totales utilizando un sistema de hidrólisis ácida de Ankom (según las instrucciones del fabricante) para determinar el contenido de lípidos totales.

- 5 [0304] De las 185 cepas seleccionadas, se eligieron 30 en función de la tasa de crecimiento y la productividad de lípidos. La productividad de lípidos (expresada como porcentaje de lípidos del peso celular seco) de estas 30 cepas se resume a continuación en la Tabla 19.

Tabla 19. Productividad de lípidos de cepas de levaduras oleaginosas.

Especie	Nº de colección	% de lípidos (DCW)
<i>Rhodotorula terpenoidalis</i>	CBS 8445	27
<i>Rhodotorula glutinus</i>	DSMZ 70398	53,18
<i>Lipomyces tetrasporosus</i>	CBS1810	51
<i>Lipomyces tetrasporosus</i>	CBS 7656	17,63
<i>Lipomyces tetrasporosus</i>	CBS 8724	18
<i>Cryptococcus curvatus</i>	CBS 5324	53
<i>Cryptococcus curvatus</i>	CBS2755	48
<i>Rhodospiridium sphaerocarpum</i>	CBS2371	43
<i>Rhodotorula glutinus</i>	CBS 4476	30,97
<i>Lipomyces tetrasporosus</i>	CBS1808	29
<i>Trichosporon domesticum</i>	CBS 8111	35,16
<i>Trichosporon sp.</i>	CBS 7617	40,09
<i>Lipomyces tetrasporosus</i>	CBS 5911	27,63
<i>Lipomyces tetrasporosus</i>	CBS 5607	12,81
<i>Cryptococcus curvatus</i>	CBS 570	38,64
<i>Cryptococcus curvatus</i>	CBS2176	40,57
<i>Cryptococcus curvatus</i>	CBS 5163	35,26
<i>Torulaspora delbruekii</i>	CBS 2924	40,00
<i>Rhodotorula toruloides</i>	CBS 8761	36,52
<i>Geotrichum histeridarum</i>	CBS 9892	33,77
<i>Yarrowia lipolytica</i>	CBS 6012	29,21
<i>Geotrichum vulgare</i>	CBS10073	28,04
<i>Trichosporon montevidense</i>	CBS 8261	25,60
<i>Lipomyces starkeyi</i>	CBS 7786	25,43
<i>Trichosporon behrend</i>	CBS 5581	23,93
<i>Trichosporon loubieri</i> var. <i>loubieri</i>	CBS 8265	22,39
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	CBS 14	21,03
<i>Trichosporon brassicae</i>	CBS 6382	20,34
<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	CBS 317	17,51
<i>Sporobolomyces alborubescens</i>	CBS 482	10,09

- 10 [0305] Los sedimentos celulares resultantes de 1 ml de cultivo se sometieron a transesterificación directa y análisis por GC para la determinación del perfil de ácidos grasos. Un resumen de los perfiles de ácidos grasos para 17 de las cepas de levadura anteriores se lista a continuación en la Tabla 20.

Tabla 20. Perfiles de ácidos grasos de cepas de levaduras oleaginosas.

Especie	Nº de colección	C14:0	C15:0	C16:0	C16:1	C17:0	C17:1	C18:0	C18:1	C18:2	>C20
<i>Rhodotorula</i> <i>terpenoidalis</i>	CBS 8445	0,8	0,02	27,44	0,67	0,03	0,03	5,6	59,44	3,37	2,13
<i>Rhodotorula</i> <i>glutinus</i>	DSMZ 70398	1,55	0,09	27,34	0,34	0,23	0,08	10,47	44,68	11,65	2,23
<i>Lipomyces</i> <i>tetrasporosus</i>	CBS1810	0,26	0,08	24,22	2,13	0,28	0,30	9,93	55,04	4,48	3,01
<i>Lipomyces</i> <i>tetrasporosus</i>	CBS 76556	0,293	0,212	28,14	4,24	0,37	0,66	6,61	48,48	8,33	1,178
<i>Lipomyces</i> <i>tetrasporosus</i>	CBS 8724	0,27	0,08	30,69	2,12	0,27	0,24	11,8	46,71	4,36	2,89
<i>Cryptococcus</i> <i>curvatus</i>	CBS 5324	0,27	0,22	23,31	0,49	0,12	0,09	11,55	50,78	10,80	1,61
<i>Cryptococcus</i> <i>curvatus</i>	CBS 27556	0,62	0,03	25,07	0,31	0,05	0,03	17,07	45,74	14,60	2,01
<i>Rhodospiridium</i> <i>sphaerocarpum</i>	CBS2371	0,68	0,03	17,86	0,13	0,54	0,17	10,4	51,01	14,60	1,82
<i>Rhodotorula</i> <i>glutinus</i>	CBS 4476	0,47	0,02	24,64	0,16	0,064	0,27	13,73	42,46	16,29	1,642
<i>Lipomyces</i> <i>tetrasporosus</i>	CBS1808	0,40	0,12	26,64	3,11	0,25	0,39	7,39	54,15	3,96	2,34
<i>Trichosporon</i> <i>domesticum</i>	CBS 8111	0,486	0,10	23,19	0,11	0,37	0,033	30,65	29,75	11,66	3,414
<i>Trichosporon</i> sp.	CBS 7617	0,527	0,063	24,26	0,187	0,171	0,026	19,61	41,95	9,97	2,61
<i>Lipomyces</i> <i>tetrasporosus</i>	CBS 5911	0,45	0,16	30,79	3,56	0,29	0,48	777	49,99	4,40	1,433
<i>Lipomyces</i> <i>tetrasporosus</i>	CBS 5607	0,35	0,17	37,56	3,0	0,328	0,40	9,31	42,36	4,28	1,376
<i>Cryptococcus</i> <i>curvatus</i>	CBS 570	0,21	0,09	12,78	0,13	0,147	0,09	19,6	53,17	8,42	4,01
<i>Cryptococcus</i> <i>curvatus</i>	CBS2176	0,31	0,09	19,0	0,87	0,08	0,10	7,24	60,51	9,26	2,154
<i>Cryptococcus</i> <i>curvatus</i>	CBS 5163	0,34	0,06	22,7	0,70	0,13	0,10	10,65	51,36	10,34	2,24
s.d. indica "sin determinar"											

[0306] Se realizó un análisis del perfil de ácidos grasos de cepas adicionales de levadura oleaginosas y se descubrió que varias cepas producían un alto porcentaje de ácido graso C16:1, incluyendo *Torulaspota delbruekii* CBS 2924. Esta cepa de levadura oleaginosas tenía una productividad de lípidos de aproximadamente un 40 % de lípidos como porcentaje de DCW y un perfil de ácidos grasos de: C12:0 (0,36 %); C14:0 (1,36 %); C15:0 (0,16 %); C16:0 (10,82 %); C 16:1 (42,9 %); C17:0 (0,11 %); C18:0 (2,1 %); C18:1 (35,81 %); C18:2 (4,62 %). Se descubrió que esta cepa tenía un porcentaje particularmente alto de C16:1 (ácido palmitoleico) como parte de su perfil de ácidos grasos. Se identificaron cuatro cepas adicionales que producían un alto porcentaje de 16:1: *Yarrowia lipolytica* CBS 6012 (10,10 %); *Yarrowia lipolytica* CBS 6331 (14,80 %), *Yarrowia lipolytica* CBS 10144 (12,90 %) y *Yarrowia lipolytica* CBS 5589 (14,20 %).

EJEMPLO COMPARATIVO 6: Genotipado de cepas de levaduras oleaginosas

[0307] Se realizó el genotipado de 48 cepas diferentes de levaduras oleaginosas. Se aisló el ADN genómico de cada una de las 48 cepas diferentes de biomasa de levadura oleaginosas como sigue. Se centrifugaron células (aproximadamente 200 mg) de cultivos líquidos durante 5 minutos a 14 000 x g. A continuación, las células se resuspendieron en agua destilada estéril, se centrifugaron durante 5 minutos a 14 000 x g y se descartó el sobrenadante. Se añadió una sola perla de vidrio de ~2 mm de diámetro a la biomasa y los tubos se pusieron a -80 °C durante al menos 15 minutos. Se retiraron las muestras y se añadieron 150 µl de tampón de trituración (Sarkosyl al 1 %, sacarosa 0,25 M, NaCl 50 mM, EDTA 20 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 8,0, 0,5 µg/ul de ARNasa A). Los gránulos se resuspendieron mediante agitación vorticial breve, seguido de la adición de 40 ul de NaCl 5M. Las muestras se agitaron brevemente en un agitador vorticial, seguido de la adición de 66 µl de CTAB al 5 % (bromuro de cetiltrimetilamonio) y una breve agitación vorticial final. A continuación, las muestras se incubaron a 65 °C durante 10 minutos, después de lo cual se centrifugaron a 14 000 x g durante 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se extrajo una vez con 300 µl de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico 12:12:1, seguido de centrifugación durante 5 minutos a 14 000 x g. La fase acuosa resultante se transfirió a un tubo nuevo que contenía 0,7 vol de isopropanol (190 µl), se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos o durante la noche a 4 °C. El ADN se recuperó mediante centrifugación a 14 000 x g durante 10 minutos. A continuación, el sedimento resultante se lavó dos veces con etanol al 70 %, seguido de un lavado final con etanol al 100 %. Los sedimentos se secaron al aire durante 20-30 minutos a temperatura ambiente seguido de resuspensión en 50 µl de TrisCl 10 mM, EDTA 1 mM (pH 8,0).

[0308] Cinco µl de ADN de algas total, preparado como se ha descrito anteriormente, se diluyeron en proporción 1:50 en Tris 10 mM, pH 8,0. Las reacciones de PCR, volumen final de 20 µl, se establecieron como sigue. Se agregaron diez µl de 2 x master mix iProof HF (BIO-RAD) a 0,4 µl de cebador directo SZ5434 (5' GTCCCTGCCCTTTGTACACAC -3' (SEQ ID N.º39) a una concentración de solución madre de 10 mM) y 0,4 µl de cebador inverso SZ5435 (5'-TTGATATGCTTAAGTTCAGCGGG -3' (SEQ ID N.º 40) a una concentración madre de 10 mM). Los cebadores se seleccionaron en función de la conservación de secuencias entre tres regiones principales de 18S y cinco regiones principales de genes de ARNr 26S de hongos. El cebador directo es idéntico a los nucleótidos 1632-1652 del n.º de acceso Genbank AY550243 y el cebador inverso es idéntico a los nucleótidos 464271-464293 del n.º de acceso Genbank NC_001144. A continuación, se agregaron 5 µl de ADN total diluido y 3,2 µl de dH₂O. Las reacciones de PCR se realizaron de la siguiente manera: 98°C, 45"; 98°C, 8"; 53°C, 12"; 72°C, 20" durante 35 ciclos seguido de 72 °C durante 1 min y mantenimiento a 25 °C. Para la purificación de los productos de PCR, se añadieron 20 µl de Tris 10 mM, pH 8,0 a cada reacción, seguido de extracción con 40 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 12:12:1, agitación en agitador vorticial y centrifugación a 14 000 xg durante 5 minutos. Las reacciones de PCR se aplicaron a columnas S-400 (GE Healthcare) y se centrifugaron durante 2 minutos a 3000 x g. Los productos de PCR purificados resultantes se clonaron y transformaron en *E. coli* utilizando el kit de vector ZeroBlunt PCR4Blunt-TOPO (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo directamente en colonias resistentes a ampicilina. El ADN plasmídico purificado se secuenció en ambas direcciones usando cebadores directos e inversos M13. Los productos de PCR purificados se clonaron posteriormente con TOPO en PCR8/GW/TOPO y se seleccionaron los clones positivos en placas LB/Spec. El ADN plasmídico purificado se secuenció en ambas direcciones usando cebadores directos e inversos M13.

[0309] Una lista de las 48 cepas de levadura oleaginosas que se genotiparon se encuentra en la Tabla 21 junto con las SEQ ID N.º correspondientes.

Tabla 21. Cepas de levaduras oleaginosas genotipadas.

Nombre de la cepa	Número de cepa	SEQ ID N.º
<i>Rhodotorula glutinis</i>	DSMZ-DSM 7098	SEQ ID N.º41
<i>Lipomyces tetrasporus</i>	CBS 5911	SEQ ID N.º41
<i>Rhodotorula glutinis</i> var. <i>glutinis</i>	CBS 3044	SEQ ID N.º42

<i>Lipomyces tetrasporus</i>	CBS 8664	SEQ ID N.º42
<i>Lipomyces tetrasporus</i>	CBS1808	SEQ ID N.º43
<i>Lipomyces tetrasporus</i>	CBS1810	SEQ ID N.º43
<i>Lipomyces starkeyi</i>	CBS1809	SEQ ID N.º44
<i>Trichosporon montevideense</i>	CBS 8261	SEQ ID N.º44
<i>Yarrowia lipolytica</i>	CBS 6331	SEQ ID N.º45
<i>Cryptococcus curvatus</i>	CBS 5324	SEQ ID N.º46
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i> var. <i>mucilaginosa</i>	CBS 316	SEQ ID N.º46
<i>Cryptococcus curvatus</i>	CBS 570	SEQ ID N.º46
<i>Cryptococcus curvatus</i>	CBS2176	SEQ ID N.º46
<i>Cryptococcus curvatus</i>	CBS 2744	SEQ ID N.º46
<i>Cryptococcus curvatus</i>	CBS 2754	SEQ ID N.º46
<i>Cryptococcus curvatus</i>	CBS 2829	SEQ ID N.º46
<i>Cryptococcus curvatus</i>	CBS 5163	SEQ ID N.º46
<i>Cryptococcus curvatus</i>	CBS 5358	SEQ ID N.º46
<i>Trichosporon</i> sp.	CBS 7617	SEQ ID N.º47
<i>Sporobolomyces alborubescens</i>	CBS 482	SEQ ID N.º48
<i>Rhodotorula glutinis</i> var. <i>glutinis</i>	CBS 324	SEQ ID N.º49
<i>Rhodotorula glutinis</i> var. <i>glutinis</i>	CBS 4476	SEQ ID N.º50
<i>Trichosporon behrend</i>	CBS 5581	SEQ ID N.º51
<i>Geotrichum histeridarum</i>	CBS 9892	SEQ ID N.º52
<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	CBS 8411	SEQ ID N.º53
<i>Cryptococcus curvatus</i>	CBS 8126	SEQ ID N.º53
<i>Trichosporon domesticum</i>	CBS 8111	SEQ ID N.º54
<i>Rhodotorula toruloides</i>	CBS 8761	SEQ ID N.º55
<i>Rhodotorula terpendoidalis</i>	CBS 8445	SEQ ID N.º56
<i>Yarrowia lipolytica</i>	CBS 10144	SEQ ID N.º57
<i>Rhodotorula glutinis</i> var. <i>glutinis</i>	CBS 5805	SEQ ID N.º58
<i>Yarrowia lipolytica</i>	CBS 10143	SEQ ID N.º59
<i>Lipomyces tetrasporus</i>	CBS 5607	SEQ ID N.º60
<i>Yarrowia lipolytica</i>	CBS 5589	SEQ ID N.º61
<i>Lipomyces tetrasporus</i>	CBS 8724	SEQ ID N.º62
<i>Rhodospiridium sphaerocarpum</i>	CBS2371	SEQ ID N.º63
<i>Trichosporon brassicae</i>	CBS 6382	SEQ ID N.º64
<i>Cryptococcus curvatus</i>	CBS2755	SEQ ID N.º65
<i>Lipomyces tetrasporus</i>	CBS 7656	SEQ ID N.º65
<i>Lipomyces starkeyi</i>	CBS 7786	SEQ ID N.º66
<i>Yarrowia lipolytica</i>	CBS 6012	SEQ ID N.º67
<i>Trichosporon loubieri</i> var. <i>loubieri</i>	CBS 8265	SEQ ID N.º68
<i>Geotrichum vulgare</i>	CBS10073	SEQ ID N.º69
<i>Rhodospiridium toruloides</i>	CBS 14	SEQ ID N.º70
<i>Rhodotorula glutinis</i> var. <i>glutinis</i>	CBS 6020	SEQ ID N.º71
<i>Lipomyces orientalis</i>	CBS10300	SEQ ID N.º71
<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	CBS 317	SEQ ID N.º72
<i>Torulasporea delbrueckii</i>	CBS 2924	SEQ ID N.º73

EJEMPLO COMPARATIVO 7: Cultivo de *Rhodococcus opacus* para lograr un alto contenido de aceite

- 5 [0310] Se generó un cultivo de siembra de *Rhodococcus opacus* PD630 (DSM 44193, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) utilizando 2 ml de una solución madre crioconservada inoculada en 50 ml de medio MSM con sacarosa al 4 % (véase Schlegel, y col., (1961) Arch Mikrobiol 38, 209-22) en un matraz deflector de 250 ml. El cultivo de siembra se hizo crecer a 30 °C con agitación de 200 r.p.m. hasta que alcanzó una densidad óptica de 1,16 a 600 nm. Se utilizaron 10 ml del cultivo del matraz de siembra para inocular cultivos para la producción de lípidos en dos condiciones de nitrógeno diferentes: NH₄Cl 10 mM y NH₄Cl 18,7 mM (cada uno por duplicado). Los cultivos se cultivaron a 30 °C con agitación a 200 r.p.m. durante 6 días. Las células cultivadas en la condición de NH₄Cl 10 mM alcanzaron un máximo de 57,2 % (promedio) de lípidos por DCW después de 6 días de cultivo. Las células cultivadas en la condición de NH₄Cl 18,7 mM alcanzaron un máximo de 51,8 % (promedio) de lípidos por DCW después de 5 días en cultivo.
- 10
- 15 [0311] Una muestra de biomasa de *Rhodococcus opacus* se sometió a transesterificación directa y se analizó mediante GC/FID para determinar un perfil de ácidos grasos. Los resultados fueron: C14:0 (2,33); C15:0 (9,08);

C16:0 (24.56); C16:1 (11.07); C17:0 (10.50); 2 especies de C17 equivalentes de enlace doble (2DBE) (19,90); C18:0 (2.49); C18:1 (17.41); C18:2 (0,05); C19:0 (0,75) y especies 2DBE de C19 (1,87).

EJEMPLO COMPARATIVO 8: Extracción de aceite de microorganismos

5

A. Extracción de aceite de microalgas usando una prensa extrusora y una ayuda para el prensado

[0312] La biomasa de microalgas que contenía un 38 % de aceite por DCW se secó utilizando un secador de tambor, lo que resultó en un contenido de humedad resultante de 5-5,5 %. La biomasa se introdujo en una prensa francesa L250. Se introdujeron 30,4 kg (67 libras) de biomasa a través de la prensa y no se recuperó aceite. La misma biomasa microbiana seca combinada con un porcentaje variable de pasto varilla como ayuda para el prensado se hizo pasar a través de la prensa. La combinación de biomasa microbiana seca y 20 % p/p de pasto varilla produjo el mejor porcentaje general de recuperación de aceite. A continuación, las tortas prensadas se sometieron a extracción con hexano y el rendimiento final para la condición de 20 % de pasto varilla fue del 61,6 % del aceite total disponible (calculado en peso). La biomasa con más del 50 % del peso de las células secas de aceite no requirió el uso de una ayuda para el prensado como el pasto varilla para extraer el aceite. Otros métodos de extracción de un aceite de microalgas mediante una prensa extrusora se describen en la Solicitud PCT N.º PCT/US2010/31108, que se incorpora al presente documento por referencia.

B. Extracción de aceite de levaduras oleaginosas utilizando una prensa extrusora

[0313] Se obtuvo una cepa de levadura *Rhodotorula glutinis* (DSMZ-DSM 70398) de la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Colección alemana de cultivos de microorganismos y células, Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig, Alemania). Las células criopreservadas se descongelaron y se agregaron a 50 ml de medio YPD (descrito anteriormente) con 1x solución vitamínica DAS (1000x: 9g/L tricina; 0,67g/L tiamina-HCl; 0,01 g/L d-biotina; 0,008 cianocobalamina; 0,02 pantotenato cálcico; y 0,04 g/L ácido p-aminobenzoico) y se cultivaron a 30 °C con agitación a 200 r.p.m. durante 18-24 horas hasta que la lectura de DO fue superior a 5 DO (A600). Luego, el cultivo se transfirió a fermentadores de 7 L y se cambió a medio YP1 (8,5 g/L Difco Yeast Nitrogen Base sin aminoácidos y sulfato de amonio, 3 g/l de sulfato de amonio, 4 g/l de extracto de levadura) con una solución de vitamina 1x DAS. Se tomaron muestras de los cultivos dos veces al día y se analizó la DO (A600), el peso celular en seco (DCW) y la concentración de lípidos. Cuando los cultivos alcanzaron más de 50 g/L DCW, los cultivos se cosecharon. En función del peso celular en seco, la biomasa de levadura contenía aproximadamente un 50 % de aceite. Dos muestras de biomasa de levadura se sometieron a transesterificación directa y se analizaron mediante GC/FID para determinar un perfil de ácidos grasos. Los resultados se expresan en porcentaje de área y se muestran en la Tabla 22, a continuación.

Tabla 22. Perfil de ácidos grasos de muestras de biomasa de levadura transesterificada.

	C10:0	C12:0	C14:0	C15:0	C16:0	C16:1	C17:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3 α	\geq C:20
Muestra 1	0,03	0,21	3,36	0,25	33,26	0,76	0,20	6,88	42,68	9,28	1,33	1,1
Muestra 2	0,02	0,10	2,18	0,12	29,94	0,49	0,16	8,17	48,12	7,88	0,84	1,45

[0314] El caldo de levadura cosechado se secó usando tres métodos diferentes para la comparación: (1) secado en bandeja en un horno de aire forzado a 75 °C durante la noche; (2) secado en un secador de tambor sin concentración; y (3) el caldo de levadura se concentró hasta un 22 % de sólidos y luego la suspensión se secó en un secador de tambor. El material de cada una de las tres diferentes condiciones de secado se acondicionó con calor y se hizo pasar por una prensa de tornillo para la extracción de aceite. La temperatura de la prensa fue de 150 °F y la biomasa de levadura seca acondicionada se mantuvo a aproximadamente 190 °F hasta que estuvo lista para introducirla en la prensa.

[0315] El contenido de humedad de la levadura secada en bandeja fue del 1,45 % y después la levadura seca se acondicionó en un horno a 90 °C durante 10 minutos. El contenido de humedad después del acondicionamiento fue del 0,9 %. El material secado en bandeja acondicionado se introdujo luego en una prensa de tornillo Taby de sobremesa (prensa de aceite Taby Pressen Tipo 70 con un motor de 2,2 Hp y un diámetro de tornillo de 70 mm) para la extracción de aceite. Este material no produjo ninguna cantidad significativa de aceite y se observó un fuerte ensanchamiento de los extremos con el prensado.

[0316] El contenido de humedad del caldo de levadura secado en tambor sin concentración fue del 5,4 % y la levadura secada en tambor se acondicionó luego en un horno a 90 °C durante 20 minutos. El contenido de humedad después del acondicionamiento fue del 1,4 %. La levadura secada en tambor acondicionada se introdujo luego en una prensa de tornillo Taby de sobremesa para la extracción de aceite. El material expulsó bien el aceite, con un ensanchamiento mínimo de los extremos.

5 [0317] El contenido de humedad del caldo de levadura concentrada secada en tambor fue del 2,1 % y la levadura concentrada secada en tambor se acondicionó luego en un horno a 90 °C durante 20 minutos. El contenido de humedad después del acondicionamiento fue del 1,0 %. La levadura concentrada secada en tambor acondicionada se introdujo luego en una prensa de tornillo Taby de sobremesa para la extracción de aceite. El material expulsó bien el aceite, con un ensanchamiento mínimo de los extremos.

C. Secado y extracción de aceite de bacterias oleaginosas

10 [0318] La cepa de bacterias oleaginosas *Rhodococcus opacus* PD630(DSMZ-DSM 44193) se cultivó según los métodos proporcionados en el presente documento para producir biomasa de bacterias oleaginosas con aproximadamente un 32 % de lípidos por DCW.

15 [0319] El caldo de *Rhodococcus opacus* cosechado se concentró mediante centrifugación y luego se lavó con agua desionizada y se resuspendió en 1,8 l de agua desionizada. Se añadieron 50 gramos de celulosa purificada (PB20-Pre-co-Floc, EP Minerals, Nevada, EE. UU.) a la biomasa resuspendida y los sólidos totales se ajustaron con agua desionizada al 20 %. Luego, la biomasa de *Rhodococcus* se secó en un secador de tambor y el contenido de humedad de *Rhodococcus* después del secado en tambor fue de aproximadamente 3 %.

20 [0320] El material secado en tambor se acondicionó luego con calor en un horno a 130 °C durante 30 minutos con un contenido de humedad resultante de aproximadamente 1,2 %. A continuación, la biomasa acondicionada con calor se pasó por una prensa Taby de sobremesa (prensa de tornillo) para la extracción de aceite. La temperatura de la prensa fue de 209 °F y la biomasa de levadura seca acondicionada se mantuvo a aproximadamente 240 °F hasta que estuvo lista para ser introducida en la prensa. La recuperación del aceite estuvo acompañada de un fuerte ensanchamiento de los extremos del material.

EJEMPLO 9: Procesamiento de aceite extraído; descenso del punto de fluidez

Resumen

30 [0321] El aceite microbiano preparado según los ejemplos anteriores se puede procesar según los métodos descritos en este documento para mejorar sus propiedades para el uso en alimentos y lubricantes. Además de los microbios descritos en los ejemplos anteriores, las microalgas *Chlorella protothecoides* son excelentes productoras de aceite microbiano. Para métodos de cultivo de especies y cepas de *Chlorella* para obtener un alto contenido de aceite y extraer aceite de ellas, véanse las publicaciones PCT N.º 2008/151149, 2010/120939, y 2010/138,620, que se incorporan a la presente por referencia.

40 [0322] El punto de fluidez se redujo en el aceite obtenido de *Chlorella protothecoides* mediante la reducción de la proporción relativa de la fracción saturada, que consiste principalmente en triglicéridos palmíticos y esteáricos conocidos en la técnica como la fracción de estearina. Esto se logró fraccionando el aceite para reducir la concentración de triglicéridos saturados del aceite. Esto se hizo mediante cristalización o fraccionamiento en seco, de manera similar al proceso de preparación para el invierno conocido en la industria del aceite vegetal. El aceite de algas se refinó, blanqueó y desodorizó primero mediante los métodos descritos anteriormente (también podrían emplearse métodos similares a los utilizados en la industria del aceite vegetal) para producir "aceite RBD".

45 [0323] La temperatura del aceite RBD se redujo de manera controlada hasta que se formaron núcleos cristalinos. A continuación, el aceite se mantuvo a esa temperatura de cristalización durante varias horas para facilitar el crecimiento de los cristales. A continuación, los cristales se eliminaron por filtración para dar como resultado dos fracciones: una fase sólida que contenía parte o la mayor parte de la fracción de estearina y una fase líquida que contenía principalmente la fracción de oleína. La fase líquida se sometió a fraccionamiento de nuevo a una temperatura de cristalización más baja para efectuar una eliminación adicional de la estearina. La fracción líquida purificada resultante, equivalente a una súper oleína como se conoce comúnmente en la industria del aceite vegetal, tiene mejores propiedades térmicas que el aceite de algas nativo.

55 **Materiales y métodos**

Materiales

60 [0324] El aceite de algas (refinado, blanqueado y desodorizado) lo produjo Solazyme, Inc (South San Francisco, CA). En la Tabla 23 se resumen las propiedades del aceite utilizado en el estudio.

Tabla 23. Propiedades del aceite de algas utilizado en el estudio

Análisis	Valor
Humedad [%]	0,01
Ácido graso libre [% como oleico]	0,03
Índice de yodo	83,5
Perfil de ácidos grasos	
8:0	0,00
10:0	0,00
12:0	0,03
14:0	1,12
16:0	14,02
18:0	3,24
18:1	67,73
18:2	11,18
18:3	0,62
20:0	0,32
20:1	0,20

5 [0325] El depresor del punto de fluidez (PPD) a base de copolímero de metacrilato de polialquilo VISCOPLEX® 10-310 que contiene ~50 % (p/p) de vehículo de aceite de colza y VISCOPLEX® 1-133 que contiene un vehículo de aceite mineral refinado los suministró RohmMax Evonik (Horsham, PA).

Métodos

A. Fraccionamiento en seco: cristalización

10 [0326] Se colocaron alrededor de 2,5 kg de aceite de algas en un recipiente de doble pared de 3 L conectado a un baño de agua circulante de temperatura controlada, que sirvió para calentar y enfriar el producto (Crystallization & Degumming, Charleroi, Bélgica). El reactor estaba equipado con un agitador de velocidad variable. El enfriamiento se controló monitoreando las temperaturas del aceite y del agua que circula entre las paredes dobles del reactor. Se tomó una muestra de una gota de suspensión de cristales del reactor con una varilla y se depositó en un cubreobjetos para monitorear la formación de cristales al final del enfriamiento. La muestra se analizó inmediatamente bajo un microscopio antes de que los cristales tuvieran la oportunidad de derretirse.

20 [0327] El patrón general de enfriamiento se muestra en la Fig. 1. La velocidad del agitador fue de 30 r.p.m. durante la primera fase y de 15 r.p.m. hasta el final del programa de enfriamiento.

B. Fraccionamiento en seco: Filtración

25 [0328] Al final de la cristalización, la suspensión de cristales se filtró utilizando un filtro prensa de membrana de 1 L (Choquet SA, Chauny, Francia). La filtración se realizó en una cámara que se mantuvo a la temperatura final de enfriamiento. El tiempo de filtración fue de 20 min y la presión de alimentación del filtro fue de 4 barg.

30 [0329] Al final del paso de separación, se pesaron las fracciones de estearina y oleína, se calcularon los rendimientos de las fracciones y se apartó una muestra de cada fracción para su posterior análisis. La súper oleína de algas #1 se produjo procesando la oleína del primer fraccionamiento y repitiendo el proceso de cristalización y filtración descrito anteriormente siguiendo el programa de enfriamiento que se muestra en la Fig. 2. Las súper oleínas de algas #2 y #3 se produjeron fraccionando primero el aceite desodorizado y repitiendo el proceso de cristalización y filtración usando un programa de enfriamiento similar al que se muestra en la Fig. 2.

C. Punto de fluidez (PP)

40 [0330] Se pesaron depresores del punto de fluidez (0,5 y 1,0 gramos) en matraces. Se añadieron a cada matraz fracciones de aceite de algas, oleína y superoleína (100 gramos). Las mezclas se mezclaron completamente. Cada muestra se analizó según el método estándar D 97 ASTM (American Society for Testing and Materials). La muestra se vertió en un tubo de ensayo y se calentó sin agitación en un baño de agua donde la temperatura se fijó a 48,0 °C. La muestra se calentó hasta alcanzar los 46,0 °C. Después de calentarla, la muestra se enfrió a 25,0 °C (en un baño de agua). Luego, la muestra se colocó en un cilindro de metal en un baño de metanol. La temperatura del baño de metanol se fijó entre -1,0 °C y -2,0 °C hasta que la temperatura de la muestra alcanzó los 10,0 °C. Luego, la temperatura del baño de metanol se redujo a -17,0 °C hasta que la temperatura de la muestra alcanzó -7,0 °C. Cuando la temperatura de la muestra estuvo aproximadamente 11,0 °C por encima del punto de fluidez esperado, se

sacó la muestra del baño de metanol en cada reducción de 3,0 °C, para comprobar la capacidad de fluidez. El punto de fluidez de la muestra se determinó como la temperatura cuando la muestra en el tubo de ensayo dejó de verterse cuando se sacó del baño de metanol. A la temperatura registrada, se añadieron 3,0 °C, para dar el valor real del punto de fluidez de la muestra.

5 [0331] Las propiedades del aceite producido en cada paso podrían mejorarse aún más según los métodos descritos en este documento mediante la adición de un depresor químico del punto de fluidez que redujera aún más el punto de fluidez. Los depresores del punto de fluidez utilizados para este ejemplo fueron VISCOPLEX® 10-310 y 1-133, ambos producidos por Evonik, pero se pueden obtener resultados similares usando cualquier depresor del punto de fluidez estándar. Los resultados se muestran en la Tabla 24, a continuación, y en la Fig. 3.

Tabla 24. Efecto del fraccionamiento y depresores punto de fluidez⁽¹⁾ en aceite de algas (°C)

MUESTRA	Sin aditivo	VISCOPLEX (% p:® 10-310 ⁽²⁾ :v)		VISCO (3) PLEX® 1-133 (% peso: peso)	
	0	0.5	1	0.5	1
Aceite refinado, blanqueado, desodorizado	-8	-17	-20	-14	-16
Oleína #1 (líquido del 1º fraccionamiento)	-11	-19	-20	-16	-17
Super oleína #1 (líquido del fraccionamiento de oleína = 2º paso)	-20	-26	NT	NT	NT
Super oleína #2 (líquido del fraccionamiento de oleína = 2º paso)	-14	-20	-23	NT	NT
Super oleína #3 (líquido del fraccionamiento de oleína = 2º paso)	-20	-23	-29	NT	NT

(1) Punto de fluidez ASTM D97
 (2) 50:50 mezcla de poli(alquil) acrilato y aceite de colza. Clasificado como biodegradable
 (3) Mezcla de poli(alquil) acrilato y aceite mineral refinado.
 NT = No testado.

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

15 [0332] *Protheca moriformis* (UTEX 1435) se transformó con una de las siguientes construcciones plasmídicas de la Tabla 25 usando los métodos del Ejemplo 2.

Tabla 25. Construcciones plasmídicas utilizadas para transformar *Protheca moriformis* (UTEX 1435).

Construcción plasmídica	Elementos de secuencia
1	6SA-CrbTub_yInv_nr::CrbTub_hpFADc_nr-6SB
2	6SA-bTub-yInv-nr-6SB
3	FADc5'_btub-yInv-nr::amt03-S106SAD-CtOTE-nr-FADc3'
4	SAD2B5'-CrbTub_yInv_efl::amt03_CWTE2_nr-SAD2B3'

20 [0333] Cada una de las construcciones contenía una región para la integración en el genoma nuclear y una región *suc2* codificante de sacarasa de *S. cerevisiae* bajo el control del promotor de β -tubulina/5'UTR de *C. Reinhardtii* y nitrato reductasa 3' UTR de *Chlorella vulgaris*. Este casete de expresión *suc2* de *S. cerevisiae* se enumera como la SEQ ID N.º 78 y sirvió como marcador de selección. Las secuencias relevantes para las regiones de direccionamiento utilizadas para la integración del genoma nuclear se muestran a continuación.

Descripción	SEQ ID N.º
secuencia 5' para la secuencia genómica de direccionamiento 6S	SEQ ID N.º 100
secuencia 3' para la secuencia genómica de direccionamiento 6S	SEQ ID N.º 101
secuencia 5' para la integración genómica en el locus FADc	SEQ ID N.º 102
secuencia 3' para la integración genómica en el locus FADc	SEQ ID N.º 103
secuencia 5' para la integración genómica en el locus SAD2B	SEQ ID N.º 36

secuencia 3' para la integración genómica en el locus SAD2B

SEQ ID N.º 37

[0334] Además del marcador seleccionable de sacarosa, tres de las cuatro construcciones también contenían secuencias adicionales diferentes para la expresión de proteínas o ARN. En la Tabla 26 se enumeran enzimas importantes o casetes de ARN horquillado que están codificados por la secuencia de ADN en la construcción indicada. Todas las regiones de codificación de proteínas tuvieron codones optimizados para reflejar el sesgo de codones inherente a los genes nucleares de *Prototheca moriformis* UTEX 1435 (véase la Tabla 2). Tanto las secuencias de aminoácidos como las secuencias de ADNc para la construcción utilizada se enumeran en el listado de secuencias.

10 Tabla 26. construcciones plasmídicas para la expresión de tioesterasas o ARN horquillado utilizados para transformar *Prototheca moriformis* (UTEX 1435).

Construcción plasmídica	Proteína o ARN de horquilla	Nº de ID de secuencia:
1	horquilla FADc	SEQ ID N.º 92
3	ACP tioesterasa de <i>Carthamus tinctorius</i> (n.º de acceso de GenBank: AAA33019.1)	SEQ ID N.º 104
4	Tioesterasa FatB2 de <i>Cuphea wrightii</i> (número de acceso de GenBank U56104)	SEQ ID N.º 105

15 [0335] Las regiones codificantes tanto de ACP tioesterasa de *Carthamus tinctorius* (CtOTE en la construcción 3) como de Tioesterasa FatB2 de *Cuphea wrightii* (CwTE2 en la construcción 4) estaban bajo el control del promotor Amt03/5'UTR de *Prototheca moriformis* (SEQ ID N.º84) y 3'UTR de nitrato reductasa de *C. vulgaris* (SEQ ID N.º85). El péptido de tránsito nativo de la ACP tioesterasa de *C. tinctorius* fue reemplazado por el péptido de tránsito de estearoil-ACP desaturasa de *Chlorella protothecoides* (SEQ ID N.º 86). Las secuencias de ADNc con codones optimizados y las secuencias de aminoácidos (con el péptido de tránsito reemplazado) de la ACP tioesterasa de *C. tinctorius* se incluyen en el Listado de secuencias como la SEQ ID N.º 106 y la SEQ ID N.º 104, respectivamente. Las secuencias de ADNc con codones optimizados y las secuencias de aminoácidos de Tioesterasa FatB2 de *Cuphea wrightii* se incluyen en el Listado de secuencias como la SEQ ID N.º 107 y la SEQ ID N.º 105, respectivamente. La construcción 1 que contiene el ARN de horquilla FADc se describe en el Ejemplo 4.

25 [0336] Cada construcción se transformó en un contexto genético de *Prototheca moriformis*. Los clones positivos se criaron en placas con sacarosa como única fuente de carbono. Se seleccionó un subconjunto de los clones positivos y se cultivó en condiciones de producción de lípidos. UTEX 1435 de tipo salvaje se cultivó usando glucosa, mientras que todas las demás líneas transgénicas se cultivaron en sacarosa. Para cada construcción, se cultivaron transformantes y se aisló el aceite. Se analizaron los perfiles de ácidos grasos de los aceites aislados y se determinaron los puntos de fluidez como se describe en este documento. Los puntos de fluidez se determinaron utilizando el método de prueba estándar ASTM D97 para la evaluación del punto de fluidez. Los perfiles de ácidos grasos y los puntos de fluidez de los aceites para las cepas transgénicas se muestran en la Tabla 27 a continuación. La Tabla 27 revela los datos para la manipulación exitosa de los puntos de fluidez de los aceites producidos por microalgas modificadas genéticamente. El punto de fluidez del aceite transformado con la construcción 3 se redujo de -10,5 °C a -19,5 °C.

35 Tabla 27. Perfiles de ácidos grasos y temperaturas de punto de fluidez de células de *Prototheca moriformis* que contienen diferentes construcciones.

	Tipo salvaje	Construcción 1	Construcción 2	Construcción 3	Construcción 4
C6:0	0	0	0	0	0
C8:0	0	0	0	0	0
C10:0	0	0	0,01	0,03	0,01
C12:0	0,03	0,02	0,03	0,11	0,03
C14:0	1,12	0,68	0,75	0,90	1,08
C16:0	14,02	15,55	13,26	7,75	26,09
C18:0	3,24	3,79	5,26	1,78	12,37
C18:1	67,76	76,84	71,75	86,40	53,42
C18:2	11,49	0,91	6,44	0,12	4,38
C18:3 α	0,62	0,09	0,07	0,02	0,2
Punto de fluidez	-10,5°C	-7,6 °C	-7,6 °C	-19,5 °C	10,4°C

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

[0337] Como se ha descrito anteriormente, la integración de genes heterólogos para inactivar o atenuar enzimas endógenas específicas de la ruta de los lípidos en especies de *Protheca* pueden alterar los perfiles de ácidos grasos. Como las acil-ACP tioesterasas endógenas catalizan la escisión de un ácido graso de una proteína transportadora de acilo durante la síntesis de lípidos, son enzimas importantes de la ruta de los lípidos para establecer el perfil de lípidos del organismo hospedador. Se crearon construcciones plasmídicas para evaluar si el perfil de lípidos de una célula hospedadora puede verse afectado como resultado de una inactivación o inactivación de un gen endógeno de acil-ACP tioesterasa, FATA1.

A. Alteración de los perfiles de ácidos grasos por inactivación de un gen de tioesterasa endógeno de *Protheca moriformis*

[0338] Un derivado clásicamente mutagenizado de *Protheca moriformis* UTEX 1435, S1920, se transformó con una de las siguientes construcciones plasmídicas de la Tabla 28 utilizando los métodos del Ejemplo 2. Cada construcción contenía una región para la integración en el genoma nuclear para interrumpir el gen FATA1 endógeno y un región codificante de sacarasa *suc2* de *S. cerevisiae* bajo el control del promotor de β -tubulina/5'UTR de *C. Reinhardtii* y 3' UTR de nitrato reductasa de *Chlorella vulgaris*. Este casete de expresión *suc2* de *S. cerevisiae* se enumera como la SEQ ID N.º 78 y sirvió como marcador de selección. Todas las regiones de codificación de proteínas tuvieron cordones optimizados para reflejar el sesgo de codones inherente a los genes nucleares de *Protheca moriformis* UTEX 1435 (véase la Tabla 2). Las secuencias relevantes para las regiones de direccionamiento del gen FATA1 utilizadas para la integración del genoma nuclear se muestran a continuación.

Descripción	SEQ ID N.º
secuencia 5' para la integración en el locus FATA1	SEQ ID N.º108
secuencia 3' para la integración en el locus FATA1	SEQ ID N.º109

Tabla 28. construcciones plasmídicas utilizadas para transformar *Protheca moriformis* (UTEX 1435) S1920.

Construcción plasmídica	Elementos de secuencia
pSZ1883	FATA1-CrbTub_yInv_nr-FATA1
pSZ1925	FATA1-CrbTub_yInv_nr::amt03_CwTE2_nr-FATA1

[0339] Los sitios de restricción relevantes en la construcción FATA1-CrbTub_yInv_nr-FATA1 se indican en minúsculas en la secuencia que aparece a continuación, en negrita y subrayados, y son 5'-3' *BspQ 1*, *Kpn I*, *Asc I*, *Mfe I*, *Sac I*, *BspQ I*, respectivamente. Los sitios *BspQI* delimitan los extremos 5' y 3' del ADN transformante. Las secuencias en minúsculas y en negrita representan el ADN genómico de S1920 que permite la integración dirigida en el locus FATA1 a través de la recombinación homóloga. Procediendo en la dirección 5' a 3', el promotor de β -tubulina de *Reinhardtii* que impulsa la expresión del gen de sacarasa de levadura (que confiere la capacidad de S1920 para metabolizar sacarosa) se indica mediante recuadros de texto. El iniciador ATG y el terminador TGA para la invertasa se indican en cursiva mayúscula y negrita, mientras que la región codificante se indica en cursiva minúscula. La 3' UTR de nitrato reductasa de *Chlorella vulgaris* se indica con texto subrayado en minúsculas seguido de la región genómica S190 FATA1 indicada con texto en negrita y minúsculas.

gctcttcggagtcactgtgccactgagttcgactggtagctgaatggagtcgctgctccactaaacgaattgtcagcaccgcca
gceggccgaggaccgagtcatagcgggtagtagcgccatggcaccgaccagecctgcttgccagtactggcgtctcttc
cgcttctctgtggctctctgcgcgtccagecgtgcgcttttcgggtggatcatcggtcctggcgcaccgcagcggccgctg
cccatgcagcgcgctgcttccgaacagtggcggtcagggccgcaccccggttagccgtccgtccggaacccgccaagagt
ttgggagcagcttgagccctgcaagatggcggaggacaagcgcacatcttctggaggagcaccgggtgcgtggaggctccgggg
ctgaccggccgctgcattcaacgtaataatcgcatgatgatcagaggacacgaagtcttggggcgggtggccagaaact
gtccattgcaaggcatagggatgcgttccttcacctctcatttctcatttctgaatccctccctgctcactctttctctctcttc
cgttcaecgagcattcggggctaccctttcttgcgctatgacacttccagcaaaaggtagggcgggctgagagacggcttccggc
gctgcatgcaacaccgatgatgcttcgacccccgaagctccttcggggctgcatgggcgctccgatgccgctccagggcgagcgc
tgtttaaatagccagggccccgattgcaaaagacattatagcgagctaccaaaagccatattcaaacacctagatcactaccactctacac
aggccactcgagcttgtgatcgactccgctaagggggcgctcttctctctctctcgttccagtcacaacccgcaaac**ggcgcgc****ATG**
ctgctgcaggccttctgttctgctggcggcttcgcccgaagatcagcgctccatgacgaacgagacgtccgaccgccccct
ggctgcacttcaacccccacaagggctggatgaacgacccccacggcctgtggtacgacgagaaggacccaagtggcactgt
acttccaglacaaacccgaacgacaccgtctgggggacgccttgttctggggccacgccacgtccgacgacctgaccaactggg
aggaccageccategccatgccccgaagegcaacgactccggcgcttctccggctccatgggtgggtggaactacaacaacact
ccggcttctcaacgacaccatcgaccgcgccagecgtgcgtggccatctggacctacaacacccggagtcagaggagcagt
acatctctacagcctggacggcggctacacctaccagatcaccagaagaaccccgctgctggccccaactccaccagttcc
gagaccgaaggtcttctggctagagccctccagaagtggatcatgaccgcggccaagtcccaggactacaagatcgagatct
actctccgacgacctgaagtctggaagctggagtccgcgttcgccaacgagggcttctcggctaccagtacgagtgcceggg
cctgategaggltccccaccgagcaggaccccagcaagtcctactgggtgatgttcatctccatcaaccccggegccecgccgg
cggctcttcaaccagttctgtggcagcttcaacggcaccacttcgaggccttcgacaaccagtccegcgtgggtggacttcg
gcaaggactactaegccctgcagaccttctcaacaccgacccgacctacgggagcgcctgggcatcgcgtgggcctccaact
gggagtlactcggcttcgtgccaccaacccctggcgctcctccatgtcctctgtgcgaagttccttcaacaccgagtlaccag
gccaacccggagacggagctgatcaacctgaaggccgagccgatcctgaacatcagcaacgccggccccctggagccgggttc
ccaccaacaccacgttgacgaaggccaacagctacaacgtcgacctgtccaacagcaccggcaacctggagtlcgagctgggt
tacgcgctcaacaccaaccagacgatctcaagtcctgttctegggacctctccctctggttcaagggcctggaggaccccagg
agtlacctccgatgggttcgagggtcgcgctctcttctctggaccgcgggaacagcaagggtgaagttcgtgaaggagaa
ccccacttcaacacccgatgagcgtgaacaacaccgcccccaagagcgagaacgacctgtcctactacaaggtgtacggcttg

ctggaccagaacatcctggagctgacttcaacgacggcgacgtcgtgtccaccaaacactacttcatgaccaccgggaacgcc
*ctgggtccgtgaacatgacgacgggggtggacaacctgtttacatcgacaagttccaggtgcgcgaggtcaag***TGA****Acaatt**
ggcagcagcagctcggatagtatcgacacactctggacgctggtcgtgtgatggactgttccgccacacttgctgccttgacctgtga
atatccctgccgctttatcaaacagcctcagtggtttgatcttgtgtgtacgcgcttttgcgagttgctagctgcttgtgctatttgcgaata
ccaccccagcatccccttcctcgtttcatatcgcttgcacccaaccgcaacttatctacgctgtcctgctatcccctcagcgcctgctcct
gctcctgctcactgccctcgcacagccttggtttgggctccgctgtatttctcctggtactgcaacctgtaaacagcactgcaatgctg
atgcacggggaagttagtgggatgggaacacaaatggaggatcgta**gagctc**actagtatcgatttcgaagacaggggtgggtggctgg
atggggaacgctggtcgctgggattcgatcctgctgcttatactccttgggaagcacacccacgactctgaagaagaaaacg
tgcacacacacaaccaaccggccgaatatttgccttctatcccgggtccaagagagactgcgatgccccctcaatcagcat
cctctcctgcccgttcaattctcctgcttgcctgcgcccgggtgcgctgtgcccgccagtcagtcactcctgcacagcc
cccttgcgagctgctcctgtaccctttaccgctccttcattctgcgagggccccctattgaaatgtattcgttgcctgtgtggcca
agcgggtgctgggcccgcgcccgtcgggcagtgctggcgactttggcggaagccgattgttcttctgtaagccacgcgcttg
ctgctttgggaagagaagggggggggtactgaaatggatgaggaggagaaggaggggtattggtattatctgagttgggtgaa
gagc (SEQ ID NO:111)

5 [0340] para introducir el gen de ACP-tioesterasa 2 (CwFatB2) de *Cuphea wrightii* (número de acceso: U56104) en S1920 en el locus FATA1, se generó una construcción para expresar la región codificante de la proteína del gen CwFatB2 bajo el control del promotor Amt03/5'UTR de *Prototheca moriformis* (SEQ ID N.º 84) y 3'UTR de nitrato reductasa de *C. vulgaris* (SEQ ID N.º85). La construcción que se ha expresado en S1920 se puede escribir como FATA1-CrbTub_yInV_nr::amt03_CwTE2_nr-FATA1.

10 [0341] Los sitios de restricción relevantes en la construcción FATA1-CrbTub_yInV_nr::amt03_CwTE2_nr-FATA1 se indican en minúsculas, en negrita y subrayados en la secuencia a continuación y son 5'-3' *BspQ* 1, *Kpn* I, *Asc* I, *Mfe* I, *Bam*HI, *Eco*RI, *Spe* I, *Asc* I, *Pac* I, *Sac* I, *Bsp*Q I, respectivamente. Los sitios *BspQ*I delimitan los extremos 5' y 3' del ADN transformante. Las secuencias en minúsculas y en negrita representan el ADN genómico de S1920 que permite la integración dirigida en el locus FATA1 a través de la recombinación homóloga. Procediendo en la dirección 5' a 3', el promotor de β -tubulina de *C. Reinhardtii* que impulsa la expresión del gen de sacarasa de levadura (que confiere la capacidad de S1920 para metabolizar sacarosa) se indica mediante recuadros de texto. El iniciador ATG y el terminador TGA para la invertasa se indican en cursiva mayúscula y negrita, mientras que la región codificante se indica en cursiva minúscula. La 3' UTR de nitrato reductasa de *Chlorella vulgaris* se indica mediante un texto subrayado en minúsculas seguido de un promotor amt03 endógeno de *Prototheca moriformis*, indicado por un recuadro de texto en cursiva. Los codones iniciador ATG y terminador TGA de ACP-tioesterasa de *C. wrightii* se indican con mayúsculas y negrita cursiva, mientras que el resto de la región codificante de ACP-tioesterasa se indica con negrita y cursiva. La 3' UTR de nitrato reductasa de *C. vulgaris* se indica de nuevo con texto subrayado en minúsculas seguido de la región genómica S1920 FATA1 indicada con texto en negrita y minúsculas. Las secuencias de ADNc con codones optimizados y las secuencias de aminoácidos de Tioesterasa FatB2 de *Cuphea wrightii* se incluyen en el Listado de secuencias como la SEQ ID N.º 107 y la SEQ ID N.º 105, respectivamente.

25

gctctcggagtcactgtgccactgagttcgactggtagctgaatggagtcgctgctccactaaacgaattgtcagcaccgcca
gceggccgaggaccgagtcatagcgggtagtagcgccatggcaccgaccagcctgcttgccagtactggcgtctcttc
cgcttctctgtggctctctgcgcgtccagcgcgtgcgctttccggaggatcatgcggtccgtggcgcaccgcagcggccgctg
cccatgcagcggcgtgcttccgaacagtggcggtcagggccgcaaccgcggtagccgtccgtccggaacccgccaagagt
ttgggagcagcttgagccctgcaagatggcggaggacaagcgcacttctctggaggagcaccggtgcgtggaggctccgggg
ctgaccggccgtgcattcaacgtaataatcgcatgatgatcagaggacacgaagtcttggggcggtggccagaaact
gtccattgcaagggcatagggatgcgttccctcactctcatttctcatttctgaatccctccctgctcactcttctcctctcttc
ccgttcacgcagcattcggggctacccttcttgcgctatgacacttccagcaaaaggtagggcgggctgcgagacggcttccggc
gctgcatgcaacaccgatgatgcttcgacccccgaagctcctcggggctgcatgggcgctccgatgccgctccagggcgagcgc
tgtttaaatagccagggccccgattgcaagacattatagcgagctaccaaaagccatattcaaacacctagatcactaccacttctacac
aggccactcgagcttgtgatcgactccgctaagggggcgctcttctctctctctcgttccagtcacaaccgcgcaaac**ggcgcgc****ATG**
ctgctgcaggccttctgttctgtgctggcggcttcgcccgaagatcagcgctccatgacgaacgagacgtccgaccgcccc
ggtgcacttcaacccaacaagggctggatgaacgaccccaacggcctgtggtacgacgagaaggacgccaagtggcactgt
acttccaglacaacccgaacgacaccgtctgggggacgccttgttctggggccacgccacgtccgacgacctgaaccaactggg
aggaccagccatcgccatcgccccgaagcgcaacgactccggcgcttctccggctccatgggtgggactacaacaacact
ccggcttctcaacgacaccatcgaccgcgccagcgctgcgtggccatctggacclacaacaacccggagtcgaggagcagt
acatctctacagcctggacggcggctacacttccaggatcaccagaagaaccccgctgctggccgccaactccaccagttcc
gagaccgcaaggtcttctggtagcagccctccagaagtggatcatgaccgcggccaagtcccaggactacaagatcgagatct
actctccgacgacctgaagtctggaagctggagtccgcgttcgccaacgagggcttctcggctaccagtagagtccccgg
ctgategagggtccccaccgagcaggaccccagcaagtcctactgggtgatgttcatctccatcaaacccggcgccccggcgg
cggctcttcaaccagtacttctgctggcagcttcaacggcaccacttcgaggccttcgacaaccagtcccgcgtggtggacttcg
gcaaggactactacgcccgcagaccttctcaaacaccgaccgacctacgggagcgcctgggcatcgcgtgggctccaact
gggagtagctccgcttctgcccaccaacccctggcgctctccatgtccctctgctgcaagttctccctcaaacaccgagtagcag
gccaacccggagcggagctgatcaacctgaaggccgagccgatcctgaacatcagcaacgccggccccctggagccgggttcg
ccaccaacaccacgttgacgaaggccaacagctacaacgtcgacctgtccaacagcaccggcaacctggagttcgagctgggtg
tacgcgctcaacaccacccagacgatctcaagtcctgttctcgggacctctccctctggttcaagggcctggaggaccccgagg

agtacctccgcatgggcttcgagggtccgcgtcctccttcttctggaccgcgggaacagcaagggaaggtcgtgaaggagaa
 cccctacttaccacaccgcatgagcgtgaacaaccagccctcaagagcgcgagaacgacctgtcctactacaagggtgtacggcttg
 ctggaccagaacalctggagctgacttcaacgacggcgacgtcgtgccaaccaacacttcatgaccaccgggaacgcc
 ctgggtcctcgtgaacatgacgacgggggtggacaacctgttctacatgacaagttccagggtgcgcgaggtcaag**TGAcaatt**
ggcagcagcagctcggatagatcgacacactctggacgctgctgtgatggactgttcccaccacttgccttgacctgtg
atatccctgccgctttatcaaacagcctcagtgctttgatcttctgttacgcgcttttgcgagttgctagctccttctgctatttgcgaata
ccaccccccagatccccttccctcgtttcatatcgttgcacccaaccgcaacttatctacgctgtcctgctatccctcagcgtcctct
gctcctgctcactgccctcgcacagccttggtttgggctccgctgtatttctctggactgcaacctgtaaaccagcactgcaatgctg
atgcacgggaagtgtggatgggaacacaaatggaggatcccgctctcgaacagagcgcgcagaggaaacgctgaaggctctg
 cctctgtcgcacctcagcgcggcataccacaataaccacctgacgaatgcgcttggttctctgtccattagcgaagcgtccgggtca
 cacacgtgccacggtggcgaggtggcaggtgacaatgatcggtggagctgatggtcgaaacgttcacagcctagggatatc**gaattc**
ggccgacaggacgcgcgtcaaaagggtcgtggctgtatgccctggccggcagggtcgtgctgctgctggttagtattccgcaacc
ctgattttggcgtcttattttggcgtggcaaacgctggcgcggcgcgagccgggcccggcgccgatgcgggtgcccacggctgcccgg
aatccaaggagggaagagcgcggggcagttgaagggtttacgcgaagggtacagccgctcctgcaagggtgcgtgggtgg
aattggacgtgcaggctcgtgaagttcccccaccgctcaccagcgggacaaaagcaccgggtglatcagggtccgtglatccalc
taagagctcgaactacgaactactgatggccctagatttccatcaaaaacgctgagacacttggccaggattgaaactccctga
agggaccaccaggggcccgtgattgttcttccccctggcgagctgccagccaggctgtacctgtgatcagggtgcccgggga
aaatagggttcgtgtgctcagggtcagggtgaggtgacagctcatgaaaacgccaacaatcgcacaattcatgcaagctaatc
agctatttcccttccagagctglaattgtccccaaatctggctaccgggggtgalecttctgtgacgggccccttcccaaccctag
gtatgcgcgatcgggtcggcgcgaactcgcgcgagggccgaggggttgggacgggcccgtcccgaatgcagttgcaccggg
atgcgtggcaccitlltgcgataattatgcaatggactgctcgtcaaaatctggctctgtcgcgaaccctaggatcagcggcgtag
gatttctglaatcattcgtctgatggggagctaccgaclaccctaaalacagcccgactgctgacgccagcgtccacttttgtgac
acattcattcgtgcccaagacatttcatlgtgtgcgaagcgtcccagttacgctcaccgtlltcccgaccttactgttctgtcgt
acagagcgggcccacaggccggctgcagcc**actagtatggtgtggcggcggccagcagcgccttcttccccgtgcccgc**
 ccccccccccccccaagcccggcaagttcggcaactggcccagcagcctgagccagccctcaagcccgaagacaacccc
 aacggccgcttccagggtgaaggccaacgtgagccccac**ggcgcgccc**cccaaggccaacggcagcgcctgagcctgaag
 tccggcagcctgaacacctggaggacccccccagcagccccccccccgacaccttctgaaaccagctcccgaactggagccg
 cctgcgcaccgccataccaccgtgttctgtggcggcgagaugcagttcaccgctggaccgcaagagcaagcgcggccgaca
 tctgtgtgactggttcggcagcgcgaccatcgtgcaggacggcctggtgttccgcgagcgttcagcatccgcagctacgagat
 cggcgccgaccgcaccgccagatcgagacctgatgaaccactgcaggacaccagcctgaaccactgcaagagcgtggg
 cctgctgaacgacggcttcggcgcacccccagatgtgcaccgcgacctgatctgggtgctgaccaagatgcagatcgtgggt
 aaccgtacccccactggggcgacacctgtgagatcaacagctggttcagccagagcggcaagatggcatgggcccgcgagt
 ggctgatcagcagctgcaacaccggcgagatcctggtgcgcgccaccagcgcctgggcatgatgaaccagaagaccgcccg

*cttcagcaagctgccctgcgaggtgcgccaggagatgccccccacttcgtggacgccccccctgatcgaggacaacgacc
gcaagctgcacaagttcgacgtgaagaccggcgacagcatctcaagggcctgacccccggctggaacgacttcgacgtgaac
cagcacgtgagcaacgtgaagtacatcggtggattctggagagcatgccaccgaggtgctggagaccaggagctgtgcag
cctgaccctggagtaccgccgcgagtgccgcccgcgagagcgtggaggagcgtgaccagcatgaaccccagcaaggtgggc
gaccgcagccagtaccagcactgctgcctggaggacggcgcgacatcatgaagggccgaccgagtgggcggcccaag
aacgcccggcaccaaccgcgccatcagcaccTGAttaattaaactcgaggcagcagcagctcggatagtatcgacacactctgga
cgctggtcgtgtgatggactgttcccaccacttgcctgacctgtgaatatccctgccgctttatcaaacagcctcagtgtgtttg
atcttctgtgtacgcgcttttgcgagttgctagctgcttctgctatttgcgaataccacccccagcatccccctccctcgtttcatatcgcttg
catccaaccgcaacttatctacgctgctctgctatccctcagcgcctgctcctgctcctgctcactgccccctgcacagccttggttggg
ctccgctgtattctcctggtactgcaacctgtaaaccagcactgcaatgctgatgcacgggaagtagtgggatgggaacacaaatgg
aaagcttgagctctgtttccagaaggagttgctcctgagccttctcattctcagcctcgataacctccaaagccgctctaattgtggagg
gggttcgaagacaggggtggtggctggatggggaaacgctggcgcgggattcgatcctgctgcttatactcctcctggaagca
caccacgactctgaagaagaaaactgcacacacacaaccaaccggccgaatattgtcttcttatcccggtccaagag
agactgcgatgccccctcaatcagcctcctcctcctgcccgttcaattctcctgcttgcctgcgcccggtgcgccgtctgc
ccgccagtcagtcactctgcacagggccccctgtgcgcagtgctcctgtaccctttaccgctccttccattctgcgagggccccct
attgaatgtattcgttgcctgtgtggccaagcgggctgctggggcgcgccgctcggggcagtgctcggcgactttggcggaagc
cgattgttcttctgaagccaagcgccttgcctgcttgggaagagaagggggggggtactgaatggatgaggaggagaaggag
gggtattggtattatctgagttgggtgaagagc* (SEQ ID NO:112)

5 [0342] Tras la transformación de FATA1-CrbTub_ylnv_nr-FATA1 en S1920, los transformantes primarios se purificaron clonalmente y se cultivaron en condiciones estándar de producción de lípidos a pH 5,0 similares a las condiciones descritas en el Ejemplo 1. Los perfiles de ácidos grasos se analizaron mediante cromatografía de gases / detección de ionización de llama de éster metílico de ácidos grasos estándar (FAME GC/FID). En la Tabla 29 siguiente se proporcionan los perfiles de ácidos grasos de varios transformantes.

10 Tabla 29. Perfiles de ácidos grasos de células de *Prototheca moriformis* que contienen un marcador seleccionable para interrumpir un alelo FATA1 endógeno.

Transformación	% C14:0	%C16:0	% C18:0	% C18:1	% C18:2
Tipo salvaje	1,23	25,68	2,83	60,54	7,52
Transformante 1 de pSZ1883	0,86	16,95	1,75	68,44	9,78
Transformante 2 de pSZ1883	0,85	17,33	1,71	68,57	9,31
Transformante 3 de pSZ1883	0,82	17,40	1,78	68,55	9,22
Transformante 4 de pSZ1883	0,84	17,43	1,78	68,25	9,53
Transformante 5 de pSZ1883	0,75	17,64	2,02	69,02	8,61

[0343] Estos resultados muestran que la ablación del alelo FATA1 endógeno del hospedador altera el perfil de lípidos de las microalgas modificadas. El impacto de dirigir un marcador seleccionable al alelo FATA1 endógeno es una

clara disminución de la producción de ácidos grasos C16:0 con un aumento en la producción de ácidos grasos C18:1.

[0344] Tras la transformación de FATA1-CrbTub_yInV_nr::amt03_CwTE2_nr-FATA1 en S1920, los transformantes primarios se purificaron clonalmente y se cultivaron en condiciones estándar de producción de lípidos a pH 7,0 con diferentes fuentes de carbono hasta una concentración total de 40 g/l. La concentración de sacarosa fue de 40 g/l. Cuando solo se usó glucosa como fuente de carbono, se proporcionó glucosa a 40 g/l. Cuando se utilizó glucosa y fructosa como fuente de carbono, se proporcionó glucosa a 20 g/L y fructosa a 20 g/L. Los perfiles de ácidos grasos se evaluaron mediante GC-FID. Los perfiles de ácidos grasos resultantes se enumeran en la Tabla 30.

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

Transformante	Número de copia	Fuente de carbono	% C10:0	% C12:0	% C14:0	%C16:0	% C18:0	% C18:1	% C18:2
Tipo salvaje	0	Glucosa	0,01	0,04	1,38	28,83	3,00	56,05	8,21
Tipo salvaje	0	Glucosa	0,01	0,04	1,50	29,38	3,00	55,29	8,23
Tipo salvaje	0	Glucosa/ Fructosa	0,01	0,05	1,48	28,58	3,20	57,14	7,27
Tipo salvaje	0	Glucosa/ Fructosa	0,01	0,04	1,54	29,05	3,23	56,47	7,32
Transformante 1 de pSZ1925	> 2	Glucosa/ Fructosa	4,29	19,98	9,17	20,68	3,47	34,38	6,37
Transformante 2 de pSZ1925	> 2	Glucosa/ Fructosa	3,11	16,17	9,91	15,97	1,57	45,72	5,81
Transformante 3 de pSZ1925	> 2	Sacarosa	4,84	24,22	11,56	19,48	2,67	29,56	6,02
Transformante 4 de pSZ1925	> 2	Sacarosa	3,24	16,67	10,39	16,34	1,43	44,41	6,00
Transformante 5 de pSZ1925	1-2	Glucosa/ Fructosa	0,18	1,64	1,85	14,43	2,12	70,30	7,63
Transformante 6 de pSZ1925	1-2	Glucosa/ Fructosa	0,18	1,56	1,74	13,56	2,25	71,04	7,72
Transformante 7 de pSZ1925	1-2	Sacarosa	0,19	1,69	1,89	13,79	3,15	69,97	7,68
Transformante 8 de pSZ1925	1-2	Sacarosa	0,15	1,26	1,49	13,44	2,73	71,46	7,77

[0345] Según el direccionamiento de solo un marcador seleccionable al alelo FATA1 del hospedador, la integración de un marcador seleccionable concomitante con una tioesterasa exógena altera el perfil de lípidos de las microalgas modificadas. Como antes, la orientación de un gen exógeno al alelo FATA1 da como resultado una clara disminución de la producción de ácidos grasos C16:0. La expresión adicional de la tioesterasa CwTE2 en el locus FATA1 también afecta a los ácidos grasos de cadena media y a la producción de ácidos grasos C18:1 en una medida que depende del nivel de actividad tioesterasa exógena presente en los transformantes analizados. Los genes flanqueados por unidades repetidas como la 3' UTR de nitrato reductasa de *C. vulgaris* en construcciones como FATA1-CrbTub_yInV_nr::amt03_CwTE2_nr-FATA1 puede amplificarse tras la integración en el genoma hospedador. Existe una buena concordancia entre el número de copias del transgén amplificado en el sitio de integración diana y los niveles de tioesterasa, como lo revelan los impactos en los perfiles de ácidos grasos o la acumulación de proteínas recombinantes, según lo evaluado por transferencia Western.

[0346] Las líneas transgénicas en las que el gen CwTE2 ha sufrido amplificación muestran un marcado aumento en los ácidos grasos de cadena media (C10:0-C14:0) y una disminución simultánea en los ácidos grasos C18:1. Por el contrario, aquellos transformantes en los que CwTE2 ha sufrido poca o ninguna amplificación (probablemente 1-2 copias) concuerdan con una menor expresión de la tioesterasa exógena, lo que resulta en un ligero aumento en los ácidos grasos de cadena media y un impacto mucho mayor en el aumento de los ácidos grasos C18:1.

[0347] En conjunto, estos datos demuestran que la ablación del alelo FATA1 endógeno del hospedador altera el perfil de lípidos de las microalgas modificadas.

B. Alteración de los perfiles de lípidos por eliminación de un gen de tioesterasa endógeno de *Prototheca moriformis*

[0348] Una construcción, pSZ1773, para regular a la baja la expresión del gen FATA1 de *Prototheca moriformis* por un ARN de horquilla se introdujo en un contexto genético de *Prototheca moriformis* UTEX 1435 S1920. El gen de sacarasa *suc2* de *Saccharomyces cerevisiae* se utilizó como marcador seleccionable, confiriendo la capacidad de crecer en la sacarosa como única fuente de carbono. La parte de la construcción que codifica el ARN horquillado utilizó el primer exón de la región codificante de *FatA1*, seguido del intrón endógeno y una unidad repetida del primer exón en la orientación inversa. Se incluyeron secuencias de direccionamiento de recombinación homóloga 5' y 3' (que flanquean la construcción) a la región genómica 6S, enumeradas como la SEQ ID N.º 100 y 101 respectivamente, para la integración de la construcción de horquilla en el genoma nuclear. Esta construcción se denomina 6S:: β -Tub:*suc2*::nr:: β -tub:hairpin*FatA*::nr::6S.

[0349] Los sitios de restricción relevantes en 6S:: β -Tub:*suc2*::nr:: β -tub:hairpin *FatA*::nr::6S se indican en minúsculas, en negrita y subrayados en la secuencia siguiente y son 5'-3' *BspQ1*, *Kpn1*, *Mfe1*, *BamH1*, *EcoR1*, *Spe1*, *Xho1*, *Sac1*, *BspQ1*, respectivamente. Los sitios *BspQ1* delimitan los extremos 5' y 3' del ADN transformante. Las secuencias en minúsculas y en negrita representan el ADN genómico de S1920 que permite la integración dirigida en el locus 6s a través de la recombinación homóloga. Procediendo en la dirección 5' a 3', el promotor de β -tubulina de *Reinhardtii* que impulsa la expresión del gen de sacarasa de levadura (que confiere la capacidad de S1920 para metabolizar sacarosa) se indica mediante recuadros de texto. El iniciador ATG y el terminador TGA para la invertasa se indican en cursiva mayúscula y negrita, mientras que la región codificante se indica en cursiva minúscula. La 3' UTR de nitrato reductasa de *Chlorella vulgaris* se indica mediante un texto subrayado en minúsculas seguida del segundo promotor de β -tubulina de *Reinhardtii* que impulsa la expresión de la horquilla *FatA1*, indicada por texto en cursiva en recuadros. El codón ATG iniciador de *FatA1* se indica en mayúsculas, negrita y cursiva, mientras que el resto del primer exón de la región codificante de *FatA1* se indica en mayúsculas. El intrón del gen *FatA* se indica en mayúsculas subrayadas, y se creó una región conectora que se muestra en mayúsculas subrayadas, cursiva y negrita en el intrón *FatA1*/primer exón invertido para ayudar en el corte y empalme del ARN en estos vectores. El primer exón invertido de *FatA1* se indica en mayúsculas. La 3' UTR de nitrato reductasa de *vulgaris* se indica de nuevo con texto subrayado en minúsculas seguida de la región genómica S1920 6S indicada con texto en negrita y minúsculas. Las secuencias de las porciones FATA de esta construcción de ARNi se enumeran como la SEQ ID N.º110.

gctcttcgccgcccactcctgctcgagcgcgcccgcgctgcccagcgccttggccttttcgccgctcgtgcgctc
gctgatgtccatcaccaggtccatgaggtctgccttgcgccggtgagccactgcttcgtcggggcgccaagaggagcatga
gggaggactcctgggtccagggtctgacgtggctcggctctgggagcgggcccagcatcatctggctctgccaccgagge
cgctccaactggctcctccagcagcgcagctgcgcccagccctggcagaggaagacaggtgaggggggtatgaattgtaca
gaacaaccagagccttgtctaggcagaatccctaccagtcagcttaccctggatgacggcctgcgaacagctgtccagcg
accctcgtgcgcccgttctcccgaagcttcttccagcaccgtgatggcgcgagccagcgcgcacgctggcgctgcgctt
cgccgatctgaggacagtcggggaactctgatcagctctaaaccccttgcgcgcttagtggtgccatcctttgcagaccggtgag
agccgacttgtgtgcgccacccccacaccactctcctccagaccaattctgtcactttttggcgaaggcatcgccctcgccc
tgcagagaggacagcagtgcccagccgctgggggttggcggatgacgctcaggtacccttcttgcgctatgacactccagca
aaaggtagggcgggctgcgagacggcttcccggcgctgcatgcaacaccgatgatgcttcgacccccgaagctccttcggggctg
catggcgctccgatgccgctccagggcgagcgcgtgttaaatagccaggccccgattgcaaagacattatagcgagctaccaaag
ccatattcaaacacctagatcactaccacttctacacagggcactcgagcttgtgatcgactccgctaagggggcgctcttctcttc
gtttcagtcacaaccgcaaac**tctaga**atata**ATG**ctgctgcagggccttctgttctcgtggcggcttcgccccaagatcag
cgctccatgacgaacgagacgtccgaccgccccctgggtcacttcaacccccacaagggctggatgaacgacccccaacggcc
tgtgttacgacgagaaggacgccaagtggcacctgtacttccagtlacaacccgaacgacaccgctcgggggacgcccctgttctg
gggccaagccagctccgacgacctgaccaactgggaggaccagccatcgccatcgccccgaagcgcaacgactccggcgc
cttctccgctccatgggtgggactacaacaacacctccggcttctcaacgacaccatcgaccgcgcagcgtgcgtggcca
cttggaclacaacacccccggagtcgaggagcagtlacatctctacagcctggacggcggctlacacttcaaccgagtlaccaga
agaaccccgctgctggccgccaactccaccagttccgcgacccgaaggtcttctgggtacgagccctcccagaagtggatcatgac
cgcggccaagtcaccaggaclacaagatcgagatctacttccgacgacctgaagtcctggaagctggagtcgcgttcgcca
cgagggcttctcggtaccagtlacagtgccccggcctgatcgaggtccccaccgagcaggaccccagcaagtcactgggt
gatgttcatctccatcaacccccggcgcccccggcggcgtcttcaaccagtlacttgcctggcagcttcaacggcaccacttcg
agccctcgacaaccagtcctccgctgggtggacttcggcaaggactactacgccctgcagacttcttcaacaccgaccgacct
cgggagcgccttgggcatcgcgtgggctccaactgggagtlactccgcttctgcccaccaacccccggcgtctctccatgtccc
tcgtgcgcaagtctccctcaacaccgagtlaccaggccaacccggagacggagctgatcaacctgaaggccgagccgatcctg

aacatcagcaacgccggccccctggagccggllcgccaccaacaccacgtlgacgaaggccaacagctacaacgtcgacctg
caacagcaccggcaccctggagtlcgagctgggtgacgccgtcaacaccaccagacgatccaagtcctgllcgaggacct
tcctctggllcaagggcctggaggacccccgaggatcctccgatgggctcgagggtccgcgtcctcctctctggaccgc
gggaacagcaagggaagtlcgtaaggagaacccccacttcaccaaccgatgagcgtgaacaaccagccctcaagagcg
agaacgacctgctactacaagggtgacggcttggaccagaacalcctggagctgacttcaacgacggcgacgctgctgc
accaacacctacttcatgaccaccgggaacccccgggclccgtgaacatgacgacgggggtggacaacctgllctacatgac
*aagtlccaggtgcgcgaggtcaag**TGAcaattggcagcagcagctcggatagtatcgacacactctggacgctggtcgtg***
ggactgttcccaccacttgccttgacctgtgaatatccctccgctttatcaaacagcctcagtggtttgatcttgtgtacgcg
cttttgcgagttgctagctccttgcctatttgcgaataaccacccccagcatccccctccctcgtttcatatcgcttgcacccaaccgcaac
ttatctacgctgctcgtatccctcagcgtgctcctgctcctgctcactgccctcgcacagccttggttgggctccgctgtattctcc
*tgactgcaacctgtaaacagcactgcaatgctgatgcacgggaagtagtgggatgggaacacaaatgg**aggatccc**gcgtctgc*
aacagagcgcgcagaggaacgctgaaggtctgcctctgctgcacctcagcgcggcatacaccacaataaccactgacgaatgcg
cttggttcttgcattagcgaagcgtccgggtcacacacgtgccacgttggcgaggtggcaggtgacaatgatcggtggagctgatg
*gtcgaaacgttcacagcctagggatgc**gaattc**ctttctgctatgacacttccagcaaaaggtagggggggctgcgagacgg*
ctcccggcgtgcatgcaacaccgatgatgcttgcacccccgaagctccttggggctgcatgggcgctccgatgccgtccag
ggcgagcgtglltaatalagccaggccccgallgcaaaagacallatagcgactaccaaaagecatattcaaacactagated
ctaccacttccacagggcaactcgagcttggatgcactccgctaagggggcgcttctctcttcttctcagtcacaaccgca
acactagtATGGCACCGACCAGCCTGCTTGCCAGTACTGGCGTCTCTTCCGTTCTCT
GTGGTCCTCTGCGCGCTCCAGCGCGTGCCTTTTCCGGTGGATCATGCGGTCCGT
GGCGCACCGCAGCGGCCGCTGCCATGCAGCGCCGCTGCTTCCGAACAGTGGCG
GTCAGGGCCGCACCCGCGGTAGCCGTCCGTCCGGAACCCGCCAAGAGTTTTGG
GAGCAGCTTGAGCCCTGCAAGATGGCGGAGGACAAGCGCATCTTCCTGGAGGAG
CACCGGTGCGTGGAGGTCCGGGGCTGACCGGCCGTCGCATTCAACGTAATCAAT
CGCATGATGATCAGAGGACACGAAGTCTTGGTGGCGGTGGCCAGAAACTGTC
CATTGCAAGGGCATAGGGATGCGTTCCTTACCTCTCATTCTCATTCTGAATCC
CTCCCTGCTCACTCTTCTCCTCCTCCTTCCCGTTCACGCAGCATTCGGGGCAACG****
****AGGTGGGCC**CTGCTCCTCCAGGAAGATGCGCTTGTCTCCTCCGCATCTTGCAGGG**
CTCAAGCTGCTCCCAAACCTCTTGGGCGGGTTCGGACGGACGGCTACCGCGGGT
GCGGCCCTGACCGCCACTGTTCCGAAGCAGCGGCCGCTGCATGGGCAGCGGCCGC
TGCGGTGCGCCACGGACCGCATGATCCACCGGAAAAGCGCACGCGCTGGAGCGC
GCAGAGGACCACAGAGAAGCGGAAGAGACGCCAGTACTGGCAAGCAGGCTGGT
CGGTGCCATatcgat**agatctcttaaggcagcagcagctcggatagtatcgacacactctggacgctggtcgtgtaggact**
gttcccgccacacttgccttgacctgtgaatatccctccgctttatcaaacagcctcagtggtttgatcttgtgtacgcgctttt

cgagttgctagctgcttgtgctatttgcgaataccacccccagcatcccccttccctcgtttcatatcgcttgcacccaaccgcaacttatct
acgctgtcctgctatccctcagcgtgctcctgctcctgctcactgcccctgcacagccttggttggctccgctgtattctcctggta
ctgcaacctgtaaacccagcactgcaatgctgatgcacgggaagtagtgggatgggaacacaaatggaaagcttaattaagagctctt
gtttccagaaggagtgtccttgagcctttcattctcagcctcgataacctccaaagccgctctaattgtggaggggggttcgaa
ttaaaagcttggaatgttggctgctgctgctggaacaagcccagacttgttgcctcactgggaaaaggaccatcagetccaaaa
aacttgcgctcaaaccgctacctgtcttgcgcaatctgcctgttgaategccaccacattcatattgtgacgcttgagc
agtctgtaattgctcagaatgtggaatcatctgccccctgtgagagccatgccagcagctgctgccccgagggacacccgccc
actctgacagcagaccattatgctacctacaatagttcataacagtgaccatatttctcgaagctcccaacgagcactccat
gctctgagtgggcaccceccggcctggtgcttgcggagggcaggtcaaccggcatggggctaccgaaatccccgaccggat
cccaccaccccgatgggaagaatctctccccgggatgtgggcccaccaccagcacaacctgctggcccaggcgagcgtc
aaaccataccacacaaatatacttggcagcggcctgaattcttctgcccgtctgtaaccgggtcttctgccaagcagggg
ttgctagggatcgctccgagtcgcaaaccttgcgctggcggggcttctgagcttgaagagc (SEQ ID
 NO:113)

5 [0350] La expresión de 6S::β-Tub:suc2:nr::β-tub:hairpin FatA:nr::6S conduce a la formación de un ARN de horquilla para silenciar los genes diana FatA. Tras su transformación en S1920, los transformantes primarios se purificaron clonalmente y se cultivaron en condiciones estándar de producción de lípidos a pH 5,0. Los perfiles resultantes de los clones transformantes representativos se enumeran en la Tabla 31.

10 Tabla 31. Perfiles de ácidos grasos de células de *Prototheca moriformis* que contienen una construcción de ARN horquillado para regular a la baja la expresión de FATA.

Transformante	% C10:0	% C12:0	% C14:0	%C16:0	%C16:1	% C18:0	% C18:1	% C18:2
Tipo salvaje	0,01	0,03	1,23	25,68	0,96	2,83	60,54	7,52
Transformante 1 de pSZ1773	0,01	0,03	0,71	15,10	1,05	1,67	72,08	8,27
Transformante 2 de pSZ1773	0,01	0,03	0,81	15,66	1,16	1,56	70,03	9,61
Transformante 3 de pSZ1773	0,01	0,03	1,09	22,67	1,05	2,12	63,18	8,66
Transformante 4 de pSZ1773	0,01	0,04	1,14	23,31	1,01	2,23	62,83	8,26

15 [0351] Los resultados anteriores muestran que la construcción de horquilla FATA produjo los fenotipos esperados: una reducción en los niveles de ácidos grasos C16 y un aumento en los niveles de ácidos grasos C18:1 en comparación con el control no transformado de tipo salvaje.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0352]

20 <110> Solazyme, Inc.

<120> Aceites microbianos con puntos de fluidez disminuidos, fluidos dieléctricos producidos a partir de estos y métodos relacionados

25 <130> SOLAP009W0

ES 2 909 143 T3

<140> PCT/US2011/059224
 <141> 2011-11-03

 5 <150> 61/409,902
 <151> 2010-11-03

 <150> 61/438,966
 <151> 2011-02-02

 10 <150> 61/522,231
 <151> 2011-08-10

 <150> 61/546,932
 <151> 2011-10-13

 15 <160> 113

 <170> versión de PatentIn 3.5

 20 <210> 1
 <211> 1187
 <212> ADN
 <213> Desconocido

 25 <220>
 <223> Promotor HUP de Chlorella

 <400> 1
 gatcagacgg gcctgacctg cgagataatc aagtgctcgt aggcaaccaa ctcagcagct 60
 30 gcttgggtgtt gggctctgcag gatagtgttg cagggcccca aggacagcag gggaaacttac 120
 accttgtccc cgaccagtt ttatggagtg cattgcctca agagcctagc cggagcgcta 180
 35 ggctacatac ttgccgcacc ggtatgaggg gatatagtagc tcgactgctg ctgtctagt 240
 agatgggcag tgctgccc ataaactgg ctgctcagcc atttggtggc ggaccattct 300
 40 gggggggcca gcaatgcctg actttcgggt agggtgaaaa ctgaacaaag actaccaaaa 360
 cagaatttct tcctccttgg aggtaagcgc aggccggccc gctgcccgc acatggcgct 420
 ccgaacacct ccatagctgt aaggcgcaa acatggccgg actggtgtca gcaactcttc 480
 45 atggccatac aaggatcatgt cgagattagt gctgagtaag aactatcac cccatgttcg 540
 attgaagccg tgacttcatg ccaacctgcc cctgggcgta gcagacgtat gccatcatga 600
 ccaactagccg acatgcgctg tcttttgcca ccaaaacaac tggtagaccg ctcgaagtcg 660
 50 tgccgcacac ctccgggagt gagtcggcg actcctccc ggccggccgc ggccctacct 720
 gggtagggtc gccatacgc cagcaccaaa cgacgcagga ggggattggg gtagggaatc 780
 55 ccaaccagcc taaccaagac ggcacctata ataataggtg gggggactaa cagccctata 840
 tcgcaagctt tgggtgccta tcttgagaag cagagttgg agtggctgtg tacggctcag 900
 cctaaggtgg gtgtgccgca gcctgaaaca aagcgtctag cagctgcttc tataatgtgt 960
 60 cagccgttgt gtttcagtta tattgtatgc tattgtttgt tcgtgctagg gtggcgcagg 1020

ES 2 909 143 T3

```

cccacctact gtggcgggcc attggttggg gcttgaattg cctcaccatc taaggtctga      1080
acgctcactc aaacgccttt gtacaactgc agaactttcc ttggcgctgc aactacagtg      1140
5  tgcaaaccag cacatagcac tcccttacat caccagcag tacaaca                    1187

<210>  2
<211>  1414
10  <212>  ADN
    <213>  Chlorella ellipsoidea

<400>  2
15  cgctgcgcac cagggccgcc agctcgctga tgcgctcca aatgcggtcc cccgattttt      60
    tgttcttcat cttctccacc ttggtggcct tcttggccag ggccttcagc tgcattgcga      120
    cagaccgttg agctcctgat cagcatcctc aggaggcctt ttgacaagca agcccctgtg      180
20  caagcccatt cacggggtac cagtgggtgct gaggtagatg ggtttgaaaa ggattgctcg      240
    gtogattgct gctcatggaa ttggcatgtg catgcatggt cacaatatgc caccaggctt      300
    tggagcaaga gagcatgaat gccttcaggc aggttgaaag ttcttggggg tgaagaggca      360
25  gggccgagga ttggaggagg aaagcatcaa gtcgctgctc atgctcatgt tttcagtcag      420
    agtttgccaa gctcacagga gcagagacaa gactggctgc tcagggtgtg catcgtgtgt      480
30  gtggtggggg gggggggggt aatacggtac gaaatgcaact tggaaattccc acctoatgcc      540
    agcggacca catgctttaa ttcgaggcct gtgggggtgag aatgctcac tctgccctcg      600
    ttgctgaggt acttcaggcc gctgagctca aagtcgatgc cctgctcgtc tatcagggcc      660
35  tgcacctctg ggctgaccgg ctcagcctcc ttcgcgggca tggagtaggc gccggcagcg      720
    ttcattgtccg ggcccagggc agcgggtggt ccataaatgt cgggtgatggt ggggaggggg      780
40  gccgtcgcca caccattgcc gttgctggct gacgcatgca catgtggcct ggctggcacc      840
    ggcagcactg gtctccagcc agccagcaag tggctgttca ggaaagcggc catgttgttg      900
45  gtccctgcgc atgtaattcc ccagatcaaa ggaggaaca gcttggattt gatgtagtgc      960
    ccaaccggac tgaatgtgag atggcaggtc cctttgagtc tcccgaatta cttagcagggc      1020
    actgtgacct aacgcagcat gccaacgca aaaaaatgat tgacagaaaa tgaagcggtg      1080
50  tgtcaatatt tgctgtatth attcgtttta atcagcaacc aagttcgaaa cgcaactatc      1140
    gtgggtgatca agtgaacctc atcagactta cctcgttcgg caaggaaacg gaggaccaa      1200
55  attccaattt gatattatcg cttgccaagc tagagctgat ctttgggaaa ccaactgcca      1260
    gacagtggac tgtgatggag tgccccagat ggtggagcct cttcgattcg gttagtcat      1320
    actaacgtga accctcagtg aaggaccat cagaccagaa agaccagatc tcctcctcga      1380
60  caccgagaga gtgttgccgc agtaggacga caag                    1414

```

ES 2 909 143 T3

<210> 3
 <211> 512
 <212> PRT
 <213> Desconocido
 5
 <220>
 <223> Sacarasa de levadura
 <400> 3
 10
 Met Thr Asn Glu Thr Ser Asp Arg Pro Leu Val His Phe Thr Pro Asn
 1 5 10 15
 15
 Lys Gly Trp Met Asn Asp Pro Asn Gly Leu Trp Tyr Asp Glu Lys Asp
 20 25 30
 20
 Ala Lys Trp His Leu Tyr Phe Gln Tyr Asn Pro Asn Asp Thr Val Trp
 35 40 45
 25
 Gly Thr Pro Leu Phe Trp Gly His Ala Thr Ser Asp Asp Leu Thr Asn
 50 55 60
 30
 Trp Glu Asp Gln Pro Ile Ala Ile Ala Pro Lys Arg Asn Asp Ser Gly
 65 70 75 80
 35
 Ala Phe Ser Gly Ser Met Val Val Asp Tyr Asn Asn Thr Ser Gly Phe
 85 90 95
 40
 Phe Asn Asp Thr Ile Asp Pro Arg Gln Arg Cys Val Ala Ile Trp Thr
 100 105 110
 45
 Tyr Asn Thr Pro Glu Ser Glu Glu Gln Tyr Ile Ser Tyr Ser Leu Asp
 115 120 125
 50
 Gly Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Gln Lys Asn Pro Val Leu Ala Ala
 130 135 140
 55
 Asn Ser Thr Gln Phe Arg Asp Pro Lys Val Phe Trp Tyr Glu Pro Ser
 145 150 155 160
 60
 Gln Lys Trp Ile Met Thr Ala Ala Lys Ser Gln Asp Tyr Lys Ile Glu
 165 170 175
 65
 Ile Tyr Ser Ser Asp Asp Leu Lys Ser Trp Lys Leu Glu Ser Ala Phe
 180 185 190
 70
 Ala Asn Glu Gly Phe Leu Gly Tyr Gln Tyr Glu Cys Pro Gly Leu Ile
 195 200 205

ES 2 909 143 T3

	Glu	Val	Pro	Thr	Glu	Gln	Asp	Pro	Ser	Lys	Ser	Tyr	Trp	Val	Met	Phe
	210						215					220				
5	Ile	Ser	Ile	Asn	Pro	Gly	Ala	Pro	Ala	Gly	Gly	Ser	Phe	Asn	Gln	Tyr
	225					230					235					240
10	Phe	Val	Gly	Ser	Phe	Asn	Gly	Thr	His	Phe	Glu	Ala	Phe	Asp	Asn	Gln
					245					250					255	
15	Ser	Arg	Val	Val	Asp	Phe	Gly	Lys	Asp	Tyr	Tyr	Ala	Leu	Gln	Thr	Phe
				260					265					270		
20	Phe	Asn	Thr	Asp	Pro	Thr	Tyr	Gly	Ser	Ala	Leu	Gly	Ile	Ala	Trp	Ala
			275					280					285			
25	Ser	Met	Ser	Leu	Val	Arg	Lys	Phe	Ser	Leu	Asn	Thr	Glu	Tyr	Gln	Ala
	305					310					315					320
30	Asn	Pro	Glu	Thr	Glu	Leu	Ile	Asn	Leu	Lys	Ala	Glu	Pro	Ile	Leu	Asn
					325					330					335	
35	Ile	Ser	Asn	Ala	Gly	Pro	Trp	Ser	Arg	Phe	Ala	Thr	Asn	Thr	Thr	Leu
				340					345					350		
40	Thr	Lys	Ala	Asn	Ser	Tyr	Asn	Val	Asp	Leu	Ser	Asn	Ser	Thr	Gly	Thr
			355					360					365			
45	Leu	Glu	Phe	Glu	Leu	Val	Tyr	Ala	Val	Asn	Thr	Thr	Gln	Thr	Ile	Ser
	370						375					380				
50	Lys	Ser	Val	Phe	Ala	Asp	Leu	Ser	Leu	Trp	Phe	Lys	Gly	Leu	Glu	Asp
	385					390					395					400
55	Pro	Glu	Glu	Tyr	Leu	Arg	Met	Gly	Phe	Glu	Val	Ser	Ala	Ser	Ser	Phe
					405					410					415	
60	Phe	Leu	Asp	Arg	Gly	Asn	Ser	Lys	Val	Lys	Phe	Val	Lys	Glu	Asn	Pro
				420					425					430		
65	Tyr	Phe	Thr	Asn	Arg	Met	Ser	Val	Asn	Asn	Gln	Pro	Phe	Lys	Ser	Glu
			435					440					445			
70	Asn	Asp	Leu	Ser	Tyr	Tyr	Lys	Val	Tyr	Gly	Leu	Leu	Asp	Gln	Asn	Ile
	450						455					460				

ES 2 909 143 T3

5 Leu Glu Leu Tyr Phe Asn Asp Gly Asp Val Val Ser Thr Asn Thr Tyr
 465 470 475 480

Phe Met Thr Thr Gly Asn Ala Leu Gly Ser Val Asn Met Thr Thr Gly
 485 490 495

10 Val Asp Asn Leu Phe Tyr Ile Asp Lys Phe Gln Val Arg Glu Val Lys
 500 505 510

15 <210> 4
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Desconocido

20 <220>
 <223> Señal de secreción de levadura
 <400> 4

25 Met Leu Leu Gln Ala Phe Leu Phe Leu Leu Ala Gly Phe Ala Ala Lys
 1 5 10 15

30 Ile Ser Ala Ser
 20

35 <210> 5
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Desconocido

40 <220>
 <223> Señal de secreción de plantas superiores
 <400> 5

45 Met Ala Asn Lys Ser Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Ser Leu Ala
 1 5 10 15

Ser Gly

50 <210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Desconocido

55 <220>
 <223> Señal de secreción de consenso de eucariotas
 <400> 6

60 Met Ala Arg Leu Pro Leu Ala Ala Leu Gly
 1 5 10

ES 2 909 143 T3

```

5  <210> 7
   <211> 20
   <212> PRT
   <213> Desconocido

   <220>
   <223> combinación de señal de secreción de plantas superiores / eucariotas
10 <400> 7

Met Ala Asn Lys Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu
1   1           5           10           15

15 Ala Ala Ser Gly
    20

20 <210> 8
   <211> 2615
   <212> ADN
   <213> Saccharomyces cerevisiae

25 <400> 8
   gaattcccca acatggtgga gcacgacact ctctgtact ccaagaatat caaagataca      60
   gtctcagaag accaaagggc tattgagact tttcaacaaa gggtaatatc gggaaacctc      120
30  ctctgattcc attgccagc tatctgtcac ttcatacaaa ggacagtaga aaaggaaggt      180
   ggcacctaca aatgccatca ttgcgataaa ggaaaggcta tctttcaaga tgcctctgcc      240
35  gacagtggtc ccaaatgatg acccccaccc acgaggagca tctgtgaaaa agaagacggt      300
   ccaaccacgt cttcaaaagc agtggattga tgtgaacatg gtggagcacg aactctctgt      360
40  ctactccaag aatatcaaag atacagtctc agaagaccaa agggctattg agacttttca      420
   acaaagggta atatcgggaa acctcctcgg attccattgc ccagctatct gtcacttcat      480
   caaaaggaca gtagaaaagg aaggtggcac ctacaaatgc catcattgcg ataaaggaaa      540
45  ggctatcgtt caagatgcct ctgccgacag tgggtccaaa gatggacccc cacccacgag      600
   gagcatcgtg gaaaaagaag acgttccaac cacgtcttca aagcaagtgg attgatgtga      660
50  tatctccact gacgtaaggg atgacgcaca atcccactat ccttcgcaag acccttcctc      720
   tatataagga agttcatttc atttggagag gacacgctga aatcaccagt ctctctctac      780
   aaatctatct ctggcgcgcc atatcaatgc ttcttcaggc ctttcttttt cttcttgctg      840
55  gttttgctgc caagatcagc gcctctatga cgaacgaaac ctcggataga ccacttgctc      900
   actttacacc aaacaagggc tggatgaatg accccaatgg actgtggtac gacgaaaaag      960
60  atgccaagtg gcatctgtac tttcaataca acccgaacga tactgtcttg gggacgcat      1020
   tgttttgggg ccacgccacg tccgacgacc tgaccaattg ggaggaccaa ccaatagcta      1080

```

ES 2 909 143 T3

	tcgctccgaa gaggaacgac tccggagcat tctcgggttc catggtgggtt gactacaaca	1140
	atacttccgg ctttttcaac gataaccattg acccgagaca acgctgcgtg gccatatgga	1200
5	cttacaacac accggagtcc gaggagcagt acatctcgta tagcctggac ggtggataca	1260
	cttttacaga gtatcagaag aaccctgtgc ttgctgcaaa ttcgactcag ttccgagatc	1320
10	cgaaggtctt ttggtacgag ccctcgcaga agtggatcat gacagcggca aagtcacagg	1380
	actacaagat cgaaatttac tcgtctgacg accttaaadc ctggaagctc gaatcccgct	1440
	tcgcaaacga gggctttctc ggctaccaat acgaatgcc aggcctgata gaggtcccaa	1500
15	cagagcaaga tcccagcaag tcctactggg tgatgtttat ttccattaat ccaggagcac	1560
	cggcaggagg ttcttttaac cagtacttcg tcggaagctt taacggaact catttcgagg	1620
20	catttgataa ccaatcaaga gtagtgtgatt ttggaaagga ctactatgcc ctgcagactt	1680
	tcttcaatac tgaccgacc tatgggagcg ctcttggcat tgcgtgggct tctaactggg	1740
	agtattccgc attcgttctt acaaaccctt ggaggtctc catgtcgtc gtgaggaaat	1800
25	tctctctcaa cactgagtac caggccaacc cggaaaccga actcataaac ctgaaagccg	1860
	aaccgatcct gaacattagc aacgctggcc cctggagccg gtttgcaacc aacaccacgt	1920
30	tgacgaaagc caacagctac aacgtcgtac tttcgaatag caccggtaca cttgaatttg	1980
	aactggtgta tgccgtcaat accacccaaa cgatctcgaa gtcggtgttc gcgacctct	2040
	ccctctggtt taaaggcctg gaagaccccg aggagtacct cagaatgggt ttcgaggttt	2100
35	ctgcgtctc cttcttcctt gatcgcggga acagcaaagt aaaatttgtt aaggagaacc	2160
	catattttac caacaggatg agcgttaaca accaaccatt caagagcga aacgacctgt	2220
40	cgtactacaa agtgtatggt ttgcttgatc aaaatatcct ggaactctac ttcaacgatg	2280
	gtgatgtcgt gtccaccaac acatacttca tgacaaccgg gaacgcactg ggctccgtga	2340
	acatgacgac ggggtgtgat aacctgttct acatcgacaa attccaggtg agggaagtca	2400
45	agtgagatct gtcgatcgac aagctcgagt ttctccataa taatgtgtga gtagttccca	2460
	gataagggaa ttagggttcc tatagggttt cgctcatgtg ttgagcatat aagaaacct	2520
50	tagtatgtat ttgtatttgt aaaatacttc tatcaataaa atttctaatt cctaaaacca	2580
	aaatccagta ctaaaatcca gatccccga attaa	2615

55 <210> 9
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Desconocido

60 <220>
 <223> cebador

<400> 9

ES 2 909 143 T3

	tgttgaagaa tgagccggcg ac	22
5	<210> 10 <211> 20 <212> ADN <213> Desconocido	
10	<220> <223> cebador	
	<400> 10 cagtgagcta ttacgcactc	20
15	<210> 11 <211> 541 <212> ADN <213> Prototheca kruegani	
20	<400> 11 tgttgaagaa tgagccggcg agttaaaaag agtggcatgg ttaaagaaaa tactctggag	60
25	ccatagcgaa agcaagtta gtaagcttag gtcattcttt ttagaccoga aaccgagtga	120
	tctacccatg atcagggatga agtgtagta aaataacatg gaggcccgaa cgcactaatg	180
	ttgaaaaatt agcggatgaa ttgtgggtag gggcgaaaaa ccaatcgaa tcggagttag	240
30	ctggttctcc cggaaatgog tttaggogca gcagtagcag tacaataga ggggtaaagc	300
	actgtttctt ttgtgggctt cgaaagtgt acctcaaagt ggcaaactct gaatactcta	360
35	tttagatata tacttagtgag accttggggg ataagctcct tgggtcaaaag ggaaacagcc	420
	cagatcacca gttaaggccc caaaatgaaa atgatagtga ctaaggatgt gggtagtca	480
	aaacctccag caggttagct tagaagcagc aatcctttca agagtgcgta atagctcact	540
40	g	541
45	<210> 12 <211> 573 <212> ADN <213> Prototheca wickerhamii	
50	<400> 12 tgttgaagaa tgagccggcg acttaaaata aatggcaggc taagagattt aataactoga	60
	aacctaagcg aaagcaagtc ttaatagggc gtcaatttaa caaaacttta aataaattat	120
	aaagtcattt attttagacc cgaacctgag tgatctaacc atggtcagga tgaaacttgg	180
55	gtgacaccaa gtggaagtcc gaaccgaccg atgttgaaaa atcggcggat gaactgtggt	240
	tagtggtgaa ataccagtcg aactcagagc tagctggttc tccccgaaat gcggtgaggg	300
	gcagcaatat atctcgtcta tctaggggta aagcactggt tcgggtgcggg ctatgaaaat	360
60	ggtaccaaact cgtggcaaac tctgaatact agaaatgacg atatattagt gagactatgg	420

ES 2 909 143 T3

	gggataagct ccatagtcga gagggaaaca gcccagacca ccagttaagg ccccaaatg	480
	ataatgaagt ggtaaaggag gtgaaaatgc aaatacaacc aggaggttg cttagaagca	540
5	gccatccttt aaagagtgcg taatagctca ctg	573
10	<210> 13 <211> 541 <212> ADN <213> Prototheca stagnora	
15	<400> 13 tgttgaagaa tgagccggcg agttaaaaaa aatggcatgg ttaaagatat ttctctgaag	60
	ccatagcgaa agcaagtttt acaagctata gtcatttttt ttagaccoga aaccgagtga	120
	tctacccatg atcagggtga agtggtggtc aaataacatg gaggcccgaa ccgactaatg	180
20	gtgaaaaatt agcggatgaa ttgtgggtag gggcgaaaaa ccaatcgaa tcggagttag	240
	ctggttctcc ccgaaatgcg tttaggcgca gcagtagcaa cacaaataga ggggtaaagc	300
25	actgtttctt ttgtgggctt cgaaagttgt acctcaaagt ggcaaactct gaatactcta	360
	tttagatadc tactagttag acctggggg ataagctcct tggcmetaag ggaaacagcc	420
	cagatcacca gtttaaggccc caaaatgaaa atgatagtga ctaaggacgt gagtatgtca	480
30	aaacctccag caggtttagct tagaagcagc aatcctttca agagtgcgta atagctcact	540
	g	541
35	<210> 14 <211> 541 <212> ADN <213> Prototheca moriformis	
40	<400> 14 tgttgaagaa tgagccggcg agttaaaaag agtggcatgg ttaaagataa ttctctggag	60
	ccatagcgaa agcaagttta acaagctaaa gtcacccttt ttagaccoga aaccgagtga	120
45	tctacccatg atcagggtga agtggtggta aaataacatg gaggcccgaa ccgactaatg	180
	gtgaaaaatt agcggatgaa ttgtgggtag gggcgaaaaa ccaatcgaa tcggagttag	240
50	ctggttctcc ccgaaatgcg tttaggcgca gcagtagcaa cacaaataga ggggtaaagc	300
	actgtttctt ttgtgggctt cgaaagttgt acctcaaagt ggcaaactct gaatactcta	360
	tttagatadc tactagttag acctggggg ataagctcct tggcmetaag ggaaacagcc	420
55	cagatcacca gtttaaggccc caaaatgaaa atgatagtga ctaaggatgt gggtatgtta	480
	aaacctccag caggtttagct tagaagcagc aatcctttca agagtgcgta atagctcact	540
60	g	541
	<210> 15	

ES 2 909 143 T3

<211> 573
 <212> ADN
 <213> Prototheca moriformis

5 <400> 15
 tgttgaagaa tgagccggcg acttaaaata aatggcaggc taagagaatt aataactoga 60
 aacctaagcg aaagcaagtc ttaatagggc gctaatttaa caaacatta aataaaatct 120
 10 aaagtcattt attttagacc cgaacctgag tgatctaacc atggtcagga tgaaacttgg 180
 gtgacaccaa gtggaagtcc gaaccgaccg atggtgaaaa atcggcggat gaactgtggt 240
 tagtggtgaa ataccagtgc aactcagagc tagctggttc tccccgaaat gcgttgaggc 300
 15 gcagcaatat atctcgtcta tctaggggta aagcactggt tcggtgcggg ctatgaaaat 360
 ggtaccaaat cgtggcaaac tctgaatact agaaatgacg atatattagt gagactatgg 420
 20 gggataagct ccatagtcga gagggaaaca gccagacca ccagttaagg ccccaaatg 480
 ataatgaagt ggtaaaggag gtgaaaatgc aaatacaacc aggaggttgg cttagaagca 540
 gccatccttt aaagagtgcg taatagctca ctg 573
 25

<210> 16
 <211> 573
 <212> ADN
 30 <213> Prototheca wickerhamii

<400> 16
 tgttgaagaa tgagccgtcg acttaaaata aatggcaggc taagagaatt aataactoga 60
 35 aacctaagcg aaagcaagtc ttaatagggc gctaatttaa caaacatta aataaaatct 120
 aaagtcattt attttagacc cgaacctgag tgatctaacc atggtcagga tgaaacttgg 180
 gtgacaccaa gtggaagtcc gaaccgaccg atggtgaaaa atcggcggat gaactgtggt 240
 40 tagtggtgaa ataccagtgc aactcagagc tagctggttc tccccgaaat gcgttgaggc 300
 gcagcaatat atctcgtcta tctaggggta aagcactggt tcggtgcggg ctatgaaaat 360
 45 ggtaccaaat cgtggcaaac tctgaatact agaaatgacg atatattagt gagactatgg 420
 gggataagct ccatagtcga gagggaaaca gccagacca ccagttaagg ccccaaatg 480
 ataatgaagt ggtaaaggag gtgaaaatgc aaatacaacc aggaggttgg cttagaagca 540
 50 gccatccttt aaagagtgcg taatagctca ctg 573

55 <210> 17
 <211> 541
 <212> ADN
 <213> Prototheca moriformis

<400> 17
 60 tgttgaagaa tgagccggcg agttaaaaag agtggcgtgg ttaaagaaaa ttctctggaa 60
 ccatagcgaa agcaagtta acaagcttaa gtcacttttt ttagaccgga aaccgagtga 120

ES 2 909 143 T3

	tctacccatg atcagggatga agtgttggtg aaataacatg gagggccgaa ccgactaatg	180
5	gtgaaaaatt agcggatgaa ttgtgggtag gggcgaaaaa ccaatcgaa tcggagttag	240
	ctggttctcc ccgaaatgcg tttaggcgca gcagtagcaa cacaaataga ggggtaaagc	300
	actgtttctt ttgtgggctc cgaaagtgtg acctcaaagt ggcaaactct gaatactcta	360
10	tttagatata tactagtgag acctggggg ataagctcct tggtcgaaag ggaaacagcc	420
	cagatcacca gttaaggccc caaaatgaaa atgatagtga ctaaggatgt gagtatgtca	480
15	aaacctccag caggttagct tagaagcagc aatcctttca agagtgcgta atagctcact	540
	g	541
20	<210> 18 <211> 541 <212> ADN <213> Prototheca zopfii	
25	<400> 18 tgttgaagaa tgagccggcg agttaaaaag agtggcatgg ttaaagaaaa ttctctggag	60
	ccatagcgaa agcaagtta acaagcttaa gtcacttttt ttagaccoga aaccgagtga	120
30	tctacccatg atcagggatga agtgttggtg aaataacatg gagggccgaa ccgactaatg	180
	gtgaaaaatt agcggatgaa ttgtgggtag gggcgaaaaa ccaatcgaa tcggagttag	240
	ctggttctcc ccgaaatgcg tttaggcgca gcagtagcaa cacaaataga ggggtaaagc	300
35	actgtttctt tcgtgggctt cgaaagtgtg acctcaaagt ggcaaactct gaatactcta	360
	tttagatata tactagtgag acctggggg ataagctcct tggtcgaaag ggaaacagcc	420
40	cagatcacca gttaaggccc caaaatgaaa atgatagtga ctaaggatgt gagtatgtca	480
	aaacctccag caggttagct tagaagcagc aatcctttca agagtgcgta atagctcact	540
	g	541
45	<210> 19 <211> 565 <212> ADN <213> Prototheca moriformis	
50	<400> 19 tgttgaagaa tgagccggcg acttagaaaa ggtggcatgg ttaaggaaat attccgaagc	60
55	cgtagcaaaa gcgagtctga atagggcgat aaaatatatt aatatttaga atctagtcat	120
	tttttctaga cccgaaccog ggtgatctaa ccatgaccag gatgaagctt gggtgatacc	180
	aagtgaaggt ccgaaccgac cgatgttgaa aaatcggcgg atgagttgtg gttagcgggtg	240
60	aaataccagt cgaaccggga gctagctggt tctccccgaa atgcggtgag ggcgagcagt	300
	acatctagtc tatctagggg taaagcactg tttcgggtgc ggctgtgaga acggtaccaa	360

ES 2 909 143 T3

atcgtggcaa actctgaata ctagaatga cgatgtagta gtgagactgt gggggataag 420
 5 ctccattgtc aagagggaaa cagcccagac caccagctaa ggccccaaaa tggtaatgta 480
 gtgacaaaag aggtgaaaat gcaaatacaa ccaggagggtt ggcttagaag cagccatcct 540
 ttaaagagtg cgtaatagct cactg 565

10 <210> 20
 <211> 550
 <212> PRT
 <213> Chicorium intybus

15 <400> 20

Met Ser Asn Ser Ser Asn Ala Ser Glu Ser Leu Phe Pro Ala Thr Ser
 1 5 10 15

20 Glu Gln Pro Tyr Arg Thr Ala Phe His Phe Gln Pro Pro Gln Asn Trp
 20 25 30

25 Met Asn Asp Pro Asn Gly Pro Met Cys Tyr Asn Gly Val Tyr His Leu
 35 40 45

30 Phe Tyr Gln Tyr Asn Pro Phe Gly Pro Leu Trp Asn Leu Arg Met Tyr
 50 55 60

35 Trp Ala His Ser Val Ser His Asp Leu Ile Asn Trp Ile His Leu Asp
 65 70 75 80

40 Leu Ala Phe Ala Pro Thr Glu Pro Phe Asp Ile Asn Gly Cys Leu Ser
 85 90 95

45 Gly Ser Ala Thr Val Leu Pro Gly Asn Lys Pro Ile Met Leu Tyr Thr
 100 105 110

50 Asp Leu Ser Asp Pro Tyr Leu Arg Glu Trp Val Lys His Thr Gly Asn
 130 135 140

55 Pro Ile Ile Ser Leu Pro Glu Glu Ile Gln Pro Asp Asp Phe Arg Asp
 145 150 155 160

60 Pro Thr Thr Thr Trp Leu Glu Glu Asp Gly Thr Trp Arg Leu Leu Val
 165 170 175

Gly Ser Gln Lys Asp Lys Thr Gly Ile Ala Phe Leu Tyr His Ser Gly

ES 2 909 143 T3

	180	185	190
5	Asp Phe Val Asn Trp Thr Lys Ser Asp Ser Pro Leu His Lys Val Ser 195 200 205		
10	Gly Thr Gly Met Trp Glu Cys Val Asp Phe Phe Pro Val Trp Val Asp 210 215 220		
15	Ser Thr Asn Gly Val Asp Thr Ser Ile Ile Asn Pro Ser Asn Arg Val 225 230 235 240		
20	Lys His Val Leu Lys Leu Gly Ile Gln Asp His Gly Lys Asp Cys Tyr 245 250 255		
25	Leu Ile Gly Lys Tyr Ser Ala Asp Lys Glu Asn Tyr Val Pro Glu Asp 260 265 270		
30	Glu Leu Thr Leu Ser Thr Leu Arg Leu Asp Tyr Gly Met Tyr Tyr Ala 275 280 285		
35	Ser Lys Ser Phe Phe Asp Pro Val Lys Asn Arg Arg Ile Met Thr Ala 290 295 300		
40	Trp Val Asn Glu Ser Asp Ser Glu Ala Asp Val Ile Ala Arg Gly Trp 305 310 315 320		
45	Ser Gly Val Gln Ser Phe Pro Arg Ser Leu Trp Leu Asp Lys Asn Gln 325 330 335		
50	Lys Gln Leu Leu Gln Trp Pro Ile Glu Glu Ile Glu Met Leu His Gln 340 345 350		
55	Asn Glu Val Ser Phe His Asn Lys Lys Leu Asp Gly Gly Ser Ser Leu 355 360 365		
60	Glu Val Leu Gly Ile Thr Ala Ser Gln Ala Asp Val Lys Ile Ser Phe 370 375 380		
65	Lys Leu Ala Asn Leu Glu Glu Ala Glu Glu Leu Asp Pro Ser Trp Val 385 390 395 400		
70	Asp Pro Gln Leu Ile Cys Ser Glu Asn Asp Ala Ser Lys Lys Gly Lys 405 410 415		
75	Phe Gly Pro Phe Gly Leu Leu Ala Leu Ala Ser Ser Asp Leu Arg Glu 420 425 430		

ES 2 909 143 T3

Gln Thr Ala Ile Phe Phe Arg Val Phe Arg Lys Asn Gly Arg Tyr Val
 435 440 445
 5
 Val Leu Met Cys Ser Asp Gln Ser Arg Ser Ser Met Lys Asn Gly Ile
 450 455 460
 10
 Glu Lys Arg Thr Tyr Gly Ala Phe Val Asp Ile Asp Pro Gln Gln Asp
 465 470 475 480
 15
 Glu Ile Ser Leu Arg Thr Leu Ile Asp His Ser Ile Val Glu Ser Phe
 485 490 495
 20
 Gly Gly Arg Gly Lys Thr Cys Ile Thr Thr Arg Val Tyr Pro Thr Leu
 500 505 510
 25
 Ala Ile Gly Glu Gln Ala Arg Leu Phe Ala Phe Asn His Gly Thr Glu
 515 520 525
 30
 Ser Val Glu Ile Ser Glu Leu Ser Ala Trp Ser Met Lys Lys Ala Gln
 530 535 540
 35
 Met Lys Val Glu Glu Pro
 545 550
 <210> 21
 <211> 581
 <212> PRT
 <213> Schizosaccharomyces pombe
 <400> 21
 40
 Met Phe Leu Lys Tyr Ile Leu Ala Ser Gly Ile Cys Leu Val Ser Leu
 1 5 10 15
 45
 Leu Ser Ser Thr Asn Ala Ala Pro Arg His Leu Tyr Val Lys Arg Tyr
 20 25 30
 50
 Pro Val Ile Tyr Asn Ala Ser Asn Ile Thr Glu Val Ser Asn Ser Thr
 35 40 45
 55
 Thr Val Pro Pro Pro Pro Phe Val Asn Thr Thr Ala Pro Asn Gly Thr
 50 55 60
 60
 Cys Leu Gly Asn Tyr Asn Glu Tyr Leu Pro Ser Gly Tyr Tyr Asn Ala
 65 70 75 80
 60
 Thr Asp Arg Pro Lys Ile His Phe Thr Pro Ser Ser Gly Phe Met Asn
 85 90 95

ES 2 909 143 T3

5 Asp Pro Asn Gly Leu Val Tyr Thr Gly Gly Val Tyr His Met Phe Phe
 100 105 110
 10 Gln Tyr Ser Pro Lys Thr Leu Thr Ala Gly Glu Val His Trp Gly His
 115 120 125
 15 Thr Val Ser Lys Asp Leu Ile His Trp Glu Asn Tyr Pro Ile Ala Ile
 130 135 140
 20 Ser Ala Val Val Asp Val His Asn Ser Ser Gly Leu Phe Ser Asn Asp
 165 170 175
 25 Thr Ile Pro Glu Glu Arg Ile Val Leu Ile Tyr Thr Asp His Trp Thr
 180 185 190
 30 Gly Val Ala Glu Arg Gln Ala Ile Ala Tyr Thr Thr Asp Gly Gly Tyr
 195 200 205
 35 Thr Phe Lys Lys Tyr Ser Gly Asn Pro Val Leu Asp Ile Asn Ser Leu
 210 215 220
 40 Gln Phe Arg Asp Pro Lys Val Ile Trp Asp Phe Asp Ala Asn Arg Trp
 225 230 235 240
 45 Val Met Ile Val Ala Met Ser Gln Asn Tyr Gly Ile Ala Phe Tyr Ser
 245 250 255
 50 Ser Tyr Asp Leu Ile His Trp Thr Glu Leu Ser Val Phe Ser Thr Ser
 260 265 270
 55 Gly Tyr Leu Gly Leu Gln Tyr Glu Cys Pro Gly Met Ala Arg Val Pro
 275 280 285
 60 Val Glu Gly Thr Asp Glu Tyr Lys Trp Val Leu Phe Ile Ser Ile Asn
 290 295 300
 65 Pro Gly Ala Pro Leu Gly Gly Ser Val Val Gln Tyr Phe Val Gly Asp
 305 310 315 320
 70 Trp Asn Gly Thr Asn Phe Val Pro Asp Asp Gly Gln Thr Arg Phe Val
 325 330 335

ES 2 909 143 T3

Asp Leu Gly Lys Asp Phe Tyr Ala Ser Ala Leu Tyr His Ser Ser Ser
340 345 350

5 Ala Asn Ala Asp Val Ile Gly Val Gly Trp Ala Ser Asn Trp Gln Tyr
355 360 365

10 Thr Asn Gln Ala Pro Thr Gln Val Phe Arg Ser Ala Met Thr Val Ala
370 375 380

15 Arg Lys Phe Thr Leu Arg Asp Val Pro Gln Asn Pro Met Thr Asn Leu
385 390 395 400

20 Thr Ser Leu Ile Gln Thr Pro Leu Asn Val Ser Leu Leu Arg Asp Glu
405 410 415

25 Thr Leu Phe Thr Ala Pro Val Ile Asn Ser Ser Ser Ser Leu Ser Gly
420 425 430

30 Ser Pro Ile Thr Leu Pro Ser Asn Thr Ala Phe Glu Phe Asn Val Thr
435 440 445

35 Leu Ser Ile Asn Tyr Thr Glu Gly Cys Thr Thr Gly Tyr Cys Leu Gly
450 455 460

40 Arg Ile Ile Ile Asp Ser Asp Asp Pro Tyr Arg Leu Gln Ser Ile Ser
465 470 475 480

45 Val Asp Val Asp Phe Ala Ala Ser Thr Leu Val Ile Asn Arg Ala Lys
485 490 495

50 Ala Gln Met Gly Trp Phe Asn Ser Leu Phe Thr Pro Ser Phe Ala Asn
500 505 510

55 Asp Ile Tyr Ile Tyr Gly Asn Val Thr Leu Tyr Gly Ile Val Asp Asn
515 520 525

60 Gly Leu Leu Glu Leu Tyr Val Asn Asn Gly Glu Lys Thr Tyr Thr Asn
530 535 540

65 Asp Phe Phe Phe Leu Gln Gly Ala Thr Pro Gly Gln Ile Ser Phe Ala
545 550 555 560

70 Ala Phe Gln Gly Val Ser Phe Asn Asn Val Thr Val Thr Pro Leu Lys
565 570 575

75 Thr Ile Trp Asn Cys
580

ES 2 909 143 T3

<210> 22
 <211> 550
 5 <212> PRT
 <213> Pichia anomala

 <400> 22
 10 Met Ile Gln Leu Ser Pro Leu Leu Leu Leu Pro Leu Phe Ser Val Phe
 1 5 10 15

 15 Asn Ser Ile Ala Asp Ala Ser Thr Glu Tyr Leu Arg Pro Gln Ile His
 20 25 30

 20 Leu Thr Pro Asp Gln Gly Trp Met Asn Asp Pro Asn Gly Met Phe Tyr
 35 40 45

 25 Asp Arg Lys Asp Lys Leu Trp His Val Tyr Phe Gln His Asn Pro Asp
 50 55 60

 30 Lys Lys Ser Ile Trp Ala Thr Pro Val Thr Trp Gly His Ser Thr Ser
 65 70 75 80

 35 Lys Asp Leu Leu Thr Trp Asp Tyr His Gly Asn Ala Leu Glu Pro Glu
 85 90 95

 40 Asn Asp Asp Glu Gly Ile Phe Ser Gly Ser Val Val Val Asp Arg Asn
 100 105 110

 45 Asn Thr Ser Gly Phe Phe Asn Asp Ser Thr Asp Pro Glu Gln Arg Ile
 115 120 125

 50 Val Ala Ile Tyr Thr Asn Asn Ala Gln Leu Gln Thr Gln Glu Ile Ala
 130 135 140

 55 Tyr Ser Leu Asp Lys Gly Tyr Ser Phe Ile Lys Tyr Asp Gln Asn Pro
 145 150 155 160

 60 Val Ile Asn Val Asn Ser Ser Gln Gln Arg Asp Pro Lys Val Leu Trp
 165 170 175

 65 His Asp Glu Ser Asn Gln Trp Ile Met Val Val Ala Lys Thr Gln Glu
 180 185 190

 70 Phe Lys Val Gln Ile Tyr Gly Ser Pro Asp Leu Lys Lys Trp Asp Leu
 195 200 205

 75 Lys Ser Asn Phe Thr Ser Asn Gly Tyr Leu Gly Phe Gln Tyr Glu Cys

ES 2 909 143 T3

	210		215		220														
5	Pro 225	Gly	Leu	Phe	Lys	Leu 230	Pro	Ile	Glu	Asn	Pro 235	Leu	Asn	Asp	Thr	Val 240			
10	Thr	Ser	Lys	Trp	Val 245	Leu	Leu	Leu	Ala	Ile 250	Asn	Pro	Gly	Ser	Pro 255	Leu			
15	Gly	Gly	Ser	Ile 260	Asn	Glu	Tyr	Phe	Ile 265	Gly	Asp	Phe	Asp	Gly 270	Thr	Thr			
20	Phe	His	Pro 275	Asp	Asp	Gly	Ala	Thr 280	Arg	Phe	Met	Asp	Ile 285	Gly	Lys	Asp			
25	Phe	Tyr 290	Ala	Phe	Gln	Ser	Phe 295	Asp	Asn	Thr	Glu	Pro 300	Glu	Asp	Gly	Ala			
30	Leu	Gly	Leu	Ala	Trp	Ala 310	Ser	Asn	Trp	Gln	Tyr 315	Ala	Asn	Thr	Val	Pro 320			
35	Thr	Glu	Asn	Trp	Arg 325	Ser	Ser	Met	Ser	Leu 330	Val	Arg	Asn	Tyr	Thr 335	Leu			
40	Lys	Tyr	Val	Asp 340	Val	Asn	Pro	Glu	Asn 345	Tyr	Gly	Leu	Thr	Leu 350	Ile	Gln			
45	Lys	Pro	Val 355	Tyr	Asp	Thr	Lys	Glu 360	Thr	Arg	Leu	Asn	Glu 365	Thr	Leu	Lys			
50	Thr	Leu	Glu	Thr	Ile	Asn 375	Glu	Tyr	Glu	Val	Asn	Asp 380	Leu	Lys	Leu	Asp			
55	Lys	Ser	Ser	Phe	Val	Ala 390	Thr	Asp	Phe	Asn	Thr 395	Glu	Arg	Asn	Ala	Thr 400			
60	Gly	Val	Phe	Glu	Phe 405	Asp	Leu	Lys	Phe	Thr 410	Gln	Thr	Asp	Leu	Lys	Met 415			
65	Gly	Tyr	Ser	Asn 420	Met	Thr	Thr	Gln	Phe	Gly 425	Leu	Tyr	Ile	His 430	Ser	Gln			
70	Thr	Val	Lys 435	Gly	Ser	Gln	Glu	Thr 440	Leu	Gln	Leu	Val	Phe 445	Asp	Thr	Leu			
75	Ser	Thr	Thr	Trp	Tyr	Ile	Asp 455	Arg	Thr	Thr	Gln	His 460	Ser	Phe	Gln	Arg			

ES 2 909 143 T3

Asn Ser Pro Val Phe Thr Glu Arg Ile Ser Thr Tyr Val Glu Lys Ile
 465 470 475 480

5

Asp Thr Thr Asp Gln Gly Asn Val Tyr Thr Leu Tyr Gly Val Val Asp
 485 490 495

10

Arg Asn Ile Leu Glu Leu Tyr Phe Asn Asp Gly Ser Ile Ala Met Thr
 500 505 510

15

Asn Thr Phe Phe Phe Arg Glu Gly Lys Ile Pro Thr Ser Phe Glu Val
 515 520 525

20

Val Cys Asp Ser Glu Lys Ser Phe Ile Thr Ile Asp Glu Leu Ser Val
 530 535 540

25

Arg Glu Leu Ala Arg Lys
 545 550

30

<210> 23
 <211> 533
 <212> PRT
 <213> Debaryomyces occidentalis
 <400> 23

35

Met Val Gln Val Leu Ser Val Leu Val Ile Pro Leu Leu Thr Leu Phe
 1 5 10 15

40

Phe Gly Tyr Val Ala Ser Ser Ser Ile Asp Leu Ser Val Asp Thr Ser
 20 25 30

45

Glu Tyr Asn Arg Pro Leu Ile His Phe Thr Pro Glu Lys Gly Trp Met
 35 40 45

50

Asn Asp Pro Asn Gly Leu Phe Tyr Asp Lys Thr Ala Lys Leu Trp His
 50 55 60

55

Leu Tyr Phe Gln Tyr Asn Pro Asn Ala Thr Ala Trp Gly Gln Pro Leu
 65 70 75 80

60

Tyr Trp Gly His Ala Thr Ser Asn Asp Leu Val His Trp Asp Glu His
 85 90 95

65

Glu Ile Ala Ile Gly Pro Glu His Asp Asn Glu Gly Ile Phe Ser Gly
 100 105 110

70

Ser Ile Val Val Asp His Asn Asn Thr Ser Gly Phe Phe Asn Ser Ser
 115 120 125

ES 2 909 143 T3

5 Ile Asp Pro Asn Gln Arg Ile Val Ala Ile Tyr Thr Asn Asn Ile Pro
 130 135 140

10 Asp Leu Gln Thr Gln Asp Ile Ala Phe Ser Leu Asp Gly Gly Tyr Thr
 145 150 155 160

15 Phe Thr Lys Tyr Glu Asn Asn Pro Val Ile Asp Val Ser Ser Asn Gln
 165 170 175

20 His Gly Cys Ser Glu Ile Ala Arg Val Lys Ile Gln Ile Phe Gly Ser
 195 200 205

25 Ala Asn Leu Lys Asn Trp Val Leu Asn Ser Asn Phe Ser Ser Gly Tyr
 210 215 220

30 Tyr Gly Asn Gln Tyr Gly Met Ser Arg Leu Ile Glu Val Pro Ile Glu
 225 230 235 240

35 Asn Ser Asp Lys Ser Lys Trp Val Met Phe Leu Ala Ile Asn Pro Gly
 245 250 255

40 Ser Pro Leu Gly Gly Ser Ile Asn Gln Tyr Phe Val Gly Asp Phe Asp
 260 265 270

45 Gly Phe Gln Phe Val Pro Asp Asp Ser Gln Thr Arg Phe Val Asp Ile
 275 280 285

50 Gly Lys Asp Phe Tyr Ala Phe Gln Thr Phe Ser Glu Val Glu His Gly
 290 295 300

55 Val Leu Gly Leu Ala Trp Ala Ser Asn Trp Gln Tyr Ala Asp Gln Val
 305 310 315 320

60 Pro Thr Asn Pro Trp Arg Ser Ser Thr Ser Leu Ala Arg Asn Tyr Thr
 325 330 335

65 Leu Arg Tyr Val Ile Gln Met Leu Lys Leu Thr Ala Asn Ile Asp Lys
 340 345 350

70 Ser Val Leu Pro Asp Ser Ile Asn Val Val Asp Lys Leu Lys Lys Lys
 355 360 365

ES 2 909 143 T3

Asn Val Lys Leu Thr Asn Lys Lys Pro Ile Lys Thr Asn Phe Lys Gly
 370 375 380

5 Ser Thr Gly Leu Phe Asp Phe Asn Ile Thr Phe Lys Val Leu Asn Leu
 385 390 395 400

10 Asn Val Ser Pro Gly Lys Thr His Phe Asp Ile Leu Ile Asn Ser Gln
 405 410 415

15 Glu Leu Asn Ser Ser Val Asp Ser Ile Lys Ile Gly Phe Asp Ser Ser
 420 425 430

20 Gln Ser Leu Phe Tyr Ile Asp Arg His Ile Pro Asn Val Glu Phe Pro
 435 440 445

Arg Lys Gln Phe Phe Thr Asp Lys Leu Ala Ala Tyr Leu Glu Pro Leu
 450 455 460

25 Asp Tyr Asp Gln Asp Leu Arg Val Phe Ser Leu Tyr Gly Ile Val Asp
 465 470 475 480

30 Lys Asn Ile Ile Glu Leu Tyr Phe Asn Asp Gly Thr Val Ala Met Thr
 485 490 495

35 Asn Thr Phe Phe Met Gly Glu Gly Lys Tyr Pro His Asp Ile Gln Ile
 500 505 510

Val Thr Asp Thr Glu Glu Pro Leu Phe Glu Leu Glu Ser Val Ile Ile
 515 520 525

40 Arg Glu Leu Asn Lys
 530

45 <210> 24
 <211> 654
 <212> PRT
 <213> Oryza sativa

50 <400> 24

Met Ala Thr Ser Arg Leu Thr Pro Ala Tyr Asp Leu Lys Asn Ala Ala
 1 5 10 15

55 Ala Ala Val Tyr Thr Pro Leu Pro Glu Gln Pro His Ser Ala Glu Val
 20 25 30

60 Glu Ile Arg Asp Arg Lys Pro Phe Lys Ile Ile Ser Ala Ile Ile Leu
 35 40 45

ES 2 909 143 T3

Ser Ser Leu Leu Leu Leu Ala Leu Ile Leu Val Ala Val Asn Tyr Gln
 50 55 60
 5
 Ala Pro Pro Ser His Ser Ser Gly Asp Asn Ser Gln Pro Ala Ala Val
 65 70 75 80
 10 Met Pro Pro Ser Arg Gly Val Ser Gln Gly Val Ser Glu Lys Ala Phe
 85 90 95
 15 Arg Gly Ala Ser Gly Ala Gly Asn Gly Val Ser Phe Ala Trp Ser Asn
 100 105 110
 20 Leu Met Leu Ser Trp Gln Arg Thr Ser Tyr His Phe Gln Pro Val Lys
 115 120 125
 25 Asn Trp Met Asn Asp Pro Asn Gly Pro Leu Tyr Tyr Lys Gly Trp Tyr
 130 135 140
 30 His Leu Phe Tyr Gln Tyr Asn Pro Asp Ser Ala Val Trp Gly Asn Ile
 145 150 155 160
 35 Thr Trp Gly His Ala Val Ser Thr Asp Leu Ile Asn Trp Leu His Leu
 165 170 175
 40 Pro Phe Ala Met Val Pro Asp Gln Trp Tyr Asp Val Asn Gly Val Trp
 180 185 190
 45 Thr Gly Ser Ala Thr Ile Leu Pro Asp Gly Arg Ile Val Met Leu Tyr
 195 200 205
 50 Thr Gly Asp Thr Asp Asp Tyr Val Gln Asp Gln Asn Leu Ala Phe Pro
 210 215 220
 55 Ala Asn Leu Ser Asp Pro Leu Leu Val Asp Trp Val Lys Tyr Pro Asn
 225 230 235 240
 60 Asn Pro Val Ile Tyr Pro Pro Pro Gly Ile Gly Val Lys Asp Phe Arg
 245 250 255
 65 Asp Pro Thr Thr Ala Gly Thr Ala Gly Met Gln Asn Gly Gln Arg Leu
 260 265 270
 70 Val Thr Ile Gly Ser Lys Val Gly Lys Thr Gly Ile Ser Leu Val Tyr
 275 280 285
 75 Glu Thr Thr Asn Phe Thr Thr Phe Lys Leu Leu Tyr Gly Val Leu His

ES 2 909 143 T3

	290		295		300														
5	Ala 305	Val	Pro	Gly	Thr	Gly 310	Met	Trp	Glu	Cys	Val 315	Asp	Leu	Tyr	Pro	Val 320			
10	Ser	Thr	Thr	Gly	Glu 325	Asn	Gly	Leu	Asp	Thr 330	Ser	Val	Asn	Gly	Leu 335	Gly			
15	Val	Lys	His	Val 340	Leu	Lys	Thr	Ser	Leu 345	Asp	Asp	Asp	Lys	His 350	Asp	Tyr			
20	Tyr	Ala	Leu 355	Gly	Thr	Tyr	Asp	Pro 360	Val	Lys	Asn	Lys	Trp 365	Thr	Pro	Asp			
25	Asn	Pro 370	Asp	Leu	Asp	Val	Gly 375	Ile	Gly	Leu	Arg	Leu 380	Asp	Tyr	Gly	Lys			
30	Tyr 385	Tyr	Ala	Ala	Arg	Thr 390	Phe	Tyr	Asp	Gln	Asn 395	Lys	Gln	Arg	Arg	Ile 400			
35	Leu	Trp	Gly	Trp	Ile 405	Gly	Glu	Thr	Asp	Leu 410	Glu	Ala	Val	Asp	Leu	Met 415			
40	Lys	Gly	Trp	Ala 420	Ser	Leu	Gln	Ala	Ile 425	Pro	Arg	Thr	Ile	Val 430	Phe	Asp			
45	Lys	Lys	Thr 435	Gly	Thr	Asn	Val	Leu 440	Gln	Arg	Pro	Glu	Glu 445	Glu	Val	Glu			
50	Ser	Trp 450	Ser	Ser	Gly	Asp	Pro 455	Ile	Thr	Gln	Arg	Arg 460	Ile	Phe	Glu	Pro			
55	Gly 465	Ser	Val	Val	Pro	Ile 470	His	Val	Ser	Gly	Ala 475	Thr	Gln	Leu	Asp	Ile 480			
60	Thr	Ala	Ser	Phe 485	Glu	Val	Asp	Glu	Thr	Leu 490	Leu	Glu	Thr	Thr	Ser 495	Glu			
65	Ser	His	Asp	Ala 500	Gly	Tyr	Asp	Cys	Ser 505	Asn	Ser	Gly	Gly	Ala 510	Gly	Thr			
70	Arg	Gly	Ser 515	Leu	Gly	Pro	Phe	Gly 520	Leu	Leu	Val	Val	Ala 525	Asp	Glu	Lys			
75	Leu	Ser 530	Glu	Leu	Thr	Pro	Val 535	Tyr	Leu	Tyr	Val	Ala 540	Lys	Gly	Gly	Asp			

ES 2 909 143 T3

Gly Lys Ala Lys Ala His Leu Cys Ala Tyr Gln Thr Arg Ser Ser Met
 545 550 555 560

5

Ala Ser Gly Val Glu Lys Glu Val Tyr Gly Ser Ala Val Pro Val Leu
 565 570 575

10

Asp Gly Glu Asn Tyr Ser Ala Arg Ile Leu Ile Asp His Ser Ile Val
 580 585 590

15

Glu Ser Phe Ala Gln Ala Gly Arg Thr Cys Val Arg Ser Arg Asp Tyr
 595 600 605

20

Pro Thr Lys Asp Ile Tyr Gly Ala Ala Arg Cys Phe Phe Phe Asn Asn
 610 615 620

25

Ala Thr Glu Ala Ser Val Arg Ala Ser Leu Lys Ala Trp Gln Met Lys
 625 630 635 640

30

Ser Phe Ile Arg Pro Tyr Pro Phe Ile Pro Asp Gln Lys Ser
 645 650

35

<210> 25
 <211> 690
 <212> PRT
 <213> Allium cepa

40

Met Ser Ser Asp Asp Leu Glu Ser Pro Pro Ser Ser Tyr Leu Pro Ile
 1 5 10 15

45

Pro Pro Ser Asp Glu Phe His Asp Gln Pro Pro Pro Leu Arg Ser Trp
 20 25 30

50

Leu Arg Leu Leu Ser Ile Pro Leu Ala Leu Met Phe Leu Leu Phe Leu
 35 40 45

55

Ala Thr Phe Leu Ser Asn Leu Glu Ser Pro Pro Ser Asp Ser Gly Leu
 50 55 60

60

Val Ser Asp Pro Val Thr Phe Asp Val Asn Pro Ala Val Val Arg Arg
 65 70 75 80

65

Gly Lys Asp Ala Gly Val Ser Asp Lys Thr Ser Gly Val Asp Ser Gly
 85 90 95

70

Phe Val Leu Asp Pro Val Ala Val Asp Ala Asn Ser Val Val Val His
 100 105 110

ES 2 909 143 T3

5	Arg Gly Lys Asp Ala Gly Val Ser Asp Lys Thr Ser Gly Val Asp Ser 115 120 125
10	Gly Leu Leu Lys Asp Ser Pro Leu Gly Pro Tyr Pro Trp Thr Asn Gln 130 135 140
15	Met Leu Ser Trp Gln Arg Thr Gly Phe His Phe Gln Pro Val Lys Asn 145 150 155 160
20	Trp Met Asn Asp Pro Asn Gly Pro Leu Tyr Tyr Lys Gly Trp Tyr His 165 170 175
25	Phe Phe Tyr Gln Tyr Asn Pro Glu Gly Ala Val Trp Gly Asn Ile Ala 180 185 190
30	Trp Gly His Ala Val Ser Arg Asp Leu Val His Trp Thr His Leu Pro 195 200 205
35	Leu Ala Met Val Pro Asp Gln Trp Tyr Asp Ile Asn Gly Val Trp Thr 210 215 220
40	Gly Ser Ala Thr Ile Leu Pro Asp Gly Gln Ile Val Met Leu Tyr Thr 225 230 235 240
45	Gly Ala Thr Asn Glu Ser Val Gln Val Gln Asn Leu Ala Val Pro Ala 245 250 255
50	Asp Gln Ser Asp Thr Leu Leu Leu Arg Trp Lys Lys Ser Glu Ala Asn 260 265 270
55	Pro Ile Leu Val Pro Pro Pro Gly Ile Gly Asp Lys Asp Phe Arg Asp 275 280 285
60	Pro Thr Thr Ala Trp Tyr Glu Pro Ser Asp Asp Thr Trp Arg Ile Val 290 295 300
65	Ile Gly Ser Lys Asp Ser Ser His Ser Gly Ile Ala Ile Val Tyr Ser 305 310 315 320
70	Thr Lys Asp Phe Ile Asn Tyr Lys Leu Ile Pro Gly Ile Leu His Ala 325 330 335
75	Val Glu Arg Val Gly Met Trp Glu Cys Val Asp Phe Tyr Pro Val Ala 340 345 350

ES 2 909 143 T3

	Thr	Ala	Asp	Ser	Ser	His	Ala	Asn	His	Gly	Leu	Asp	Pro	Ser	Ala	Arg	
			355					360					365				
5	Pro	Ser	Pro	Ala	Val	Lys	His	Val	Leu	Lys	Ala	Ser	Met	Asp	Asp	Asp	
		370					375					380					
10	Arg	His	Asp	Tyr	Tyr	Ala	Ile	Gly	Thr	Tyr	Asp	Pro	Ala	Gln	Asn	Thr	
	385					390					395					400	
15	Trp	Val	Pro	Asp	Asp	Ala	Ser	Val	Asp	Val	Gly	Ile	Gly	Leu	Arg	Tyr	
					405					410					415		
20	Asp	Trp	Gly	Lys	Phe	Tyr	Ala	Ser	Lys	Thr	Phe	Tyr	Asp	His	Ala	Lys	
				420					425					430			
25	Lys	Arg	Arg	Ile	Leu	Trp	Ser	Trp	Ile	Gly	Glu	Thr	Asp	Ser	Glu	Thr	
			435					440						445			
30	Ala	Asp	Ile	Ala	Lys	Gly	Trp	Ala	Ser	Leu	Gln	Gly	Val	Pro	Arg	Thr	
		450					455					460					
35	Val	Leu	Leu	Asp	Val	Lys	Thr	Gly	Ser	Asn	Leu	Ile	Thr	Trp	Pro	Val	
	465					470					475					480	
40	Val	Glu	Ile	Glu	Ser	Leu	Arg	Thr	Arg	Pro	Arg	Asp	Phe	Ser	Gly	Ile	
					485					490					495		
45	Thr	Val	Asp	Ala	Gly	Ser	Thr	Phe	Lys	Leu	Asp	Val	Gly	Gly	Ala	Ala	
				500					505					510			
50	Gln	Leu	Asp	Ile	Glu	Ala	Glu	Phe	Lys	Ile	Ser	Ser	Glu	Glu	Leu	Glu	
			515					520					525				
55	Ala	Val	Lys	Glu	Ala	Asp	Val	Ser	Tyr	Asn	Cys	Ser	Ser	Ser	Gly	Gly	
		530					535					540					
60	Ala	Ala	Glu	Arg	Gly	Val	Leu	Gly	Pro	Phe	Gly	Leu	Leu	Val	Leu	Ala	
	545					550					555					560	
65	Asn	Gln	Asp	Leu	Thr	Glu	Gln	Thr	Ala	Thr	Tyr	Phe	Tyr	Val	Ser	Arg	
					565					570					575		
70	Gly	Met	Asp	Gly	Gly	Leu	Asn	Thr	His	Phe	Cys	Gln	Asp	Glu	Lys	Arg	
				580					585					590			
75	Ser	Ser	Lys	Ala	Ser	Asp	Ile	Val	Lys	Arg	Ile	Val	Gly	His	Ser	Val	
			595					600					605				

ES 2 909 143 T3

5 Pro Val Leu Asp Gly Glu Ser Phe Ala Leu Arg Ile Leu Val Asp His
 610 615 620

10 Ser Ile Val Glu Ser Phe Ala Gln Gly Gly Arg Ala Ser Ala Thr Ser
 625 630 635 640

15 Arg Val Tyr Pro Thr Glu Ala Ile Tyr Asn Asn Ala Arg Val Phe Val
 645 650 655

20 Phe Asn Asn Ala Thr Gly Ala Lys Val Thr Ala Gln Ser Leu Lys Val
 660 665 670

25 Trp His Met Ser Thr Ala Ile Asn Glu Ile Tyr Asp Pro Ala Thr Ser
 675 680 685

Val Met
 690

30 <210> 26
 <211> 501
 <212> PRT
 <213> Beta vulgaris

35 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (382)..(382)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 26

40 Leu Phe Tyr Gln Tyr Asn Pro Asn Gly Val Ile Trp Gly Pro Pro Val
 1 5 10 15

45 Trp Gly His Ser Thr Ser Lys Asp Leu Val Asn Trp Val Pro Gln Pro
 20 25 30

50 Leu Thr Met Glu Pro Glu Met Ala Ala Asn Ile Asn Gly Ser Trp Ser
 35 40 45

55 Gly Ser Ala Thr Ile Leu Pro Gly Asn Lys Pro Ala Ile Leu Phe Thr
 50 55 60

60 Gly Leu Asp Pro Lys Tyr Glu Gln Val Gln Val Leu Ala Tyr Pro Lys
 65 70 75 80

Asp Thr Ser Asp Pro Asn Leu Lys Glu Trp Phe Leu Ala Pro Gln Asn
 85 90 95

ES 2 909 143 T3

Pro Val Met Phe Pro Thr Pro Gln Asn Gln Ile Asn Ala Thr Ser Phe
 100 105 110

5

Arg Asp Pro Thr Thr Ala Trp Arg Leu Pro Asp Gly Val Trp Arg Leu
 115 120 125

10

Leu Ile Gly Ser Lys Arg Gly Gln Arg Gly Leu Ser Leu Leu Phe Arg
 130 135 140

15

Ser Arg Asp Phe Val His Trp Val Gln Ala Lys His Pro Leu Tyr Ser
 145 150 155 160

20

Asp Lys Leu Ser Gly Met Trp Glu Cys Pro Asp Phe Phe Pro Val Tyr
 165 170 175

25

Ala Asn Gly Asp Gln Met Gly Val Asp Thr Ser Ile Ile Gly Ser His
 180 185 190

30

Tyr Thr Ile Gly Asp Tyr Asn Ile Lys Lys Asp Ala Tyr Thr Pro Asp
 210 215 220

35

Ile Gly Tyr Met Asn Asp Ser Ser Leu Arg Tyr Asp Tyr Gly Lys Tyr
 225 230 235 240

40

Tyr Ala Ser Lys Thr Phe Phe Asp Asp Ala Lys Lys Glu Arg Ile Leu
 245 250 255

45

Leu Gly Trp Ala Asn Glu Ser Ser Ser Val Glu Asp Asp Ile Lys Lys
 260 265 270

50

Gly Trp Ser Gly Ile His Thr Ile Pro Arg Lys Ile Trp Leu Asp Lys
 275 280 285

55

Leu Gly Lys Gln Leu Ile Gln Trp Pro Ile Ala Asn Ile Glu Lys Leu
 290 295 300

60

Arg Gln Lys Pro Val Asn Ile Tyr Arg Lys Val Leu Lys Gly Gly Ser
 305 310 315 320

Gln Ile Glu Val Ser Gly Ile Thr Ala Ala Gln Ala Asp Val Glu Ile
 325 330 335

Ser Phe Lys Ile Lys Asp Leu Lys Asn Val Glu Lys Phe Asp Ala Ser

ES 2 909 143 T3

	340	345	350	
5	Trp Thr Ser 355	Pro Gln Leu Leu Cys 360	Ser Lys Lys Gly 365	Ala Ser Val Lys
10	Gly Gly Leu Gly Pro Phe 370	Gly Leu Leu Thr Leu 375	Ala Ser Xaa Gly 380	Leu
15	Glu Glu Tyr Thr Ala Val Phe Phe Arg Ile Phe Lys Ala Tyr Asp Asn 385	390	395	400
20	Lys Phe Val Val Leu Met Cys Ser Asp Gln Ser Arg Ser Ser Leu Asn 405	410	415	
25	Pro Thr Asn Asp Lys Thr Thr Tyr Gly Thr Phe Val Asp Val Asn Pro 420	425	430	
30	Ile Arg Glu Gly Leu Ser Leu Arg Val Leu Ile Asp His Ser Val Val 435	440	445	
35	Glu Ser Phe Gly Ala Lys Gly Lys Asn Val Ile Thr Ala Arg Val Tyr 450	455	460	
40	Pro Thr Leu Ala Ile Asn Glu Lys Ala His Leu Tyr Val Phe Asn Arg 465	470	475	480
45	Gly Thr Ser Asn Val Glu Ile Thr Gly Leu Thr Ala Trp Ser Met Lys 485	490	495	
50	Lys Ala Asn Ile Ala 500			
55	<210> 27 <211> 518 <212> PRT <213> Bifidobacterium breve			
60	<400> 27 Met Thr Asp Phe Thr Pro Glu Thr Pro Val Leu Thr Pro Ile Arg Asp 1	5	10	15
65	His Ala Ala Glu Leu Ala Lys Ala Glu Ala Gly Val Ala Glu Met Ala 20	25	30	
70	Ala Lys Arg Asn Asn Arg Trp Tyr Pro Lys Tyr His Ile Ala Ser Asn 35	40	45	

ES 2 909 143 T3

Gly Gly Trp Ile Asn Asp Pro Asn Gly Leu Cys Phe Tyr Lys Gly Arg
 50 55 60

5 Trp His Val Phe Tyr Gln Leu His Pro Tyr Gly Thr Gln Trp Gly Pro
 65 70 75 80

10 Met His Trp Gly His Val Ser Ser Thr Asp Met Leu Asn Trp Lys Arg
 85 90 95

15 Glu Pro Ile Met Phe Ala Pro Ser Leu Glu Gln Glu Lys Asp Gly Val
 100 105 110

20 Phe Ser Gly Ser Ala Val Ile Asp Asp Asn Gly Asp Leu Arg Phe Tyr
 115 120 125

25 Tyr Thr Gly His Arg Trp Ala Asn Gly His Asp Asn Thr Gly Gly Asp
 130 135 140

30 Ala Thr Lys Gln Gly Met Ile Ile Asp Cys Pro Thr Asp Lys Val Asp
 165 170 175

35 His His Tyr Arg Asp Pro Lys Val Trp Lys Thr Gly Asp Thr Trp Tyr
 180 185 190

40 Met Thr Phe Gly Val Ser Ser Glu Asp Lys Arg Gly Gln Met Trp Leu
 195 200 205

45 Phe Ser Ser Lys Asp Met Val Arg Trp Glu Tyr Glu Arg Val Leu Phe
 210 215 220

50 Gln His Pro Asp Pro Asp Val Phe Met Leu Glu Cys Pro Asp Phe Phe
 225 230 235 240

55 Pro Ile Lys Asp Lys Asp Gly Asn Glu Lys Trp Val Ile Gly Phe Ser
 245 250 255

60 Ala Met Gly Ser Lys Pro Ser Gly Phe Met Asn Arg Asn Val Asn Asn
 260 265 270

Ala Gly Tyr Met Ile Gly Thr Trp Glu Pro Gly Gly Glu Phe Lys Pro
 275 280 285

60 Glu Thr Glu Phe Arg Leu Trp Asp Cys Gly His Asn Tyr Tyr Ala Pro
 290 295 300

ES 2 909 143 T3

5 Gln Ser Phe Asn Val Asp Gly Arg Gln Ile Val Tyr Gly Trp Met Ser
 305 310 315 320
 Pro Phe Val Gln Pro Ile Pro Met Glu Asp Asp Gly Trp Cys Gly Gln
 325 330 335
 10 Leu Thr Leu Pro Arg Glu Ile Thr Leu Asp Asp Asp Gly Asp Val Val
 340 345 350
 15 Thr Ala Pro Val Ala Glu Met Glu Gly Leu Arg Glu Asp Thr Leu Asp
 355 360 365
 20 His Gly Ser Ile Thr Leu Asp Met Asp Gly Glu Gln Val Ile Ala Asp
 370 375 380
 25 Asp Ala Glu Ala Val Glu Ile Glu Met Thr Ile Asp Leu Ala Ala Ser
 385 390 395 400
 30 Thr Ala Asp Arg Ala Gly Leu Lys Ile His Ala Thr Glu Asp Gly Ala
 405 410 415
 Tyr Thr Tyr Val Ala Tyr Asp Asp Gln Ile Gly Arg Val Val Val Asp
 420 425 430
 35 Arg Gln Ala Met Ala Asn Gly Asp His Gly Tyr Arg Ala Ala Pro Leu
 435 440 445
 40 Thr Asp Ala Glu Leu Ala Ser Gly Lys Leu Asp Leu Arg Val Phe Val
 450 455 460
 45 Asp Arg Gly Ser Val Glu Val Tyr Val Asn Gly Gly His Gln Val Leu
 465 470 475 480
 50 Ser Ser Tyr Ser Tyr Ala Ser Glu Gly Pro Arg Ala Ile Lys Leu Val
 485 490 495
 Ala Glu Phe Gly Asn Leu Lys Val Glu Ser Leu Lys Leu His His Met
 500 505 510
 55 Lys Ser Ile Gly Leu Glu
 515
 60 <210> 28
 <211> 532
 <212> PRT
 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

ES 2 909 143 T3

<400> 28

5	Met 1	Leu	Leu	Gln	Ala 5	Phe	Leu	Phe	Leu	Leu 10	Ala	Gly	Phe	Ala	Ala 15	Lys
10	Ile	Ser	Ala	Ser 20	Met	Thr	Asn	Glu	Thr 25	Ser	Asp	Arg	Pro	Leu 30	Val	His
15	Phe	Thr	Pro 35	Asn	Lys	Gly	Trp	Met 40	Asn	Asp	Pro	Asn	Gly 45	Leu	Trp	Tyr
20	Asp 50	Glu	Lys	Asp	Ala	Lys	Trp 55	His	Leu	Tyr	Phe	Gln 60	Tyr	Asn	Pro	Asn
25	Asp 65	Thr	Val	Trp	Gly	Thr 70	Pro	Leu	Phe	Trp	Gly 75	His	Ala	Thr	Ser	Asp 80
30	Asp	Leu	Thr	Asn	Trp 85	Glu	Asp	Gln	Pro	Ile 90	Ala	Ile	Ala	Pro	Lys 95	Arg
35	Asn	Asp	Ser	Gly 100	Ala	Phe	Ser	Gly	Ser 105	Met	Val	Val	Asp	Tyr 110	Asn	Asn
40	Thr	Ser	Gly 115	Phe	Phe	Asn	Asp	Thr 120	Ile	Asp	Pro	Arg	Gln 125	Arg	Cys	Val
45	Ala	Ile	Trp	Thr	Tyr	Asn	Thr 135	Pro	Glu	Ser	Glu	Glu 140	Gln	Tyr	Ile	Ser
50	Tyr 145	Ser	Leu	Asp	Gly	Gly 150	Tyr	Thr	Phe	Thr	Glu 155	Tyr	Gln	Lys	Asn	Pro 160
55	Val	Leu	Ala	Ala	Asn 165	Ser	Thr	Gln	Phe	Arg 170	Asp	Pro	Lys	Val	Phe 175	Trp
60	Tyr	Glu	Pro	Ser	Gln	Lys	Trp	Ile	Met 185	Thr	Ala	Ala	Lys	Ser 190	Gln	Asp
65	Tyr	Lys	Ile	Glu	Ile	Tyr	Ser	Ser	Asp	Asp	Leu	Lys	Ser	Trp 205	Lys	Leu
70	Glu	Ser	Ala	Phe	Ala	Asn	Glu	Gly	Phe	Leu	Gly	Tyr 220	Gln	Tyr	Glu	Cys
75	Pro	Gly	Leu	Ile	Glu	Val	Pro	Thr	Glu	Gln	Asp	Pro	Ser	Lys	Ser	Tyr 240
80	225				230						235					

ES 2 909 143 T3

Trp Val Met Phe Ile Ser Ile Asn Pro Gly Ala Pro Ala Gly Gly Ser
 245 250 255

5 Phe Asn Gln Tyr Phe Val Gly Ser Phe Asn Gly Thr His Phe Glu Ala
 260 265 270

10 Phe Asp Asn Gln Ser Arg Val Val Asp Phe Gly Lys Asp Tyr Tyr Ala
 275 280 285

15 Leu Gln Thr Phe Phe Asn Thr Asp Pro Thr Tyr Gly Ser Ala Leu Gly
 290 295 300

20 Ile Ala Trp Ala Ser Asn Trp Glu Tyr Ser Ala Phe Val Pro Thr Asn
 305 310 315 320

25 Pro Trp Arg Ser Ser Met Ser Leu Val Arg Lys Phe Ser Leu Asn Thr
 325 330 335

30 Glu Tyr Gln Ala Asn Pro Glu Thr Glu Leu Ile Asn Leu Lys Ala Glu
 340 345 350

35 Pro Ile Leu Asn Ile Ser Asn Ala Gly Pro Trp Ser Arg Phe Ala Thr
 355 360 365

40 Asn Thr Thr Leu Thr Lys Ala Asn Ser Tyr Asn Val Asp Leu Ser Asn
 370 375 380

45 Ser Thr Gly Thr Leu Glu Phe Glu Leu Val Tyr Ala Val Asn Thr Thr
 385 390 395 400

50 Gln Thr Ile Ser Lys Ser Val Phe Ala Asp Leu Ser Leu Trp Phe Lys
 405 410 415

55 Gly Leu Glu Asp Pro Glu Glu Tyr Leu Arg Met Gly Phe Glu Val Ser
 420 425 430

60 Ala Ser Ser Phe Phe Leu Asp Arg Gly Asn Ser Lys Val Lys Phe Val
 435 440 445

65 Lys Glu Asn Pro Tyr Phe Thr Asn Arg Met Ser Val Asn Asn Gln Pro
 450 455 460

70 Phe Lys Ser Glu Asn Asp Leu Ser Tyr Tyr Lys Val Tyr Gly Leu Leu
 465 470 475 480

75 Asp Gln Asn Ile Leu Glu Leu Tyr Phe Asn Asp Gly Asp Val Val Ser

ES 2 909 143 T3

	485	490	495	
5	Thr Asn Thr Tyr Phe Met Thr Thr Gly Asn Ala Leu Gly Ser Val Asn 500 505 510			
10	Met Thr Thr Gly Val Asp Asn Leu Phe Tyr Ile Asp Lys Phe Gln Val 515 520 525			
15	Arg Glu Val Lys 530			
20	<210> 29 <211> 512 <212> PRT <213> Zymomonas mobilis			
25	Met Glu Ser Pro Ser Tyr Lys Asn Leu Ile Lys Ala Glu Asp Ala Gln 1 5 10 15			
30	Lys Lys Ala Gly Lys Arg Leu Leu Ser Ser Glu Trp Tyr Pro Gly Phe 20 25 30			
35	His Val Thr Pro Leu Thr Gly Trp Met Asn Asp Pro Asn Gly Leu Ile 35 40 45			
40	Phe Phe Lys Gly Glu Tyr His Leu Phe Tyr Gln Tyr Tyr Pro Phe Ala 50 55 60			
45	Pro Val Trp Gly Pro Met His Trp Gly His Ala Lys Ser Arg Asp Leu 65 70 75 80			
50	Val His Trp Glu Thr Leu Pro Val Ala Leu Ala Pro Gly Asp Leu Phe 85 90 95			
55	Asp Arg Asp Gly Cys Phe Ser Gly Cys Ala Val Asp Asn Asn Gly Val 100 105 110			
60	Leu Thr Leu Ile Tyr Thr Gly His Ile Val Leu Ser Asn Asp Ser Pro 115 120 125			
65	Asp Ala Ile Arg Glu Val Gln Cys Met Ala Thr Ser Ile Asp Gly Ile 130 135 140			
70	His Phe Gln Lys Glu Gly Ile Val Leu Glu Lys Ala Pro Met Pro Gln 145 150 155 160			

ES 2 909 143 T3

	Val	Ala	His	Phe	Arg	Asp	Pro	Arg	Val	Trp	Lys	Glu	Asn	Asp	His	Trp	
					165					170					175		
5	Phe	Met	Val	Val	Gly	Tyr	Arg	Thr	Asp	Asp	Glu	Lys	His	Gln	Gly	Ile	
				180					185					190			
10	Gly	His	Val	Ala	Leu	Tyr	Arg	Ser	Glu	Asn	Leu	Lys	Asp	Trp	Ile	Phe	
			195					200					205				
15	Val	Lys	Thr	Leu	Leu	Gly	Asp	Asn	Ser	Gln	Leu	Pro	Leu	Gly	Lys	Arg	
		210					215					220					
20	Ala	Phe	Met	Trp	Glu	Cys	Pro	Asp	Phe	Phe	Ser	Leu	Gly	Asn	Arg	Ser	
	225					230					235					240	
25	Val	Leu	Met	Phe	Ser	Pro	Gln	Gly	Leu	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Lys	Asn	
					245					250						255	
30	Arg	Asn	Leu	Phe	Gln	Asn	Gly	Tyr	Ile	Leu	Gly	Lys	Trp	Gln	Ala	Pro	
				260					265					270			
35	Gln	Phe	Thr	Pro	Glu	Thr	Ser	Phe	Gln	Glu	Leu	Asp	Tyr	Gly	His	Asp	
			275					280					285				
40	Phe	Tyr	Ala	Ala	Gln	Arg	Phe	Glu	Ala	Lys	Asp	Gly	Arg	Gln	Ile	Leu	
		290					295					300					
45	Ile	Ala	Trp	Phe	Asp	Met	Trp	Glu	Asn	Gln	Lys	Pro	Ser	Gln	Arg	Asp	
	305					310					315					320	
50	Gly	Trp	Ala	Gly	Cys	Met	Thr	Leu	Pro	Arg	Lys	Leu	Asp	Leu	Ile	Asp	
					325					330					335		
55	Asn	Lys	Ile	Val	Met	Thr	Pro	Val	Arg	Glu	Met	Glu	Ile	Leu	Arg	Gln	
				340					345					350			
60	Ser	Glu	Lys	Ile	Glu	Ser	Val	Val	Thr	Leu	Ser	Asp	Ala	Glu	His	Pro	
			355					360					365				
65	Phe	Thr	Met	Asp	Ser	Pro	Leu	Gln	Glu	Ile	Glu	Leu	Ile	Phe	Asp	Leu	
		370					375					380					
70	Glu	Lys	Ser	Ser	Ala	Tyr	Gln	Ala	Gly	Leu	Ala	Leu	Arg	Cys	Asn	Gly	
	385					390					395					400	
75	Lys	Gly	Gln	Glu	Thr	Leu	Leu	Tyr	Ile	Asp	Arg	Ser	Gln	Asn	Arg	Ile	
					405					410						415	

ES 2 909 143 T3

	gcaacaccga tgatgcttog acccccogaa gctccttcgg ggctgcatgg gcgctccgat	900
5	gocgctccag ggcgagcgct gtttaaatag ccaggccccc gattgcaaag acattatagc	960
	gagctaccaa agccatattc aaacacctag atcactacca cttctacaca ggccactoga	1020
	gcttgtgatc gcactccgct aagggggcgc ctcttcctct tcgtttcagt cacaaccgc	1080
10	aaacggcgcg cc	1092
	<210> 31	
	<211> 1400	
15	<212> ADN	
	<213> Prototheca moriformis	
	<400> 31	
20	caattggcag cagcagctcg gatagtatcg acacactctg gacgctggtc gtgtgatgga	60
	ctgttgccgc cacacttget gccttgacct gtgaatatcc ctgccgcttt tatcaaacag	120
	cctcagtgtg tttgatcttg tgtgtacgcg cttttgcgag ttgctagctg cttgtgctat	180
25	ttgcaatac cacccccagc atccccctcc ctcgtttcat atcgcttgca tcccaaccgc	240
	aacttatcta cgctgtcctg ctatccctca gcgctgctcc tgctcctgct cactgcccct	300
30	cgcacagcct tggtttgggc tccgcctgta ttctcctggc actgcaacct gtaaaccagc	360
	actgcaatgc tgatgcacgg gaagtagtgg gatgggaaca caaatggagc atcgaggtgg	420
	tcatctccga cctcgcgttg gtggcggcgc tcagcgggct cagcgtgctg ggccgcacca	480
35	tgggctgggc ctggctggtc aagacctacg tggtgcccta catgatcgtg aacatgtggc	540
	tggtgctcat cacgctgctc cagcacacgc acccggccct gccgcactac ttcgagaagg	600
40	actgggactg gctacgcggc gccatggcca ccgtcgaccg ctccatgggc ccgcccttca	660
	tggacagcat cctgcaccac atctccgaca cccacgtgct gcaccacctc ttcagcacca	720
	tcccgcacta ccacgccgag gaggcctccg ccgccatccg gcccatcctg ggcaagtact	780
45	accaatccga cagccgctgg gtcggccgcg ccctgtggga ggactggcgc gactgccgct	840
	acgtcgtccc cgacgcgccc gaggacgact ccgcgctctg gttccacaag tgagcgcgcc	900
50	tgcgcgagga cgcagaacaa cgctgcgcc gtgtcttttg cacgcgcgac tccggcgctt	960
	cgctgggtggc acccccataa agaaacctc aattctgttt gtggaagaca cgggttacc	1020
	ccaccaccc acctgcacct ctattattgg tattattgac gcgggagtgg gcgttgtacc	1080
55	ctacaacgta gcttctctag ttttcagctg gctcccacca ttgtaaagag cctctagagt	1140
	cgacctgcag gcatgcaagc ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt	1200
60	gttatccgct cacaattcca cacaacatac gagccggaag cataaagtgt aaagcctggg	1260
	gtgcctaata agtgagctaa ctcacattaa ttgcgcttgc ctactgccc gctttccagt	1320

ES 2 909 143 T3

cgggaaacct gtcgtgccag ctgcattaat gaatcggcca acgcgcgggg agaggcggtt 1380
 tgcgtattgg ggcctcttcc 1400
 5
 <210> 32
 <211> 4091
 <212> ADN
 <213> Prototheca moriformis
 10
 <400> 32
 gctcttcggg tttgctcacc cgcgaggtcg acgcccagca tggctatcaa gacgaacagg 60
 15
 cagcctgtgg agaagcctcc gttcacgatc gggacgctgc gcaaggccat ccccgcgcac 120
 tgtttcagac gctcggcget tcgtagcagc atgtacctgg cctttgacat cgcggtcatg 180
 tcctgctct acgtcgcgtc gacgtacatc gacctgcgc cgggtgcctac gtgggtcaag 240
 20
 tatggcgtca tgtggccget ctaactggtc ttccaggtgt gtgtgagggg tgtggttggc 300
 cgtatcgagg tcctggtggc gcgcatgggg gagaaggcgc ctgtcccgt gaccccccg 360
 25
 gctaccctcc cggcaccttc cagggcgcct tcggcacggg tgtctgggtg tgcgcgcacg 420
 agtgccggcca ccaggccttt tcctccagcc aggccatcaa cgacggcgtg ggctgtgtgt 480
 tcacagcct gctgctggtg ccctactact cctggaagca ctcgcaccgc cgccaccact 540
 30
 ccaacacggg gtgcctggac aaggacgagg tgtttgtgcc gccgcaccgc gcagtggcgc 600
 acgagggcct ggagtgggag gagggtgctc ccatccgat gggcaagggt ctggtcacc 660
 35
 tgaccctggg ctggccgctg tacctcatgt tcaacgtcgc ctcgcggccg taccgcgct 720
 tcgccaacca ctttgaccog tggtcgcca tcttcagcaa gcgcgaggta ccctttcttg 780
 cgctatgaca cttccagcaa aaggtagggc gggtgcgag acggcttccc ggcgctgcat 840
 40
 gcaacaccga tgatgcttcg acccccogaa gctccttcgg ggctgcatgg gcgctccgat 900
 gccgctccag ggcgagcget gtttaaatag ccaggcccc gattgcaaag acattatagc 960
 45
 gagctaccaa agccatattc aaacacctag atcactacca cttctacaca ggccactoga 1020
 gcttgtgatc gcaactccget aagggggcgc ctcttctct tcgtttcagt cacaaccgc 1080
 aaacggcgcg ccatgctgct gcaggccttc ctgttctctc tggccggctt cgccgccaag 1140
 50
 atcagcgcct ccatgacgaa cgagacgtcc gaccgcccc tgggtgactt caccaccaac 1200
 aagggctgga tgaacgacc caacggcctg tggtagcagc agaaggacgc caagtggcac 1260
 55
 ctgtacttcc agtacaacce gaacgacacc gtctggggga cgcccttgtt ctggggccac 1320
 gccacgtccg acgacctgac caactgggag gaccagccca tcgccatcgc cccgaagcgc 1380
 aacgactccg gcgccttctc cggctccatg gtgggtgact acaacaacac ctccgcttc 1440
 60
 ttcaacgaca ccatcgacc gcgccagcgc tgcgtggcca tctggacct caacaccocg 1500
 gagtccgagg agcagtagat ctctacagc ctggacggcg gctacacct caccgagtag 1560

ES 2 909 143 T3

	cagaagaacc ccgtgctggc cgccaactcc acccagttcc gcgacccgaa ggtcttctgg	1620
5	tacgagccct cccagaagtg gatcatgacc gcggccaaagt cccaggacta caagatcgag	1680
	atctactcct ccgacgacct gaagtcctgg aagctggagt ccgcgttcgc caacgagggc	1740
	ttcctcggct accagtacga gtgccccggc ctgatcgagg tccccaccga gcaggacccc	1800
10	agcaagtcct actgggtgat gttcatctcc atcaaccccg gcgccccggc cggcggtccc	1860
	ttcaaccagt acttcgtcgg cagcttcaac ggcacccact togaggcctt cgacaaccag	1920
15	tcccgctggg tggacttcgg caaggactac tacgcctcgc agaccttctt caacaccgac	1980
	ccgacctacg ggagcgcctt gggcatcgcg tgggcctcca actgggagta ctccgccttc	2040
	gtgcccacca acccctggcg ctctccatg tcctcgtgc gcaagttctc cctcaacacc	2100
20	gagtaccag ccaaccggga gacggagctg atcaacctga aggccgagcc gatcctgaac	2160
	atcagcaacg ccggccccctg gagccggttc gccaccaaca ccacgttgac gaaggccaac	2220
25	agctacaacg tcgacctgtc caacagcacc ggcaccctgg agttcgagct ggtgtacgcc	2280
	gtcaacacca cccagacgat ctccaagtcc gtgttcgcgg acctctccct ctggttcaag	2340
	ggcctggagg accccgagga gtacctcgc atgggcttcg aggtgtccgc gtcctccttc	2400
30	ttcctggacc gcgggaacag caaggtgaag ttcgtgaagg agaacccta cttaccaaac	2460
	cgcatgagcg tgaacaacca gcccttcaag agcgagaacg acctgtccta ctacaagggtg	2520
35	tacggcttgc tggaccagaa catcctggag ctgtacttca acgacggcga cgtcgtgtcc	2580
	accaacacct acttcatgac caccgggaac gccctgggct ccgtgaacat gacgacgggg	2640
	gtggacaacc tgttctacat cgacaagttc caggtgcgcg aggtcaagtg acaattggca	2700
40	gcagcagctc ggatagtatc gacacactct ggacgctggc cgtgtgatgg actgttgccg	2760
	ccacacttgc tgccttgacc tgtgaatatc cctgccgctt ttatcaaaca gcctcagtgt	2820
45	gtttgatctt gtgtgtacgc gcttttgca gttgctagct gcttgtgcta tttgcaata	2880
	ccacccccag catccccttc cctcgtttca tatcgcttgc atcccaaccg caacttatct	2940
	acgctgtcct gctatccctc agcgtgctc ctgctcctgc tcaactgccc tcgcacagcc	3000
50	ttggtttggg ctccgcctgt attctcctgg tactgcaacc tgtaaaccag cactgcaatg	3060
	ctgatgcacg ggaagtagtg ggatgggaac acaaatggag catcgaggtg gtcactctccg	3120
55	acctcgcgtt ggtggcggty ctcagcgggc tcagcgtgct gggccgcacc atgggctggg	3180
	cctggctggt caagacctac gtggtgcctt acatgatcgt gaacatgtgg ctggtgctca	3240
	tcacgctgct ccagcacacg caccggccc tgcgcacta cttcgagaag gactgggact	3300
60	ggctacgcgg cgccatggcc accgtcgacc gctccatggg ccgccccttc atggacagca	3360
	tctgcacca catctccgac acccaagtgc tgcaccacct cttcagcacc atcccgcact	3420

ES 2 909 143 T3

	accacgcco ga ggaggcctcc gccgccatcc ggcccatcct gggcaagtac taccaatccg	3480
5	acagccgctg ggtcggccgc gccctgtggg aggactggcg cgactgccgc tacgtcgtcc	3540
	ccgacgcgcc cgaggacgac tccgcgctct ggttccacaa gtgagcgcgc ctgcgcgagg	3600
	acgcagaaca acgctgccgc cgtgtctttt gcacgcgcga ctccggcgct tcgctggtgg	3660
10	cacccccata aagaaacct caattctggt tgtggaagac acggtgtacc cccaccacc	3720
	cacctgcacc tctattattg gtattattga cgcgggagtg ggcgttgtac cctacaacgt	3780
15	agcttctcta gttttcagct ggctcccacc attgtaaaga gcctctagag tcgacctgca	3840
	ggcatgcaag cttggcgtaa tcatggtcat agctgtttcc tgtgtgaaat tgttatccgc	3900
	tcacaattcc acacaacata cgagccggaa gcataaagtg taaagcctgg ggtgccta	3960
20	gagtgagcta actcacatta attgcgttgc gctcactgcc cgctttccag tcgggaaacc	4020
	tgtcgtgcca gctgcattaa tgaatcggcc aacgcgcggg gagaggcggg ttgcgtattg	4080
25	ggcgtctctc c	4091
	<210> 33	
	<211> 510	
	<212> ADN	
30	<213> Prototheca moriformis	
	<400> 33	
	gctcttccgc ctggagctgg tgcagagcat gggtcagttt ggggaggaga ggggtgctcc	60
35	cgtgctgcac cccgtggaca agctgtggca gccgcaggac ttctgcccg accccgagtc	120
	gcccgacttc gaggaccagg tggcggagct gcgcgcgcgc gccaaaggacc tgcccgacga	180
40	gtactttgtg gtgctggtgg gcgacatgat cacggaggag gcgctgccga cctacatggc	240
	catgctcaac accttggacg gtgtgcgcga cgacacgggc ggggctgacc acccgtgggc	300
	gcgctggacg cggcagtggg tggccgagga gaaccggcac ggcgacctgc tgaacaagta	360
45	ctgttggctg acggggcgcg tcaacatgcg ggccgtggag gtgacctca acaacctgat	420
	caagagcggc atgaaccgc agacggacaa caacccttac ttgggcttcg tctacacctc	480
50	cttccaggag cgcgccacca agtaggtacc	510
	<210> 34	
	<211> 1186	
	<212> ADN	
55	<213> Prototheca moriformis	
	<400> 34	
	caattggcag cagcagctcg gatagtatcg acacactctg gacgctggtc gtgtgatgga	60
60	ctgttgccgc cacacttget gccttgacct gtgaatatcc ctgccgcttt tatcaaacag	120
	cctcagtgty tttgatcttg tgtgtacgcg cttttgcgag ttgctagctg cttgtgctat	180

ES 2 909 143 T3

	ttggaatac cacccccagc atccccttcc ctcgtttcat atcgcttgca tcccaaccgc	240
5	aacttatcta cgctgtcctg ctatccctca gcgctgctcc tgctcctgct cactgcccct	300
	cgcacagcct tggtttgggc tccgcctgta ttctcctggg actgcaacct gtaaaccagc	360
	actgcaatgc tgatgcacgg gaagtagtgg gatgggaaca caaatggaag gatcgtagag	420
10	ctccagccac ggcaacaccg cgcgcctggc ggccgagcac ggcgacaagg gcctgagcaa	480
	gatctgctgg ctgatcgcca gcgacgaggg ccggcacgag atcgccctaca cgcgcatcgt	540
15	ggacgagttc ttccgcctcg accccgaggg cgcctgctcc gcctacgcca acatgatgcg	600
	caagcagatc accatgcccg cgcacctcat ggacgacatg ggccacggcg aggccaacc	660
	gggcccgaac ctcttcgccc acttctccgc cgtcgcggag aagatcgacg tctacgacgc	720
20	cgaggactac tgccgcatcc tggagcacct caacgcgcgc tggaaggtgg acgagcgcca	780
	ggtcagcggc caggcccggc cggaccagga gtacgttctg ggccctgccc agcgcttccg	840
25	gaaactcgcc gagaagaccg ccgccaagcg caagcgcgtc gcgcgaggc ccgtcgcctt	900
	ctcctggaga gaagagcctc tagagtgcac ctgcaggcat gcaagcttgg cgtaatcatg	960
	gtcatagctg tttcctgtgt gaaattgtta tccgctcaca attccacaca acatacgagc	1020
30	cggaagcata aagtgtaaag cctgggggtgc ctaatgagtg agctaactca cattaattgc	1080
	gttgctca ctgcccgtt tccagtggg aaacctgtc tgccagctgc attaataat	1140
35	cgccaacgc gcggggagag gcggtttgcg tattggggcg tcttcc	1186
	<210> 35	
	<211> 3615	
	<212> ADN	
40	<213> Prototheca moriformis	
	<400> 35	
	gctcttccgc ctggagctgg tgcagagcat gggtcagttt gcggaggaga ggggtctccc	60
45	cggtctgcac cccgtggaca agctgtggca gccgcaggac ttctgcccg accccgagtc	120
	gcccgacttc gaggaccagg tggcggagct gcgcgcgcg gcccaaggacc tgcccagca	180
50	gtactttgtg gtgctggtgg gcgacatgat cacggaggag gcgctgccga cctacatggc	240
	catgctcaac accttgagcg gtgtgcgca cgacacgggc gcggctgacc acccgtgggc	300
	gcgctggacg cggcagtggt tggccgagga gaaccggcac ggcgacctgc tgaacaagta	360
55	ctgttgctg acggggcgcg tcaacatgcg ggccgtggag gtgacatca acaacctgat	420
	caagagcggc atgaaccgc agacggaca caacccttac ttgggcttcg tctacacctc	480
60	cttccaggag cgcgccacca agtaggtacc ctttcttgc ctatgacact tccagcaaaa	540
	ggtagggcgg gctgcgagac ggcttcccgg cgtgcatgc aacaccgatg atgcttcgac	600

ES 2 909 143 T3

	ccccgaagc tccttcgggg ctgcatgggc gctccgatgc cgctccaggg cgagcgtgt	660
	ttaaatagcc agggccccga ttgcaaagac attatagcga gctaccaaag ccatattcaa	720
5	acacctagat cactaccact tctacacagg cactcgcgac ttgtgatcgc actccgctaa	780
	gggggcgccct cttcctcttc gtttcagtca caaccgcaa acggcgcgcc atgctgctgc	840
10	aggccttctt gttcctgctg gccggcttcg ccgccaagat cagcgcctcc atgacgaacg	900
	agacgtccga ccgccccctg gtgcaactca cccccaaaca gggctggatg aacgacccca	960
	acggcctgtg gtacgacgag aaggacgcca agtggcacct gtacttccag tacaaccoga	1020
15	acgacaccgt ctgggggacg cccttgttct ggggccacgc cacgtccgac gacctgacca	1080
	actgggagga ccagcccato gccatcgccc cgaagcgcaa cgactccggc gccttctccg	1140
20	gctccatggt ggtggactac aacaacacct ccggcttctt caacgacacc atcgaccgc	1200
	gccagcgtg cgtggccatc tggacctaca acacccgga gtccgaggag cagtacatct	1260
	cctacagcct ggacggcggc tacaccttca ccgagtacca gaagaacccc gtgctggccg	1320
25	ccaactccac ccagttccgc gacccgaagg tcttctggta cgagccctcc cagaagtgga	1380
	tcatgaccgc ggccaagtcc caggactaca agatcgagat ctactcctcc gacgacctga	1440
30	agtcttgtaa gctggagtcc gcgttcgcca acgagggctt cctcggctac cagtacgagt	1500
	gccccggcct gatcgaggtc cccaccgagc aggaccccag caagtcctac tgggtgatgt	1560
	tcatctccat caaccccggc gccccggccg gcggctcctt caaccagtac ttcgtcggca	1620
35	gcttcaacg caccacttc gaggccttcg acaaccagtc ccgctgggtg gacttcggca	1680
	aggactacta cgccctgcag accttcttca acaccgacc gacctacggg agcgcctgg	1740
40	gcatcgctg ggcctccaac tgggagtact ccgccttcgt gccaccaaac ccctggcgct	1800
	cctccatgtc cctcgtgcgc aagtctccc tcaacaccga gtaccaggcc aacccggaga	1860
	cggagctgat caacctgaag gccgagccga tctgaacat cagcaacgcc ggcccctgga	1920
45	gccggttcgc caccaacacc acgttgacga aggccaacag ctacaacgtc gacctgtcca	1980
	acagcaccgg caccctggag ttcgagctgg tgtacgccgt caacaccacc cagacgatct	2040
50	ccaagtccgt gttcgcggac ctctccctct ggttcaaggg cctggaggac cccgaggagt	2100
	acctccgcat gggcttcgag gtgtccgctt cctccttctt cctggaccgc gggaacagca	2160
	aggtgaagtt cgtgaaggag aaccctact tcaccaaccg catgagcgtg aacaaccagc	2220
55	ccttcaagag cgagaacgac ctgtcctact acaaggtgta cggcttgctg gaccagaaca	2280
	tcttgagct gtacttcaac gacggcgacg tcgtgtccac caacacctac ttcatgacca	2340
	ccgggaacgc cctgggctcc gtgaacatga cgacgggggt ggacaacctg ttctacatcg	2400
60	acaagttcca ggtgcgcgag gtcaagtgac aattggcagc agcagctcgg atagtatcga	2460

ES 2 909 143 T3

cacactctgg acgctggtcg tgtgatggac tgttgccgcc acacttgctg ccttgacctg 2520
 tgaatatccc tgccgctttt atcaaacagc ctcagtgtgt ttgatcttgt gtgtacgcgc 2580
 5 ttttgcgagt tgctagetgc ttgtgctatt tgcaataacc acccccagca tccccttccc 2640
 tcgtttcata tcgcttgcac cccaaccgca acttatctac gctgtcctgc tatccctcag 2700
 10 cgctgctcct gctcctgctc actgcccctc gcacagcctt ggtttgggct cgcctgtat 2760
 tctcctggta ctgcaacctg taaaccagca ctgcaatgct gatgcacggg aagtagtggg 2820
 atgggaacac aatggaagg atcgtagagc tccagccacg gcaacaccgc gcgcctggcg 2880
 15 gccgagcacg gcgacaaggg cctgagcaag atctgcgggc tgatcgccag cgacgagggc 2940
 cggcacgaga tcgcctacac gcgcatcgtg gacgagttct tccgcctcga ccccaggggc 3000
 gcgctcgccg cctacgcca catgatgcgc aagcagatca ccatgcccgc gcacctcatg 3060
 20 gacgacatgg gccacggcga ggccaaccg ggccgcaacc tcttcgccga cttctccgcc 3120
 gtcgccgaga agatcgacgt ctacgacgcc gaggactact gccgcatcct ggagcacctc 3180
 25 aacgcgcgct ggaaggtgga cgagcgccag gtcagcggcc aggccgccgc ggaccaggag 3240
 tacgttctgg gcctgcccc a gcgcttcggy aaactcgccg agaagaccgc cgccaagcgc 3300
 aagcgcgctg cgcgcaggcc cgtcgccttc tcctggagag aagagcctct agagtgcacc 3360
 30 tgcaggcatg caagcttggc gtaatcatgg tcatagctgt ttctgtgtg aaattgttat 3420
 ccgctcacia ttccacacia catacgagcc ggaagcacia agtgtaaagc ctggggtgcc 3480
 35 taatgagtga gctaactcac attaatgctg ttgcgctcac tgcccgttt ccagtcggga 3540
 aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcg cggggagagc cggtttgcgt 3600
 40 attgggcgct cttcc 3615

 <210> 36
 <211> 511
 <212> ADN
 45 <213> Prototheca moriformis

 <400> 36
 gctcttccc cctggagctg gtgcagagca tggggcagtt tgcggaggag aggggtgctcc 60
 50 ccgtgctgca ccccgtggac aagctgtggc agccgcagga cttcctgccc gaccccagat 120
 cgcccgaact cgaggaccag gtggcggagc tgcgcgcgcg cgccaaggac ctgcccgacg 180
 55 agtactttgt ggtgctgggtg ggcgacatga tcacggagga ggcgctgccg acctacatgg 240
 ccatgctcaa caccttgac ggtgtgcgcg acgacacggg cgcggctgac caccctgagg 300
 cgcgctggac gcggcagtg gtggccgagg agaaccggca cggcgacctg ctgaacaagt 360
 60 actgttggct gacggggcgc gtcaacatgc gggccgtgga ggtgaccatc aacaacctga 420
 tcaagagcgc catgaaccgc cagacggaca acaaccctta cttgggcttc gtctacacct 480

ES 2 909 143 T3

ccttcagga gcgcgccacc aagtaggtac c 511

5 <210> 37
 <211> 761
 <212> ADN
 <213> Prototheca moriformis

10 <400> 37
 cagccacggc aacaccgcgc gccttgccgc cgagcacggc gacaagaacc tgagcaagat 60
 ctgcgggctg atgccacgcg acgagggccg gcacgagatc gcttacacgc gcatcgtgga 120

15 cgagttcttc cgcctcgacc ccgagggcgc cgtccgcccc tacgccaaca tgatgcgcaa 180
 cgagatcacc atgcccgccg acctcatgga cgacatgggc cacggcgagg ccaaccggg 240
 ccgcaacctc ttcgccgact tctcccggtg cgcgagaag atcgacgtct acgacgccga 300

20 ggactactgc cgcacctctg agcacctcaa gcgcgctgg aaggtggacg agcggccagg 360
 cagcggccag gccgccggg accagggagta cgtcctgggc ctgccccagc gcttccggaa 420

25 actcggccag aagaccgccg ccaagcgcaa gcgcgtcgcg cgcaggcccg tcgccttctc 480
 ctggagaaga gcctctagag tcgacctgca ggcatgcaag cttggcgtaa tcatggtcat 540
 agctgtttcc tgtgtgaaat tgttatccgc tcacaattcc acacaacata cgagccggaa 600

30 gcataaagtg taaagcctgg ggtgcctaata gagtgagcta actcacatta attgcgttgc 660
 gctcactgcc cgccttccag tcgggaaacc tgtcgtgcca gctgcattaa tgaatcggcc 720

35 aacgcgcggg gagaggcggg ttgcgtattg gcgcctcttc c 761

40 <210> 38
 <211> 3599
 <212> ADN
 <213> Prototheca moriformis

45 <400> 38
 gctcttcccg cctggagctg gtgcagagca tggggcagtt tgcggaggag aggggtgctcc 60
 ccgtgctgca ccccgaggac aagctgtggc agccgcagga cttcctgccc gaccccagat 120
 cgcccgactt cgaggaccag gtggcggagc tgcgcgcgcg cgccaaggac ctgcccagc 180

50 agtactttgt ggtgctggtg ggcgacatga tcacggagga ggcgctgccg acctacatgg 240
 ccatgctcaa caccttgac ggtgtgcgcg acgacacggg cgcggctgac caccctggg 300
 cgcgctggac gcggcagtg gtggccgagg agaaccggca cggcgacctg ctgaacaagt 360

55 actggttgct gacggggcgc gtcaacatgc gggccgtgga ggtgaccatc aacaacctga 420
 tcaagagcgc catgaaccg cagacggaca acaaccctta cttgggcttc gtctacacct 480

60 ccttcagga gcgcgccacc aagtaggtac cctttcttgc gctatgacac ttccagcaaa 540
 aggtaggcgc ggctgcgaga cggcttcccg gcgctgcatg caacaccgat gatgcttoga 600

ES 2 909 143 T3

	ccccccaag ctccttcggg gctgcatggg cgctccgatg ccgctccagg gcgagcgctg	660
5	tttaaatagc caggcccccg attgcaaaga cattatagcg agctaccaa gccatattca	720
	aacacctaga tcaactaccac ttctacacag gccactcgag cttgtgatcg cactccgcta	780
	agggggcgcc tcttcctctt cgtttcagtc acaaccgcga aacggcgcgc catgtgtctg	840
10	caggccttcc tgttcctgct ggccggcttc gccgccaaga tcagcgctc catgacgaac	900
	gagacgtccg accgccccct ggtgcacttc accccaaca agggctggat gaacgacccc	960
15	aacggcctgt ggtacgacga gaaggacgcc aagtggcacc tgtacttcca gtacaaccgg	1020
	aacgacaccg tctgggggac gcccttgctt tggggccacg ccacgtccga cgacctgacc	1080
	aactgggagc accagcccat cgccatcgcc ccgaagcgca acgactccgg cgccttctcc	1140
20	ggctccatgg tgggtggacta caacaacacc tccggcttct tcaacgacac catcgacccg	1200
	cgccagcgct gcgtggccat ctggacctac aacaccccgg agtccgagga gcagtacatc	1260
25	tctacagcc tggacggcgg ctacacctc accgagtacc agaagaacc cgtgctggcc	1320
	gccaactcca ccagttccg cgacccgaag gtcttctggt acgagccctc ccagaagtgg	1380
	atcatgaccg cggccaagtc ccaggactac aagatcgaga tctactctc cgacgacctg	1440
30	aagtccctga agctggagtc cgcgttogcc aacgagggct toctcggcta ccagtacgag	1500
	tgccccggcc tgatcgaggt cccacocgag caggaccca gcaagtccta ctgggtgatg	1560
35	ttcatctcca tcaaccccgg cgccccggcc ggcggtcct tcaaccagta ctctgctggc	1620
	agcttcaacg gcacccactt cgaggccttc gacaaccagt cccgcgtggt ggacttcggc	1680
	aaggactact acgccctgca gaccttctc aacaccgacc cgacctacgg gagcgccctg	1740
40	ggcatcgctg gggcctccaa ctgggagtac tccgccttcg tgcccaccaa ccctggcgc	1800
	tctccatgt ccctcgtgcg caagttctc ctcaacaccg agtaccaggc caaccggag	1860
45	acggagctga tcaacctgaa ggccgagccg atcctgaaca tcagcaacgc cggcccctgg	1920
	agccggttcg ccaccaacac cacgttgacg aaggccaaca gctacaacgt cgacctgtcc	1980
	aacagcaccg gcaccctgga gttcgagctg gtgtacgccg tcaacaccac ccagacgatc	2040
50	tccaagtccg tgttcgcgga cctctccctc tggttcaagg gcctggagga ccccgaggag	2100
	tacctccgca tgggcttcga ggtgtccgcg tctctcttct tcttgaccg cgggaacagc	2160
55	aagggtgaagt tcgtgaagga gaaccctac ttcaccaacc gcatgagcgt gaacaaccag	2220
	cccttcaaga gcgagaacga cctgtcctac tacaaggtgt acggcttgct ggaccagaac	2280
	atcctggagc tgtacttcaa cgacggcgac gtcgtgtcca ccaacaccta cttcatgacc	2340
60	accgggaacg ccctgggctc cgtgaacatg acgacggggg tggacaacct gttctacatc	2400
	gacaagttcc aggtgcgcga ggtcaagtga caattggcag cagcagctcg gatagtatcg	2460

ES 2 909 143 T3

	acacactctg gacgctggtc gtgtgatgga ctggtgccgc cacacttgct gccttgacct	2520
5	gtgaatatcc ctgccgcttt tatcaaacag cctcagtgtg tttgatcttg tgtgtacgcg	2580
	ctttttgcgag ttgctagctg cttgtgctat ttgcgaatac cacccccagc atccccttcc	2640
	ctcgtttcat atcgcttgca tccaaccgc aacttatcta cgctgtcctg ctatccctca	2700
10	gcgctgctcc tgctcctgct cactgccct cgcacagcct tggtttgggc tccgcctgta	2760
	ttctcctggt actgcaacct gtaaaccagc actgcaatgc tgatgcacgg gaagtagtgg	2820
15	gatgggaaca caaatggaca gccacggcaa caccgcgcg cttgcggccg agcacggcga	2880
	caagaacctg agcaagatct gcgggtgat cgccagcgac gagggccggc acgagatcgc	2940
	ctacacgcgc atcggtgacg agttcttccg cctcgacccc gagggcgccg tcgccgccta	3000
20	cgccaacatg atgcgcaagc agatcaccat gcccgcgcac ctcatggacg acatgggcca	3060
	cggcgaggcc aaccggggcc gcaacctctt cgccgacttc tccgcggtcg ccgagaagat	3120
25	cgacgtctac gacgccgagg actactgccg catcctggag cacctcaacg cgcgctggaa	3180
	ggtggacgag cgccaggtea gcggccaggc cgccgcgac caggagtacg tcctgggect	3240
	gccccagcgc ttccggaaac tcgccgagaa gaccgcccgc aagcgcaagc gcgtcgcgcg	3300
30	caggcccgtc gccttctcct ggagaagagc ctctagagtc gacctgcagg catgcaagct	3360
	tggcgtaatc atggtcatag ctgtttcctg tgtgaaattg ttatccgctc acaattccac	3420
35	acaacatacg agccggaagc ataaagtgta aagcctgggg tgccaatga gtgagctaac	3480
	tcacattaat tgcgttgccg tcaactgccg ctttccagtc gggaaacctg tcgtgccagc	3540
	tgcattaatg aatcgccaa cgcgcgggga gaggcggtt gcgtattggg cgctcttcc	3599
40	<210> 39	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Desconocido	
45	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 39	
50	gtccctgcc tttgtacaca c	21
	<210> 40	
	<211> 23	
55	<212> ADN	
	<213> Desconocido	
	<220>	
	<223> cebador	
60	<400> 40	
	ttgatatgct taagttcagc ggg	23

ES 2 909 143 T3

<210> 41
 <211> 710
 5 <212> ADN
 <213> *Rhodotorula glutini*

 <400> 41
 10 cgccccgtcgc tactaccgat tgaatggcct agtgaggcct cgggattggc tattgggagc 60
 tcgcgagagc acctgactgc cgagaagttg tacgaacttg gtcatttaga ggaagtaaaa 120
 gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attagtgaat attaggggtg 180
 15 ccaacttaac ttggagcccg accctcactt tctaaccctg tgcatttgtc ttgggtagta 240
 gcttgcgta gcgagcgaat cccatttcac ttacaaacac aaagtctatg aatgtaacaa 300
 atttataaca aaacaaaact ttcaacaacg gatctcttgg ctctcgcac gatgaagaac 360
 20 gcagcgaaat gcgatacgtg atgtgaattg cagaattcag tgaatcatcg aatctttgaa 420
 cgcaccttgc gctccatggt attccgtgga gcatgcctgt ttgagtgtca tgaattcttc 480
 25 aaccacctc tttcttagtg aatcaggcgg tgtttggatt ctgagcgtg ctggcttcgc 540
 ggcttagctc gctcgtaatg cattagcacc cgcaatcgaa cttcggattg actcggcgta 600
 atagactatt cgttgaggat tctggtctct gactggagcc gggtaagggt aaagggagct 660
 30 actaatcctc atgtctatct tgagattaga cctcaaatca ggtaggacta 710

 <210> 42
 35 <211> 707
 <212> ADN
 <213> *Rhodotorula glutini*

 <400> 42
 40 cgccccgtcgc tactaccgat tgaatggcct agtgaggcct cgggattggc tattgggagc 60
 tcgcgagagc acccgactgc cgagaagttg tacgaacttg gtcatttaga ggaagtaaaa 120
 gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attagtgaat attagggcgt 180
 45 ccaacttaac ttggagcccg aactctcact ttctaaccct gtgcatctgt ttctggtcag 240
 tagctctctc gggagtgaac gccattcact taaaacacaa agtctatgaa tgtataaaat 300
 50 ttataacaaa acaaaacttt caacaacgga tctcttggct ctcgcatcga tgaagaacgc 360
 agcgaaatgc gataagtaat gtgaattgca gaattcagt gattcatcga tctttgaacg 420
 caccttgcgc tctctggtat tccggagagc atgcctgttt gagtgcacg aaatcttcaa 480
 55 ccctctcttt tcttaatgaa tcgagaggtg cttggatcct gagcgtgct ggcttcggcc 540
 tagctcgttc gtaatgcatt agcatcgcga atcgaacttc ggattgactt ggcgtaaatg 600
 60 actattcgct gaggattctg gtctcgtacc agagccgggt tgggttaaag gaagcttcta 660
 atcctaaaag tctaactttt gattagatct caaatcaggt aggacta 707

ES 2 909 143 T3

<210> 43
 <211> 630
 5 <212> ADN
 <213> *Lipomyces tetrasporus*

 <400> 43
 10 cgccccgtcgc tactaccgat tgaatggcct agtgaggcct tcggactggc tccagaaaat 60
 gggaaacat tatcaggagc tggaaagtgt gtcaaaccttg gtcatttaga ggaagtaaaa 120
 gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attactgagt atttgtcttt 180
 15 taaagacatc tctctatcca taaactcttt tttctaaaaa gacatgattt acacaattag 240
 tctgaatgat tatataaaaa tcttcaaaac tttcaacaac ggatctcttg gttctcgcat 300
 cgatgaagaa cgcagcaaaa tgcgataagt attgtgaatt gcaggatttt gtgaatcatc 360
 20 gaatTTTTga acgcacattg caccttctgg tattccggag ggtatacctg tttgagcgtc 420
 atttatatac tcaaaacttt gttttgggtga tgggcacata tctgggtgaga gctagatttg 480
 25 cctgaaatat agtggtagag attgctacga gttatgcaag ttagccaatg ctattaagtt 540
 aattcgttgg tgaagcatgc ggagctttag cggtcgcctt ccttaactat tggaaTTTT 600
 ctaatTTTTga cctcaaatca ggcaggagta 630
 30

 <210> 44
 <211> 641
 <212> ADN
 35 <213> *Lipomyces starkeyi*

 <400> 44
 cgccccgtcgc tactaccgat tgaatggcct agtgagacc cggattggc gttaggaagc 60
 40 cggcaacggc atcctttggc cgagaagtgt gtcaaaccttg gtcatttaga ggaagtaaaa 120
 gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attagtgatt gcctttatag 180
 gcttataact atatccactt acacctgtga actgttctat tacttgacgc aagtcgagta 240
 45 tttttacaaa caatgtgtaa tgaacgtcgt tttattataa caaaataaaa ctttcaacaa 300
 cggatctctt ggctctcgca tcgatgaaga acgcagcgaa ttgcgataag taatgtgaat 360
 50 tgcagaattc agtgaatcat cgaatctttg aacgcagcctt gcgctctctg gtattccgga 420
 gagcatgcct gtttcagtgt catgaaatct caaccactag ggtttcctaa tggattggat 480
 ttgggcgtct gcgatctctg atcgcctgcc ttaaaagagt tagcaagttt gacattaatg 540
 55 tctgggtgtaa taagtttcac tgggtccatt gtgttgaagc gtgcttctaa tcgtccgcaa 600
 ggacaattac tttgactctg gcctgaaatc aggtaggact a 641
 60

 <210> 45
 <211> 456

ES 2 909 143 T3

<212> ADN
 <213> *Yarrowia lipolytica*
 <400> 45
 5 cgccccgtcgc tactaccgat tgaatggttt agtgagacct tgggagggcg agatgagggg 60
 ggcaaccctt tttgaacatc caaacttggt caaacttgat tatttagagg aagtaaaagt 120
 10 cgtaacaagg tttccgtagg tgaacctgcg gaaggatcat tattgatttt atctatttct 180
 gtggatttct ggtatattac agcgtcattt tatctcaatt ataactatca acaacggatc 240
 tcttggctct cacatcgatg aagaacgcag cgaaccgca tattttttgt gacttgcaga 300
 15 tgtgaatcat caatcttga acgcacattg cgcggtatgg cattccgtac cgcacggatg 360
 gaggagcgtg ttccctctgg gatcgcattg ctttctttaa atggattttt taaactctca 420
 attattacgt catttcacct ccttcatccg agatta 456
 20
 <210> 46
 <211> 628
 <212> ADN
 25 <213> *Cryptococcus curvatus*
 <400> 46
 cgccccgtcgc tactaccgat tgaatggctt agtgagattt ctggattggc gtttaggaagc 60
 30 cggcaacggc atcctttggc tgagaagtta ctcaaacttg gtcattttaga ggaagtaaaa 120
 gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cgaaggatc attagtgatt tgccttcggg 180
 ctaaaactata tccataaac ctgtgaactg ttgattgact tcggtcaata tttttacaaa 240
 35 cattgtgtaa tgaacgtcat gttataataa caaatataac tttcaacaac ggatctcttg 300
 gctctcgcat cgatgaagaa cgcagcgaaa tgcgataagt aatgtgaatt gcagaattca 360
 40 gtgaatcadc gaatcttga acgcaacttg cgtctctctg tattccggag agcatgcctg 420
 tttgagtgtc atgaaatctc aaccattagg gtttcttaat ggcttggatt tggacgtttg 480
 ccagtcaaat ggctcgtctt aaaagagtta gtgaatttaa catttgcctt ctggcgtaat 540
 45 aagtttcgct gggctgatag tgtgaagttt gcttctaate gtcgcaagg acaattcttg 600
 aactctggcc tcaaatcagg taggacta 628
 50
 <210> 47
 <211> 628
 <212> ADN
 <213> Desconocido
 55 <220>
 <223> *Trichosporon* sp. CBS 7617
 <400> 47
 60 cgccccgtcgc tactaccgat tgaatggctt agtgagacct tcggattggc gtttaggaagc 60
 cggcaacggc atcctttggc cgagaagtgg gtcaaacttg gtcattttaga ggaagtaaaa 120

ES 2 909 143 T3

	gtcgtaaaca ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attagtgaat tgctctttga	180
5	gcgttaaact atatccatct acacctgtga actggtgatt gacttcggtc aattactttt	240
	acaaacattg tgtaatgaac gtcattgttat tataacaaaa ataactttca acaacggatc	300
	tcttggtctt cgcacatgat aagaacgcag cgaaatgcga taagtaatgt gaattgcaga	360
10	attcagtgaa tcatcgaatc tttgaacgca acttgcgctc tctggtattc cggagagcat	420
	gcctgtttga gtatcatgaa atctcaacca ttagggtttc ttaatggctt ggatttgggc	480
15	gctgccactt gcctggctcg ccttaaaaga gttagcgtat taacttgtcg atctggcgta	540
	ataagtttcg ctgggtgtaga cttgagaagt gcgcttctaa tcgtcctcgg acaattcttg	600
	aactctggtc tcaaatcagg taggacta	628
20		
	<210> 48	
	<211> 716	
	<212> ADN	
	<213> <i>Sporobolomyces alborubescens</i>	
25		
	<400> 48	
	cgcccgtcgc tactaccgat tgaatggctt agtgaggcct ccggattggc tattgggagc	60
30	tcgcgagagc acccgactgc cgagaagttg tacgaacttg gtcatttaga ggaagtaaaa	120
	gtcgtaaaca ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attagtgaat ataggacgtc	180
	caacttaact tggagtccga actctcactt tctaaccctg tgcacttggt tgggatagta	240
35	actctcgcaa gagagcgaac tcctattcac ttataaacac aaagtctatg aatgtattaa	300
	atthttataac aaaataaaac tttcaacaac ggatctcttg gctctcgcat cgatgaagaa	360
40	cgcagcgaaa tgcgataagt aatgtgaatt gcagaattca gtgaatcatc gaatctttga	420
	acgcaccttg cgctccatgg tattccgtgg agcatgcctg tttgagtgtc atgaatactt	480
	caaccctcct ctttcttaat gattgaagag gtgtttggtt tctgagcgtt gctggccttt	540
45	acggctctagc tcgttcgtaa tgcattagca tccgcaatcg aatttcggat tgacttggcg	600
	taatagacta ttcgctgagg aattctagtc ttcggattag agccgggttg ggttaaagga	660
50	agcttctaata cagaatgtct acattttaag attagatctc aaatcaggta ggacta	716
	<210> 49	
	<211> 718	
	<212> ADN	
55	<213> <i>Rhodotorula glutinis</i>	
	<400> 49	
	cgcccgtcgc tactaccgat tgaatggctt agtgaggcct ccggattggc tattgggagc	60
60	tcgcgagagc acccgactgc cgagaagttg tacgaacttg gtcatttaga ggaagtaaaa	120
	gtcgtaaaca ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attagtgaat ctaggacgtc	180

ES 2 909 143 T3

caacttaact tggagtcoga actctcactt tctaaccctg tgcactctgtt ttaaaattgg 240
 5 ctagtagctc ttcggagcga accaccattt ttcacttata caaacacaaa gtctatgaat 300
 gtaaacaaat ttataacaaa acaaaaactt caacaacgga tctcttggct ctcgcatoga 360
 tgaagaacgc agcgaaatgc gatacgtaat gtgaattgca gaattcagtg aatcatcgaa 420
 10 tctttgaacg caccttgcgc tccttgggat tccgaggagc atgcctgttt gagtgtcatg 480
 aaatcttcaa cccacctctt tcttagtgaa tctgggtgtg cttggtttct gagcgctgct 540
 15 ctgcttcggc ttagctcggt cgtaatgcat tagcatccgc aaccgaaact tcggattgac 600
 ttggcgtaat agactattcg ctgaggattc cagacttggt ctggagccga gttgggttaa 660
 aggaagcttc taatcctaaa gtctatcttt tgattagatc tcaaatcagg taggacta 718
 20
 <210> 50
 <211> 693
 <212> ADN
 <213> *Rhodotorula glutinis*
 25
 <400> 50
 cgcccgtcgc tactaccgat tgaatggctt agtgagggct ccggattggc ttctgggagc 60
 30 cggcaacggc acctagtcgc tgagaagttg gacgaacttg gtcatttaga ggaagtaaaa 120
 gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attaataaaa tgcaaggacg 180
 ctcttttttag aggtccgacc caattcattt tctcacactg tgcacacact actttttaca 240
 35 ccatttttaa cacttgaagt ctaagaatgt aacagctctc ttaattgagc ataaaattta 300
 aacaaaactt tcagcaacgg atctcttggc tctcccatcg atgaagaacg cagcgaaatg 360
 40 cgatacgtaa tgtgaattgc agaattcagt gaatcatcga atctttgaac gcaccttgca 420
 ctcttttgga ttccgaagag tatgtctggt tgagtgtcat gaaactctca acccccctgt 480
 tttgtaatga accaggcgtg ggcttgatt atggctgctg ccggcgtaat tgtcgactcg 540
 45 gctgaaatac acgagctacc catttcataa gaaatagacg gtttgactcg gcgtaataac 600
 atatttcgct gaggacgtca cattctttac ctagtgggtc ttctaatacg acatctaaac 660
 50 ttttaagcttt agacctcaa tcagtcagga cta 693

 <210> 51
 <211> 640
 <212> ADN
 55 <213> *Trichosporon behrend*

 <400> 51
 cgcccgtcgc tactaccgat tgaatggctt agtgagacc ccggattggc gttaggaagc 60
 60 cggcaacggc atcctttggc cgagaagttg gtcaaacctg gtcatttaga ggaagtaaaa 120
 gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attagtatt gccttcatag 180

ES 2 909 143 T3

	gcttaaacta tatccacata cacctgtgaa ctgttccacc acttgacgca agtcgagtggt	240
5	ttttacaaac aatgtgtaat gaacgctggt ttattataac aaaataaaac tttcaacaac	300
	ggatctcttg gctctcgcac cgatgaagaa cgcagcgaat tgcgataagt aatgtgaatt	360
	gcagaattca gtgaatcatc gaatctttga acgcagcttg cgctctctgg tattccggag	420
10	agcatgcctg tttcagtgtc atgaaatctc aaccactagg gtttcctaata ggattggatt	480
	tgggctctg cgatctctga tcgctcgcct taaaagagtt agcaagtttg acattaatgt	540
15	ctgggtgtaat aagtttact gggctcattg tgttgaagcg tgcttctaata cgtccgcaag	600
	gacaattact ttgactctgg cctgaaatca ggtaggacta	640
20	<210> 52 <211> 476 <212> ADN <213> Geotrichum histeridarum	
25	<400> 52 cgccccgcgc tactaccgat cgaatggcct agtgaggcct cggattgat ttgggagaga	60
	gggcgacttt tttcctggaa cgagaagcta gtcaaacttg gtcatttaga ggaagtaaaa	120
30	gtcgtaaaca ggtttccgta ggtgaacctg cggaggatc attagaaaaa tgcgatatta	180
	gtggtttatt ttgctcgcg aaaggcaaac ttttaacata cctacctttt tttactata	240
	aaaactttta acaacggatc tcttggttct cgcacgatg aagaacgcag cgaattgoga	300
35	tacgttttgt gaattgcaga agtgaatcat caatctttga acgcacattg cgcctggtgg	360
	tattccgcca ggcatactg tttgagcgtt gttctctctg ggattgtcta ctttcctcaa	420
40	agaaatataa caaacaagtt tgacacaaca cctcaacctc agatcaggta ggacta	476
45	<210> 53 <211> 687 <212> ADN <213> Rhodotorula aurantiaca	
50	<400> 53 cgccccgcgc tactaccgat tgaatggcct agtgaggcct tcggattggc ttctgggagc	60
	cggcaacggc acctagtcgc tgagaagttt gacgaacttg gtcatttaga ggaagtaaaa	120
	gtcgtaaaca ggtttccgta ggtgaacctg cggaggatc attaatgaat tttaggacgt	180
55	tctttttaga agtccgaccc tttcattttc ttacactgtg cacacacttc ttttttacac	240
	acacttttaa caccttagta taagaatgta atagtctctt aattgagcat aaataaaaac	300
	aaaactttca gcaacggatc tcttggtctc cgcacgatg aagaacgcag cgaattgoga	360
60	taagtaatgt gaattgcaga attcagtgaa tcatogaatc tttgaacgca ccttgcactc	420
	tttggatttc ogaagagtat gtctggttga gtgtcatgaa actctcaacc cccctatfff	480

ES 2 909 143 T3

	gtaatgagat ggggtgtggc ttggattatg gttgtctgtc ggcgtaattg ccggtcaac	540
5	tgaaatacac gagcaaccct attgaaataa acggtttgac ttggcgtaat aattatttcg	600
	ctaaggacgc tttcttcaaa tataagaggt gcttctaatt cgcttctaata agcatttaag	660
	ctttagacct caaatcagtc aggacta	687
10	<210> 54 <211> 636 <212> ADN <213> <i>Trichosporon domesticum</i>	
15	<400> 54	
	cgcccgtcgc tactaccgat tgaatggctt agtgagacct cgggattggc gttgagaagc	60
20	cggaacggc atctcttggc tgagaagttg gtcaaacctg gtcatttaga ggaagtaaaa	120
	gtcgtaaaca ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attagtgatt gccttaattg	180
	gcttaaacta tatccatcta cacctgtgaa ctgtttgatt gaatcttcgg attcgtttt	240
25	atacaaacat tgtgtaatga acgtcattat attataacaa aaaaaaaact ttcaacaacg	300
	gatctcttgg ctctcgcac gatgaagaac gcagcgaat gcgataagta atgtgaattg	360
30	cagaattcag tgaatcatcg aatctttgaa cgcaacttgc gctctctggg attccggaga	420
	gcatgcctgt ttgagtgtca tgaaatctca accattaggg tttcttaatg gcttggattt	480
	ggaggtttgc cagtctgact ggctcctctt aaaagagtta gcaagttgaa ctattgctat	540
35	ctggcgtaat aagtttcgct ggaatggat tgtgaagcgt gcttctaatac gtcttcggac	600
	aatTTTTTga ctctggcctc aatcaggta ggacta	636
40	<210> 55 <211> 711 <212> ADN <213> <i>Rhodotorula toruloides</i>	
45	<400> 55	
	cgcccgtcgc tactaccgat tgaatggctt agtgaggcct cgggattggc tatcgggagc	60
	tcgagagagc acctgactgc cgagaagttg tacgaacttg gtcatttaga ggaagtaaaa	120
50	gtcgtaaaca ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attagtgaat attaggggtg	180
	ccaacttaac ttggagcccg acctcactt tctaaccctg tgcatttgtc ttgggtagta	240
	gctcgtgtca gcgagcgaat cccatttcac ttacaaacac aaagtctatg aatgtaacaa	300
55	atTTataaca aaaaaactt tcaacaacgg atctcttggc tctcgcacg atgaagaacg	360
	cagcgaatg cgatacgtaa tgtgaattgc agaattcagt gaatcatcga atctttgaac	420
60	gcaccttgcg ctccatggta ttccgtggag catgcctgtt tgagtgtcat gaattcttca	480
	accacactct ttcttagtga atcaggcggg gtttggattc tgagcgttgc ttgcttcg	540

ES 2 909 143 T3

gcctagctcg ctcgtaatgc attagcatcc gcaatcgaac ttcggattga ctcggcgtaa 600
tagactattc gctgaggatt ctggtctctg actggagccg ggtaagatta aaggaagcta 660
5 ctaatcctca tgtctatctt ttgagattag acctcaaac aggtaggact a 711

<210> 56
<211> 753
<212> ADN
<213> *Rhodotourula terpendoidalis*

<400> 56
15 cgccccgctgc tactaccgat tgaatggctt agtgaggcct cgggactggc tattgggatc 60
tcgcgagaga acctgactgc tgggaagttg tacgaacttg gtcatttaga ggaagtaaaa 120
gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attaatgaat attagggatc 180
20 tcttttcatc aaagaggcct gaccttcatt cttctaccct gtgcactatt caaacattcg 240
gcagttggta atttggcttg taaaagagcc agacgactct gctgaattca ctcttaaact 300
ctaaagtata agaatgttac aaataaaaaca aataaaaactt tcaacaacgg atctcttggc 360
tctcgcatcg atgaagaacg cagcgaaatg cgataagtaa tgtgaattgc agaattcagt 420
gaatcatcga atctttgaac gcaccttgcg ctcgctggta ttccggcgag catgcctggt 480
30 tgagtgtcat gaaaacctca accttcaat tccttggtga attgtaaggt gtttggattc 540
tgaatgtttg ctggcttga gggcccttgg ctacttcaaa agcgaagctc attcgttaata 600
cattagcatc tcaatttcga atattcggat tgactcggcg taatagactt tattcgtcga 660
ggacaccttc acaaggtggc cgaatttcga ggtagaagct tccaattcga tcaaaagtca 720
ctcttagttt agacctcaga tcaggcagga cta 753
40

<210> 57
<211> 456
<212> ADN
45 <213> *Yarrowia lipolytica*

<400> 57
cgccccgctgc tactaccgat tgaatggttt agtgagacct tgggagggcg agatgagggg 60
50 ggcaaccctt tttgaacatc caaacttggg caaacttgat tatttagagg aagtaaaagt 120
cgtaacaagg tttccgtagg tgaacctgcg gaaggatcat tattgatttt atctatttct 180
gtggatttct ggtatattac agcgtcattt tatctcaatt ataactatca acaacggatc 240
55 tcttggctct cacatcgatg aagaacgcag cgaaccgcga tattttttgt gacttgcaga 300
tgtgaatcat caatctttga acgcacattg cgcggtatgg tattccgtac cgcacggatg 360
60 gaggagcgtg ttccctctgg gatcgcattg ctttcttgaa atggattttt taaactctca 420
attattacgt catttcacct ccttcatccg agatta 456

ES 2 909 143 T3

<210> 58
 <211> 709
 5 <212> ADN
 <213> *Rhodotorula glutinis*

 <400> 58
 10 cgccccgtcgc tactaccgat tgaatggcct agtgaggcct ccggattggc tattgggagc 60
 tcgcgagagc acctgactgc cgagaagttg tacgaacttg gtcatttaga ggaagtaaaa 120
 gtogtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attagtgaat attaggggtg 180
 15 ccaacttaac ttggaaccog accctcactt tctaaccctg tgcatttgtc ttgggtagta 240
 gcttgcgctgc gcgagcgaat cccatttcac ttacaaacac aaagtctatg aatgtaacaa 300
 atttataaca aacaaaactt tcaacaacgg atctcttggc tctcgcatcg atgaagaacg 360
 20 cagcgaaatg cgatacgtaa tgtgaattgc agaattcagt gaatcatcga atctttgaac 420
 gcaccttgcg ctccatggta ttccgtggag catgctgtt tgagtgtcat gaattcttca 480
 25 acccacctat ttcttagtga atcaggcggg gtttggattc tgagcgtcgc tggcctcacg 540
 gcctagctcg ctcgtaatgc attagcatcc gcaatcgaac ttcggattga ctcgcgctaa 600
 tagactatlc gctgaggatt ctggtctctg actggagccg ggtgagatta aaggaagcta 660
 30 ctaatcctca tgtctatctt gagattagac ctcaaatcag gtaggacta 709

 <210> 59
 35 <211> 500
 <212> ADN
 <213> *Yarrowia lipolytica*

 <400> 59
 40 gtccctgccc tttgtacaca ccgcccgtcg ctactaccga ttgaatggtt tagtgagacc 60
 ttgggagggc gagatgaggg gggcaacccc ttctgaacat ccaaacttgg tcaaacttga 120
 ttatttagag gaagtaaaag tcgtaacaag gtttccgtag gtgaacctgc ggaaggatca 180
 45 ttattgattt tatctatttc tgtggatttc tattctatta cagcgtcatt ttatctcaat 240
 tataactatc aacaacggat ctcttggtc tcacatcgat gaagaacgca gcgaaccgcg 300
 50 atatTTTTTg tgacttgacg atgtgaatca tcaatctttg aacgcacatt gcgcggtatg 360
 gcattccgta ccgcacggat ggaggagcgt gttccctctg ggatcgcatt gctttcttga 420
 aatggatttt ttaaactctc aattattacg tcatttcacc tccttcatcc gagattaccc 480
 55 gctgaactta agcatatcaa 500

 <210> 60
 60 <211> 707
 <212> ADN
 <213> *Lipomyces tetrasporus*

ES 2 909 143 T3

```

<400> 60
cgccccgtcgc tactaccgat tgaatggctt agtgaggcct cgggattggc tattgggagc      60
5  tcgcgagagc acctgactgc tgagaagttg tacgaacttg gtcatttaga ggaagtaaaa      120
   gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attagtgaat ctaggacgtc      180
   caacttaact tggagtccga aatctcactt tctaaccctg tgcactctgtt aattggaata      240
10  gtagctcttc ggagtgaacc accattcact tataaaacac aaagtctatg aatgtataca      300
   aatttataac aaaacaaaac tttaacaacac ggatctcttg gctctcgcac cgatgaagaa      360
15  cgcagcgaag tgcgatacgt aatgtgaatt gcagaattca gtgaatcatc gaatctttga      420
   acgcaccttg cgctccttgg tattccgagg agcatgcttg tttgagtgtc atgaaatctt      480
   caaccacact ctttcttagt gaatctggtg gtgcttggtt tctgagcgtc gctctgcttc      540
20  ggcttagctc gttcgtaatg cattagcatc cgcaaccgaa cttcggattg acttggcgta      600
   atagactatt cgctgaggat tctagtttac tagagccgag ttgggttaaa ggaagctcct      660
25  aatcctaaag tctatttttt gattagatct caaatcaggt aggacta                    707

<210> 61
<211> 457
30  <212> ADN
   <213> Yarrowia lipolytica

<400> 61
35  cgccccgtcgc tactaccgat tgaatggctt agtgagacct tgggagggcg agatgagggg      60
   ggcaaccctt tctgaacatc caaacttggc caaacttgat tatttagagg aagtaaaagt      120
   cgtaacaagg tttccgtagg tgaacctgcg gaaggatcat tattgatttt atctatttct      180
40  gtggatttct attctattac agcgtcattt tatctcaatt ataactatca acaacggatc      240
   tcttggctct cacatcgatg aagaacgcag cgaaccgcca tattttttgt gacttgcaga      300
   tgtgaatcat caatctttga acgcacattg cgcggtatgg cattccgtac cgcacggatg      360
45  gaggagcgtg ttccctctgg gatcgcattg ctttcttgaa atggattttt ttaaactctc      420
   aattattacg tcatttcacc tccttcatcc gagatta                    457

50  <210> 62
   <211> 1022
   <212> ADN
   <213> Lipomyces tetrasporus
55  <400> 62
   cgccccgtcgc tactaccgat tgaatggctt agtgaggcct tcggactggc tccagaaaat      60
   gggaaacatc tatcaggagc tggaaagttg gtcaaacttg gtcatttaga ggaagtaaaa      120
60  gtcgtaacaa ggtttccctc cgtagcactt actgaagcct tagcagcccg aaaaggcgaa      180

```

ES 2 909 143 T3

tgctagcgac tataaataaa tatggcggtc ttaaattgcta gtctctgatt agaggcgaca 240
 ttgccaaatt gcggggacat cctaaagatc ttgataccaa gctggtagtc gaaagacgcc 300
 5 agtggccgag ctaacagccc tgggtatggt aataattcaa gatatggaac aatgggtaat 360
 ccgcagccaa gtcctaaact acgcaagtag catggatgca gttcacaggc caaatggtga 420
 10 tgggtagatt actaaatctg cttaagatat ggtcgggtccc gctgtgagag cagatgggaa 480
 gctacaaaagc agactcgtga gtttgcgcaa acgtaactaa aaacgttccg taggtgaacc 540
 tgcggaagga tcattactga gtatttgtct ttaaagaca tctctctatc cataaactct 600
 15 tttttctaaa aagacatgat ttacacaatt agtctgaatg attatataaa aatcttcaaa 660
 actttcaaca acggatctct tggttctcgc atcgatgaag aacgcagcaa aatgcgataa 720
 20 gtattgtgaa ttgcaggatt ttgtgaatca tcgaatTTTT gaacgcacat tgcaccttct 780
 ggtattccgg agggatatacc tgtttgagcg tcatttataat actcaaaact tcgTTTTggt 840
 gatgggcaca tatctggtga gagctagatt tgctgaaat atagtggtag agattgctac 900
 25 gagttatgca agttagccaa tgctattaag ttaattcgtt ggtgaagcat gcggagcttt 960
 agtgatcgcc ttccttaact attggaattt ttctaatttt gacctcaaat caggcaggag 1020
 30 ta 1022
 <210> 63
 <211> 712
 <212> ADN
 35 <213> Rhodosporidium sphaerocarpum
 <400> 63
 cgcccgtcgc tactaccgat tgaatggctt agtgaggcct cgggaccggc tattgggagc 60
 40 tcgcgagagc acccgactgc tgggaagtgt tacgaacttg gtcatttaga ggaagtaaaa 120
 gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attagtgaat ataggacgtc 180
 45 caacttaact tggagtccga actctcactt tctaaccctg tgcatttggt tgggatagta 240
 gcctctcggg gtgaactcct attcactcat aaacacaaag tctatgaatg tatttaattt 300
 ataacaaaat aaaactttca acaacggatc tcttggctct cgcacgatg aagaacgcag 360
 50 cgaaatgcga taagtaatgt gaattgcaga attcagtga tcatcgaatc tttgaacgca 420
 ccttgcgctc catggtattc cgtggagcat gcctgtttga gtgtcatgaa tacttcaacc 480
 55 ctctctttt ctagtgaag agaagtgct tggtttctga gcgTTTTgct ggctcaccg 540
 tcgagctcgc tcgtaatgca ttagcatccg caatcgaact tcggattgac ttggcgtaat 600
 agactattcg ctgaggaatt ctaactctcg gattagagcc gggttgggtt aaaggaagct 660
 60 tctaataccta atgtctatat ttttagatta gatctcaaat caggtaggac ta 712

ES 2 909 143 T3

<210> 64
 <211> 631
 <212> ADN
 <213> *Trichosporon brassicae*

5

<400> 64
 cgcccgtcgc tactaccgat tgaatggctt agtgagacct ccggattggc gttgagaagc 60
 cggaacggc atctcttggc cgagaagttg gtcaaacttg gtcatttaga ggaagtaaaa 120
 10 gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attagtgatt gccttaattg 180
 gcttaaacta tatccaacta cacctgtgaa ctgttcgatt gaatcttcga ttcaatttta 240
 15 caaacattgt gtaaagaacg tcattagatc ataacaaaa aaaactttta acaacggatc 300
 tcttggtctc cgcacgatg aagaacgcag cgaaatgcga taagtaatgt gaattgcaga 360
 attcagtgaa tcatcgaatc tttgaacgca acttgcgctc tctggatttc cggagagcat 420
 20 gcctgtttga gtgtcatgaa atctcacaca tcaaggtttc ttgatgaagt ggatttggag 480
 gttgccagtc taactggctc ctcttaaagg agttagcata tttgattatt gctgtctggc 540
 25 gtaataagtt tcgctagttt ggcattttga agtgtgcttc taatcgtctt cggacaattt 600
 tttgactctg gcctcaaatc aggtaggact a 631

30

<210> 65
 <211> 627
 <212> ADN
 <213> *Cryptococcus curvatus*

35

<400> 65
 cgcccgtcgc tactaccgat tgaatggctt agtgagattt ccggattggc gttaggaagc 60
 cggaacggc atcctttggc tgagaagcta ctcaaacttg gtcatttaga ggaagtaaaa 120
 40 gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attagtgatt tgccttcggg 180
 ctaactatat ccataacacc tgtgaactgt tgattgactt cggccaatat tttacaaac 240
 attgtgtaat gaacgtoatg ttataataac aaatataact ttcaacaacg gatctcttgg 300
 45 ctctcgcacg gatgaagaac gcagcgaaat gcgataagta atgtgaattg cagaattcag 360
 tgaatcatcg aatctttgaa cgcaacttgc gctctctggg attccggaga gcatgcctgt 420
 50 ttgagtgtca tgaaatctca accattaggg tttcttaatg gcttggattt ggacgtttgc 480
 cagtcaaatg gctcgtctta aaagagttag tgaatttaac atttgtcttc tggcgtaata 540
 agtttcgctg ggctgatagt gtgaagtttg cttctaactg tccgcaagga caattcttga 600
 55 actctggcct caaatcaggt aggacta 627

60

<210> 66
 <211> 637
 <212> ADN
 <213> *Lipomyces starkeyi*

ES 2 909 143 T3

	<400> 66		
	cgccccgtcgc tactaccgat tgaatggctt agtgaggcct tcggactggc tccagaaaat	60	
5	gggaaacat tatcaggagc tggaaagttg gtcaaaacttg gtcatttaga ggaagtaaaa	120	
	gtcgtaaaca ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attactgagt atttgccttt	180	
10	tcaagacatc tctctatcca taaactcttt tttttaaaaa gacatgattt ataacaatta	240	
	gtctgaatga ttatttttaa atcttcaaaa ctttcaacaa cggatctctt ggttctcgca	300	
	tcgatgaaga acgcagcaaa ttgcgataag taatgtgaat tgcaggattt tgtgaatcat	360	
15	cgaatTTTTg aacgcacatt gcaccttctg gtattccgga gggataacct gtttgagcgt	420	
	catttatata ctcaaaactt acgttttggg gatgggcacg tatctggctt ctaagttaga	480	
20	tttgcctgaa atatagcggg agaggtoctt agaagcgatg caagttagcc aatgctatta	540	
	aagttaattc gttggtgacg catgttgagc ttttggtgaa gtcttcctta attattggaa	600	
	tttttttcta attttgacct caaatcaggc aggagta	637	
25			
	<210> 67		
	<211> 457		
	<212> ADN		
	<213> <i>Yarrowia lipolytica</i>		
30			
	<400> 67		
	cgccccgtcgc tactaccgat tgaatggttt agtgagacct tgggagggcg agatgagggg	60	
35	ggcaaccct tttgaacatc caaacttggg caaacttgat tatttagagg aagtaaaagt	120	
	cgtaacaagg tttccgtagg tgaacctgcg gaaggatcat tattgatttt atctatttct	180	
	gtggatttct attctattac agcgtcattt tatctcaatt ataactatca acaacggatc	240	
40	tcttggctct cacatcgatg aagaacgcag cgaaccgca tttttttgt gacttgcaga	300	
	tgtgaatcat caatctttga acgcacattg cgcggtatgg cattccgtac cgcacggatg	360	
45	gaggagcgtg ttccctctgg gatcgcattg ctttcttgaa atggattttt ttaaactctc	420	
	aattattacg tcatttcacc tccttcatcc gagatta	457	
50			
	<210> 68		
	<211> 631		
	<212> ADN		
	<213> <i>Trichosporon loubieri</i>		
55			
	<400> 68		
	cgccccgtcgc tactaccgat tgaatggctt agtgagacct ccggattggc gttgagaagc	60	
	cggcaacggc atctcttggc cgagaagttg gtcaaaacttg gtcatttaga ggaagtaaaa	120	
60	gtcgtaaaca ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attagtgatt gccatcttgg	180	
	cttaaactat atccatctac acctgtgaac cgtttgattg aatcttctga ttcaatttta	240	

ES 2 909 143 T3

```

caaacattgt gtaatgaacg tcattagatc ataataagaa aaaactttca acaacggatc      300
tcttggtctc cgcacatgatg aagaacgcag cgaaatgcga taagtaatgt gaattgcaga      360
5  attcagtgaa tcacatgaatc tttgaacgca acttgcgctc tctggatttc cggagagcat      420
gacctgttga gtgtcatgaa atctcaacca ttaggggttc ttaatggctt ggatttggag      480
10  gttgccattc taaatggctc ctcttaaaag agttagcgag ttttaactatt gctatctggc      540
gtaataagtt tcgctggaat ggtattgtga agcgcgcttc taatcgtctt cggacaattt      600
tttgactctg gcctcaaatc aggtaggact a                                     631
15  <210> 69
    <211> 476
    <212> ADN
    <213> Geotrichum vulgare
20  <400> 69
    cgcccgtcgc tactaccgat tgaatggctt agtgaggctt cggattgat tagttggaga      60
    gggagacttt tctgactgaa cgagaagcta gtcaaaacttg gtcattttaga ggaagtaaaa      120
25  gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attaaagatt taatattaat      180
    tgtgaaatta aaacgatatt acaaaaaaat catacaatca attataaaaa aatcaaaaac      240
30  ttttaacaat ggatctcttg gttctcgtat cgatgaagaa cgcagcgaac cgcgatattt      300
    cttgtgaatt gcagaagtga atcatcagtt tttgaacgca cattgcactt tggggtatcc      360
    cccaaagtat acttgttga gcgttgttcc tctcttgtaa ttgcattgct tttctaaaaa      420
35  atcgaatcaa attcgttga aacatccatt cttcaacctc agatcaagta ggatta          476
40  <210> 70
    <211> 710
    <212> ADN
    <213> Rhodosporidium toruloides
45  <400> 70
    cgcccgtcgc tactaccgat tgaatggctt agtgaggcct cggattggc tattgggagc      60
    tcgagagagc acctgactgc cgagaagttg tacgaacttg gtcattttaga ggaagtaaaa      120
50  gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attagtgaat attaggtgt      180
    ccaacttaac ttggagcccg acctcactt tctaacctg tgcatthtgc ttgggtagta      240
    gcttgcgta gcgagcgaat cccatttcac ttacaaacac aaagtctatg aatgtaacaa      300
55  atttataaca aaacaaaact ttcaacaacg gatctcttgg ctctcgcac gatgaagaac      360
    gcagcgaaat gcgatacgtg atgtgaattg cagaattcag tgaatcatcg aatctttgaa      420
    cgcaccttgc gctccatggt attccgtgga gcatgcctgt ttgagtgtca tgaattcttc      480
60  aaccacctc tttcttagtg aatcagggcg tgtttggatt ctgagcgtg ctggcttcgc      540

```

ES 2 909 143 T3

```

ggcctagctc gctcgtaatg cattagcadc cgcaatcgaa cttcggattg actcggcgta      600
atagactatt cgctgaggat tctgggtctct gactggagcc gggttaagggtt aaagggagct      660
5  actaatcctc atgtctatct tgagattaga cctcaaatca ggtaggacta      710

<210> 71
<211> 707
10 <212> ADN
    <213> Rhodotorula glutinis

<400> 71
15 cgccccgtcgc tactaccgat tgaatggcct agtgaggcct ccggattggc tattgggagc      60
    tcgcgagagc acctgactgc tgagaagttg tacgaacttg gtcatttaga ggaagtaaaa      120
    gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attagtgaat ctaggacgct      180
20 caacttaact tggagtccga actctcactt tctaacctg tgcatctggt aattggaata      240
    gtagctcttc ggagtgaacc accattcact tataaaacac aaagtctatg aatgtataca      300
25 aatttataac aaaacaaaac tttcaacaac ggatctcttg gctctcgcac cgatgaagaa      360
    cgcagcgaag tgcgatacgt aatgtgaatt gcagaattca gtgaatcatc gaatctttga      420
    acgcaccttg cgctccttgg tattccgagg agcatgcctg tttgagtgtc atgaaatctt      480
30 caaccacact ctttcttagt gaatctgggt gtgcttgggt tctgagcgtc gctctgcttc      540
    ggcttagctc gttcgtaatg cattagcadc cgcaaccgaa cttcggattg acttggcgta      600
35 atagactatt cgctgaggat tctagtttac tagagccgag ttgggttaaa ggaagctcct      660
    aatcctaaag tctatttttt gattagatct caaatcaggt aggacta      707

<210> 72
40 <211> 627
    <212> ADN
    <213> Rhodotorula aurantiaca

<400> 72
45 cgccccgtcgc tactaccgat tgaatggcct agtgagattt ccggattggc gtttaggaagc      60
    cggcaacggc atcctttggc tgagaagcta ctcaaacttg gtcatttaa ggaagtaaaa      120
50 gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attagtgatt tgccttcggg      180
    ctaactatat ccataacacc tgtgaactgt tgattgactt cggcacaat ttttacaac      240
    attgtgtaat gaacgtcatg ttataataac aatataact ttcaacaacg gatctcttgg      300
55 ctctcgcacg gatgaagaac gcagcgaat gcgataagta atgtgaattg cagaattcag      360
    tgaatcatcg aatctttgaa cgcaacttgc gctctctggg attccggaga gcatgcctgt      420
60 ttgagtgtca tgaaatctca accattaggg tttcttaatg gcttggattt ggacgtttgc      480
    cagtcaaatg gctcgtctta aaagagttag tgaattaac atttgtcttc tggcgttaata      540

```

ES 2 909 143 T3

agtttcgctg ggctgatagt gtgaagtttg cttctaactg tccgcaagga caattcttga 600
 actctggcct caaatcaggt aggacta 627

5
 <210> 73
 <211> 899
 <212> ADN
 <213> *Torulaspota delbrueckii*

10
 <400> 73
 cgccccgctg tagtaccgat tgaatggcct agtgaggcct caggatctgc ttagagaagg 60
 gggcaactcc atctcagagc ggagaatctg gtcaaaacttg gtcatttaga ggaactaaaa 120
15
 gtcgtaacaa ggtttccgta ggtgaacctg cggaaggatc attagagaaa tctatatgaa 180
 tgaagttaga ggacgtctaa agatactgta agagaggatc aggttcaaga ccagcgtta 240
20
 attgcgcggt tgcggcttgg ttcgcctttt gcggaacatg tcttttctcg ttgttaactc 300
 tacttcaact tctacaacac tgtggagttt tctacacaac ttttcttctt tgggaagata 360
 cgtcttgtgc gtgcttccca gagtgacaa acacaaacaa ctttttatta ttataaacca 420
25
 gtcaaaacca atttcgttat gaaattaaat atatttaaaa ctttcaacaa cggatctctt 480
 ggttctcgca tcgatgaaga acgcagcga atgcgatagc taatgtgaat tgcagaattc 540
30
 cgtgaatcat cgaatctttg aacgcacatt gcgccccttg gtattccagg gggcatgctt 600
 gtttgagcgt catttccttc tcaaacatc atgtttggta gtgagtgata ctctgtcaag 660
 ggttaacttg aaattgctag cctgttattt ggttgtgatt ttgctggcct ggatgacttt 720
35
 gtccagtcta gctaataaccg aattgtcgta ttaggtttta ccaacttcgg cagactgtgt 780
 gttggctcgg gcgctttaa gactttgtcg taaacgattt atcgtttggt tgagcttttc 840
40
 gcatacgcaa tccgggcaaa caatactctc aaagtttgac ctcaaatcag gtaggaata 899

45
 <210> 74
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Prototheca moriformis*

<400> 74
 tcacttcatg ccggcgttcc 20

50
 <210> 75
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Prototheca moriformis*

<400> 75
 gcgctcctgc ttggctcgaa 20

60
 <210> 76
 <211> 733

ES 2 909 143 T3

```

<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
5 <223> secuencia de direccionamiento génico

<400> 76
gctcttcgag acgtggtctg aatcctccag gcggggttcc ccgagaaaga aagggtgccg      60
10 atttcaaagc agagccatgt gccgggcctt gtggcctgtg ttggcgccta ttagtgcacc      120
   cccctcacc caattgtcgc cagtttgccg aatccataaa ctcaaaactg cagcttctga      180
   gctgcgctgt tcaagaacac ctctgggggtt tgctcaccgg cgaggtcgac gccagcatg      240
15 gctatcaaga cgaacaggca gcctgtggag aagcctccgt tcacgatcgg gacgctgcgc      300
   aaggccatcc ccgcgactg ttcgagcgc tcggcgcttc gtagcagcat gtacctggcc      360
20 tttgacatcg cggtcatgtc cctgctctac gtcgcgtcga cgtacatcga ccctgcgccg      420
   gtgcctacgt gggtaagta tggcgtcatg tggccgctct actggttctt ccagggtgtg      480
   gtgaggggtg tggttgcccg tatcgaggtc ctggtggcgc gcatggggga gaaggcgcct      540
25 gtcccgcctg cccccccg caccctcccg gcaccttcca gggcgcttc ggcacgggtg      600
   tctgggtgtg cgcgcacgag tgcggccacc aggccttttc ctccagccag gccatcaacg      660
30 acggcgtggg octggtgttc cacagcctgc tgctggtgcc ctactactcc tggaagcact      720
   cgcaccgggt acc                                          733

35 <210> 77
   <211> 739
   <212> ADN
   <213> Secuencia Artificial

40 <220>
   <223> secuencia de direccionamiento génico

   <400> 77
45 ccgccaccac tccaacacgg ggtgcctgga caaggacgag gtgtttgtgc cgcgcaccg      60
   cgcagtggcg cagaggggcc tggagtggga ggagtggctg cccatccgca tgggcaaggt      120
   gctggtcacc ctgaccctgg gctggcggct gtacctcatg ttcaacgtcg cctcgcggcc      180
50 gtaccgcgac ttcgccaacc accttgacct gtggtcgccc atcttcagca agcgcgagcg      240
   catcgaggtg gtcattctcg acctggcgct ggtggcggtg ctcagcgggc tcagcgtgct      300
   gggcgcacc atgggetggg cctggctggt caagacctac gtggtgccct acctgatcgt      360
55 gaacatgtgg ctcgtgctca tcacgctgct ccagcacacg caccgcgccc tgccgacta      420
   cttcgagaag gactgggact ggctgcgccc gcctatggcc accgtggacc gctccatggg      480
60 cccgccttc atggacaaca tctgcacca catctccgac acccagctgc tgcaccacct      540
   cttcagcacc atcccgcact accacgccga ggaggcctcc gccgcatca ggccatcct      600

```

ES 2 909 143 T3

	gggcaagtac taccagtccg acagccgctg ggtcggccgc gccctgtggg aggactggcg	660
5	cgactgccgc tacgtcgtcc cggacgcgcc cgaggacgac tccgcgctct ggttccacaa	720
	gtgagtgagt gagaagagc	739
10	<210> 78 <211> 2327 <212> ADN <213> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
15	<400> 78 ctttcttgcg ctatgacact tccagcaaaa ggtagggcgg gctgcgagac ggcttcccgg	60
	cgctgcatgc aacaccgatg atgcttcgac cccccgaagc tccttcgggg ctgcatgggc	120
20	gctccgatgc cgctccaggg cgagcgtgt ttaaatagcc aggccccga ttgcaaagac	180
	attatagcga gctaccaaag ccatattcaa acacctagat cactaccact tctacacagg	240
	ccactcgagc ttgtgatcgc actccgctaa gggggcgccct cttcctcttc gtttcagtca	300
25	caaccgcgaa acggcgcgcc atgctgctgc aggccttctt gttcctgctg gccggcttcg	360
	ccgccaagat cagcgcctcc atgacgaacg agacgtccga ccgccccctg gtgcacttca	420
30	cccccaacaa gggctggatg aacgaccca acggcctgtg gtacgacgag aaggacgcca	480
	agtggcacct gtacttccag tacaaccgga acgacaccgt ctgggggacg cccttgttct	540
	ggggccacgc cacgtccgac gacctgacca actgggagga ccagcccatc gccatcgccc	600
35	cgaagcgaac cgactccggc gccttctccg gctccatggt ggtggactac aacaacacct	660
	ccggcttctt caacgacacc atcgaccgc gccagcgtg cgtggccatc tggacctaca	720
40	acaccccgga gtccgaggag cagtacatct cctacagcct ggacggcggc tacaccttca	780
	ccgagtacca gaagaacccc gtgctggccg ccaactccac ccagttccgc gacccgaagg	840
	tcttctggta cgagccctcc cagaagtgga tcatgaccgc ggccaagtcc caggactaca	900
45	agatcgagat ctactcctcc gacgacctga agtcctggaa gctggagtcc gcgttcgcca	960
	acgagggcct cctcggctac cagtacgagt gccccggcct gatcgaggtc cccaccgagc	1020
50	aggaccccag caagtcctac tgggtgatgt tcatctccat caaccccggc gccccggccg	1080
	gcggctcctt caaccagtac ttcgtcggca gcttcaacgg caccacttc gaggccttcg	1140
	acaaccagtc ccgcgtggtg gacttcggca aggactacta cgccctgcag accttcttca	1200
55	acaccgacc gacctacggg agcgccttg gcatcgcgtg ggcctccaac tgggagtact	1260
	ccgccttcgt gccaccaaac ccttggcgt cctccatgtc cctcgtgcgc aagttctccc	1320
60	tcaacaccga gtaccaggcc aaccgggaga cggagctgat caacctgaag gccgagccga	1380
	tcctgaacat cagcaacgcc ggccccgga gccggttcgc caccaacacc acggtgacga	1440

ES 2 909 143 T3

	aggccaacag ctacaacgtc gacctgtcca acagcaccgg caccctggag ttcgagctgg	1500
	tgtacgccgt caacaccacc cagacgatct ccaagtccgt gttcgcggac ctctccctct	1560
5	ggttcaaggg cctggaggac cccgaggagt acctccgcat gggcttcgag gtgtcccggt	1620
	cctccttctt cctggaccgc gggaacagca aggtgaagtt cgtgaaggag aaccctact	1680
10	tcaccaaccg catgagcgtg aacaaccagc cttcaagag cgagaacgac ctgtcctact	1740
	acaagggtgta cggcttgctg gaccagaaca tcctggagct gtacttcaac gacggcgacg	1800
	tcgtgtccac caacacctac ttcatgacca ccgggaacgc cctgggctcc gtgaacatga	1860
15	cgacgggggt ggacaacctg ttctacatcg acaagttcca ggtgcgcgag gtcaagtgac	1920
	aattggcagc agcagctcgg atagtatcga cacactctgg acgctggctg tgtgatggac	1980
20	tgttgccgcc acacttgctg ccttgacctg tgaatatccc tgccgctttt atcaaacagc	2040
	ctcagtggtt ttgatcttgt gtgtacgcgc ttttgcgagt tgctagctgc ttgtgctatt	2100
	tgccaatacc acccccagca tccccttccc tcgtttcata tcgcttgcat cccaaccgca	2160
25	acttatctac gctgtcctgc tatccctcag cgctgctcct gctcctgctc actgcccctc	2220
	gcacagcctt ggtttgggct ccgcctgtat tctcctggta ctgcaacctg taaaccagca	2280
30	ctgcaatgct gatgcacggg aagtagtggg atgggaacac aatgga	2327
	<210> 79	
	<211> 735	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> secuencia de direccionamiento génico	
40	<400> 79	
	gctcttcgag gggctggtct gaatccttca ggcgggtggt acccgagaaa gaaagggtgc	60
	cgatttcaaa gcagaccat gtgccgggcc ctgtggcctg tgttggcgcc tatgtagtca	120
45	ccccccctca cccaattgtc gccagtttgc gcaactcata aactcaaaac agcagcttct	180
	gagctgcgct gttcaagaac acctctgggg tttgctcacc cgcgaggtcg acgcccagca	240
50	tggtatcaa gacgaacagg cagcctgtgg agaagcctcc gttcacgatc gggacgctgc	300
	gcaaggccat ccccgcgcac tgtttcgagc gctcggcgct tcgtagcagc atgtacctgg	360
	cctttgacat cgcggtcatg tcctgctct acgtcgcgtc gacgtacatc gaccctgcac	420
55	cggtgcctac gtgggtcaag tacggcatca tgtggccgct ctactggttc ttccaggtgt	480
	gtttgagggt tttggttgcc cgtattgagg tcctggtggc gcgcatggag gagaaggcgc	540
60	ctgtcccgt gaccccccg gctaccctcc cggcaccttc cagggcgctc tcggcacggg	600
	tgtctgggtg tgcgcgcacg agtgcggcca ccaggccttt tcctccagcc aggccatcaa	660

ES 2 909 143 T3

	cgacggcgtg ggcctggtgt tccacagcct gctgctggtg cctactact cctggaagca	720
	ctcgcaccgg gtacc	735
5	<210> 80 <211> 739 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
10	<220> <223> secuencia de direccionamiento génico	
	<400> 80	
15	ccgccaccac tccaacacgg ggtgcctgga caaggacgag gtgtttgtgc cgccgcaccg	60
	cgcagtggcg cagcagggcc tggagtggga ggagtggctg cccatccgca tgggcaaggt	120
20	gctggtcacc ctgaccctgg gctggccgct gtacctcatg ttcaacgtcg cctcgcggcc	180
	gtaccgcgcg ttcgccaacc actttgacct gtggtcgcc atcttcagca agcgcgagcg	240
	catcgaggtg gtcctctccg acctggcgct ggtggcggtg ctcagcgggc tcagcgtgct	300
25	gggccgcacc atgggctggg cctggctggt caagacctac gtggtgccct acctgatcgt	360
	gaacatgtgg ctcgtgctca tcacgtgct ccagcacag caccgcgcg tgccgcacta	420
30	cttcgagaag gactgggact ggctgcggg cgccatggcc accgtggacc gctccatggg	480
	cccgccttc atggacaaca tctgcacca catctccgac acccagctgc tgcaccacct	540
	cttcagcacc atcccgact accacgcca ggaggcctcc gccgcatca ggccatcct	600
35	gggcaagtac taccagtcg acagccgctg ggtggccgc gccctgtggg aggactggcg	660
	cgactgccg tacgtcgtcc cggacgcgcc cgaggacgac tccgcgtct ggttccaaa	720
40	gtgagtgagt gagaagagc	739
	<210> 81 <211> 726 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
45	<220> <223> secuencia donadora genómica	
	<400> 81	
50	gctcttcgcc gccgcaactc ctgctcgagc gcgccgcgc gtgcgccc accgccttgg	60
	ccttttcgcc gcgctcgtgc gcgtcgtga tgtccatcac caggatccatg aggtctgct	120
55	tgccgagct gagcactgc ttgctccgg cgccaagag gagcatgagg gaggactcct	180
	ggtccaggt cctgacgtgg tcgcggtct gggagcgggc cagcatcatc tggctctgcc	240
	gcaccgaggc cgcctccaac tggctcctca gcagccgag togccgccga ccctggcaga	300
60	ggaagacag tgaggggggt atgaattgta cagaacaacc acgagccttg tctaggcaga	360

ES 2 909 143 T3

	atccctacca gtcattggctt tacctggatg acggcctgcg aacagctgtc cagcgacct	420
	cgctgcccgc gcttctcccg cacgcttctt tccagcaccg tgatggcgcg agccagcgcc	480
5	gcacgctggc gctgcgcttc gccgatctga ggacagtccg ggaactctga tcagtctaaa	540
	cccccttgcg cgtagtggt gccatccttt gcagaccggt gagagccgac ttgttgctgc	600
10	ccacccccca caccacctcc tcccagacca attctgtcac ctttttgcg aaggcatcgg	660
	cctcggcctg cagagaggac agcagtgcc agccgctggg ggttgccgga tgcacgctca	720
	ggtacc	726
15	<210> 82 <211> 3635 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
20	<220>	
	<223> construcción de expresión relevante	
	<400> 82	
25	ctttcttgcg ctatgacact tccagcaaaa gtagggcg gctgcgagac ggcttcccgg	60
	cgctgcatgc aacaccgatg atgcttcgac cccccgaagc tccttcgggg ctgcatgggc	120
30	gctccgatgc cgctccaggc cgagcgtgt ttaaatagcc agggccccga ttgcaaagac	180
	attatagcga gctaccaaag ccatattcaa acacctagat cactaccact tctacacagg	240
	ccactcgagc ttgtgatcgc actccgctaa gggggcgct cttcctcttc gtttcagtca	300
35	caaccgcaa actctagaat atcaatgatc gagcaggacg gcctccacgc cggtcccc	360
	gccgcctggg tggagcgct gttcggtac gactgggccc agcagaccat cggtgctcc	420
40	gacgcccggc tggccgctt gtccgccag ggccgccc tgctgttcgt gaagaccgac	480
	ctgtccggcg ccctgaacga gctgcaggac gaggccgcc gcctgtcctg gctggccacc	540
	accggcgtgc cctgcgccgc cgtgctggac gtggtgaccg aggcggccg cgactggtg	600
45	ctgctgggcg aggtgcccg ccaggacctg ctgtcctccc acctggcccc cgccgagaag	660
	gtgtccatca tggccgacgc catgcgccc ctgcacacc tggacccgc cacctgcccc	720
	ttcgaccacc aggccaaagc ccgcatcgag cgcgcccga cccgcatgga ggccggcctg	780
50	gtggaccagc acgacctgga cgaggagcac cagggcctgg ccccgccga gctgttcgcc	840
	cgctgaagc cccgcatgcc cgacggcgag gacctggtg tgaccacgg cgacgcctgc	900
55	ctgcccaca tcatggtgga gaacggcgc ttctccgct tcatgactg cgccgcctg	960
	ggcgtggccg accgctacca ggacatgcc ctggccacc gcgacatcgc cgaggagctg	1020
	ggcggcgagt gggccgacc cttcctggtg ctgtacggca togccgccc cgactcccag	1080
60	cgcatcgcct tctaccgct gctggacgag ttcttctgac aattggcagc agcagctcgg	1140

ES 2 909 143 T3

	atagtatcga cacactctgg acgctggtcg tgtgatggac tgttgccgcc acacttgctg	1200
	ccttgacctg tgaatatccc tgccgctttt atcaaacagc ctcagtgtgt ttgatcttgt	1260
5	gtgtacgcgc ttttgcgagt tgctagctgc ttgtgctatt tgccaatacc acccccagca	1320
	tccccttccc tcgtttcata tcgcttgcac cccaaccgca acttatctac gctgtcctgc	1380
10	tatccctcag cgctgctcct gctcctgctc actgcccctc gcacagcctt ggtttgggct	1440
	ccgctgtat tctcctggta ctgcaacctg taaaccagca ctgcaatgct gatgcacggg	1500
	aagtagtggg atgggaacac aaatggagga tcccgcgtct cgaacagagc gcgcagagga	1560
15	acgctgaagg tctcgcctct gtcgcacctc agcgcggcat acaccacaat aaccacctga	1620
	cgaatgcgct tggttcttcg tccattagcg aagcgtccgg ttcacacacg tgccacgttg	1680
20	gcgaggtggc aggtgacaat gatcggtgga gctgatggtc gaaacgttca cagcctaggg	1740
	atatcgaatt ctttcttgc gctatgacac ttccagcaaa aggtagggcg ggctgcgaga	1800
	cggttcccc gcgctgcatg caacaccgat gatgcttca cccccgaag ctcttcggg	1860
25	gctgcatggg cgctccgatg ccgctccagg gcgagcgctg tttaaatagc caggccccg	1920
	attgcaaaga cattatagcg agctacaaaa gccatattca aacacctaga tcaactaccac	1980
30	ttctacacag gccactcgag cttgtgatcg cactccgcta agggggcgcc tcttctctt	2040
	cgtttcagtc acaaccgca aacactagta tggccaccgc atccactttc tcggcgttca	2100
	atgcccgctg cggcgacctg cgtcgcctcg cgggctccgg gccccggcgc ccagcgaggc	2160
35	ccctccccgt gcgcgggcgc gccccgact ggtccatgct gttcgccgtg atcaccacca	2220
	tcttctcgc cgccgagaag cagtggacca acctggagtg gaagcccaag cccaaccccc	2280
40	cccagctgct ggacgaccac ttcgcccc acggcctggg gttccgccc accttcgcca	2340
	tccgcagcta cgaggtgggc cccgaccgct ccaccagcat cgtggccgtg atgaaccacc	2400
	tgcaggaggc cgccctgaac cacgccaagt ccgtgggcat cctgggcgac ggcttcggca	2460
45	ccaccctgga gatgtccaag cgcgacctga tctgggtggg gaagcgcacc cacgtggccg	2520
	tggagcgcta cccgcctgg ggcgacaccg tggaggtgga gtgctgggtg ggcgcctccg	2580
50	gcaacaacgg ccgccccac gacttcttgg tgcgcgactg caagaccggc gagatcctga	2640
	cccgctgcac ctccctgagc gtgatgatga acaccgcac ccgccgctg agcaagatcc	2700
	ccgaggaggt gcgcggcgag atcgccccg cttcatcga caacgtggcc gtgaaggacg	2760
55	aggagatcaa gaagccccag aagctgaacg actccaccgc cgactacatc cagggcggcc	2820
	tgacccccg ctggaacgac ctggacatca accagcacgt gaacaacatc aagtacgtgg	2880
60	actggatcct ggagaccgtg cccgacagca tcttcgagag ccaccacatc tcctccttca	2940
	ccatcgagta ccgccgcgag tgcaccatgg acagcgtgct gcagtccctg accaccgtga	3000

ES 2 909 143 T3

	gcgggcgctc ctccgaggcc ggctgggtgt gcgagcacct gctgcagctg gagggcggca	3060
	gcgaggtgct ggcgcgccaag accgagtggc gccccaaact gaccgactcc ttccgcggca	3120
5	tcagcgtgat ccccgccgag tccagcgtga tggactacaa ggaccacgac ggcgactaca	3180
	aggaccacga catcgactac aaggacgacg acgacaagtg actcgaggca gcagcagctc	3240
10	ggatagtatc gacacactct ggacgctggc cgtgtgatgg actggttgcg ccacacttgc	3300
	tgccttgacc tgtgaatata cctgcccgtt ttatcaaaaca gcctcagtgt gtttgatctt	3360
	gtgtgtacgc gcttttgcga gttgctagct gcttgtgcta tttgcgaata ccaccccag	3420
15	catccccttc cctcgtttca tatcgcttgc atcccaaccg caacttatct acgctgtcct	3480
	gctatccctc agcgtgctc ctgctcctgc tcaactgcccc tcgcacagcc ttggtttggg	3540
20	ctccgcctgt attctcctgg tactgcaacc tgtaaaccag cactgcaatg ctgatgcacg	3600
	ggaagtagtg ggatgggaac acaaatggaa agctt	3635
25	<210> 83	
	<211> 1096	
	<212> ADN	
	<213> Prototheca moriformis	
30	<400> 83	
	ccaggcaggc ggtagggttg ccgattgctt gagcgaattg gaagatataa ttttttgtgg	60
	tgtccctgga cgctgtttgt ggcgctcctt tttggagaag attgcgtggg ggagctttcc	120
35	atgtaccacg cttccttctg aaaggattct ggccgagtcc tgatgagccc aaagaaaaca	180
	cctgcctttc agtgcctggca ctctgaaaac gtcaacagat gattatacat gtcacaaaag	240
	gcagccgatt aggaacggga gctctggccg ttcgtttggc tgcttgggct gattgaagtg	300
40	atccaccctg ttgcaatgaa ggcggtcgag tcgaattatc gaccggagct gtcgggaagg	360
	cgctccggggc agagtgaggt gctgcggcct gttgtgctt caaaaagacc ccggtagccc	420
45	aacaatcacg aacgaaagga atataattgc ttgcatacta tacattcagt ttctatgtgg	480
	cgggtagaca agtctcatgg gcttctaaag gctgtccctt gaaggctact tataaaaact	540
	tgctgcgcca tggcacggat cgcgcttgcg caggctgcaa ccctgcgcgc aaggtaaaat	600
50	acacagcaaa agatactaac agaatttcta aaaacattta aatatttgtt tcgaccagcc	660
	aattgtggtc gtaggcacgc aaaagacttt gttttgcgcc caccgagcat ccacgctggc	720
55	agtcaagcca gtccgatgtg cattgcgtgg cagcatcgag gagcatcaaa aacctcgtgc	780
	acgcttttct gtcaatcatc atcaaccact ccacatgta taccgatgc atcgcggtgc	840
	gcagcgcgcc acgctgcca gaccgocca aaaaccagc agcggcgaaa gcaaatcttc	900
60	acttgcccga aaccccgagc agcggcattc acacgtgggc gaaaaccca cttgccctaa	960
	caggcgtatg tctgctgtca cgatgcctga caacggtatt atagatatac actgattaat	1020

ES 2 909 143 T3

	gtttgagtgt gtgcgagtcg cgaatcagga atgaattgct agtaggcact cgcaccgggc	1080
5	gggggccgag ggacca	1096
	<210> 84	
	<211> 1065	
	<212> ADN	
10	<213> <i>Prototheca moriformis</i>	
	<400> 84	
	ggccgacagg acgcgcgtca aagggtgctgg tcgtgtatgc cctggccggc aggtcgttgc	60
15	tgctgctggt tagtgattcc gcaaccctga ttttggcgtc ttattttggc gtggcaaacg	120
	ctggcgcccc cgagccgggc cggcggcgat gcggtgcccc acggctgccg gaatccaagg	180
20	gaggcaagag cgcccgggtc agttgaaggg ctttacgcgc aaggtagcgc cgctcctgca	240
	aggctgctggt gtggaattgg acgtgcaggt cctgctgaag ttcctccacc gcctcaccag	300
	cggacaaagc accggtgtat caggtccgtg tcatccactc taaagagctc gactacgacc	360
25	tactgatggc cctagattct tcatcaaaaa cgctgagac acttgcccag gattgaaact	420
	ccctgaaggg accaccaggg gccctgagtt gttccttccc cccgtggcga gctgccagcc	480
30	aggctgtacc tgtgatcgag gctggcggga aaataggctt cgtgtgctca ggtcatggga	540
	ggtgcaggac agctcatgaa acgccaacaa tcgcacaatt catgtcaagc taatcagcta	600
	tttctcttc acgagctgta attgtcccaa aattctggtc taccgggggt gatccttogt	660
35	gtacggggccc ttccctcaac cctaggtatg cgcgcatgcg gtcgccgcgc aactcgcgcg	720
	agggccgaggt gtttgggacg ggccgtcccg aaatgcagtt gcaccggat gcgtggcacc	780
40	ttttttgcga taatttatgc aatggactgc tctgcaaaat tctggctctg tcgccaaccc	840
	taggatcagc ggcgtaggat ttcgtaatca ttcgtcctga tggggagcta cgcactacc	900
	taatatcagc ccgactgcct gacgccagcg tccacttttg tgcacacatt ccattcgtgc	960
45	ccaagacatt tcattgtggt gcgaagcgtc cccagttacg ctcacctggt tcccgaacctc	1020
	cttactgttc tgtcgacaga gcgggcccac aggccggctg cagcc	1065
50	<210> 85	
	<211> 408	
	<212> ADN	
	<213> <i>Chlorella vulgaris</i>	
55	<400> 85	
	gcagcagcag ctcggatagt atcgacacac tctggacgct ggtcgtgtga tggactgttg	60
	ccgccacact tgctgccttg acctgtgaat atccctgccg cttttatcaa acagcctcag	120
60	tgtgtttgat cttgtgtgta cgcgcttttg cgagttgcta gctgcttgtg ctatttgca	180
	ataccacccc cagcatcccc ttccctogtt tcatatcgct tgcacccaa ccgcaactta	240

ES 2 909 143 T3

	tctacgctgt cctgctatcc ctacagcgtg ctctgctcc tgctcaactgc ccctcgcaca	300
5	gccttggttt gggctccgcc tgtattctcc tggactgca acctgtaaac cagcaactgca	360
	atgctgatgc acgggaagta gtgggatggg aacacaaatg gaggatcc	408
10	<210> 86 <211> 120 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
15	<220> <223> construcción sintética	
	<400> 86 actagtatgg ccaccgcac cactttctcg gcgttcaatg cccgctgcgg cgacctgctg	60
20	cgctcggcgg gctccgggcc cgggcgccca gcgaggcccc tccccgtgcg cgggcgcgcc	120
25	<210> 87 <211> 1038 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
30	<220> <223> construcción sintética	
	<400> 87 actagtatgg ccaccgcac cactttctcg gcgttcaatg cccgctgcgg cgacctgctg	60
35	cgctcggcgg gctccgggcc cgggcgccca gcgaggcccc tccccgtgcg cgggcgcgcc	120
	cgctcctacg aggtgggcat caacaagacc gccaccgtgg agaccatcgc caacctgctg	180
	caggaggtgg gctgcaacca cggccagtcc gtgggcttct ccaccgacgg cttcgccacc	240
40	accacctcca tgcgcaagat gcacctgatc tgggtgaccg cccgcatgca catcgagatc	300
	tacaagtacc ccgcctggtc cgactgtgtg gaggtggaga cctggtgcca gtccgagggc	360
45	cgcatcggca cccgccgcga ctggatcctg accgactacg ccaccggcca gatcatcggc	420
	cgcgccacct ccaagtgggt gatgatgaac caggacaccc gccgcctgca gaaggtgacc	480
	gacgacgtgc gcgaggagta cctggtgttc tgcccccgcg agctgcgcct ggccttcccc	540
50	gaggagaaca accgctcctc caagaagatc tccaagctgg aggaccccg ccaagtactcc	600
	aagctgggcc tggtgccccg ccgcgcgcac ctggacatga accagcacgt gaacaacgtg	660
55	acctacatcg gctgggtgct ggagtccatc ccccaggaga tcatcgacac ccacgagctg	720
	cagaccatca ccctggacta ccgccgcgag tgccagcacg acgacatcgt ggactccctg	780
	acctccgtgg agccctccga gaacctggag gccgtgtccg agctgcgcgg caccaacggc	840
60	tccgccacca ccaccgccgg cgacgaggac tgccgcaact tctgcacct gctgcgcctg	900
	tccggcgacg gcctggagat caaccgcggc cgcaccgagt ggcgcaagaa gtccgccccg	960

ES 2 909 143 T3

atggactaca aggaccacga cggcgactac aaggaccacg acatcgacta caaggacgac 1020
gacgacaagt gaatcgat 1038

5

<210> 88
<211> 371
<212> PRT
10 <213> Ricinus communis

<400> 88

15 Met Leu Lys Val Pro Cys Cys Asn Ala Thr Asp Pro Ile Gln Ser Leu
1 5 10 15

20 Ser Ser Gln Cys Arg Phe Leu Thr His Phe Asn Asn Arg Pro Tyr Phe
20 25 30

25 Thr Arg Arg Pro Ser Ile Pro Thr Phe Phe Ser Ser Lys Asn Ser Ser
35 40 45

30 Ala Ser Leu Gln Ala Val Val Ser Asp Ile Ser Ser Val Glu Ser Ala
50 55 60

35 Ala Cys Asp Ser Leu Ala Asn Arg Leu Arg Leu Gly Lys Leu Thr Glu
65 70 75 80

40 Asp Gly Phe Ser Tyr Lys Glu Lys Phe Ile Val Arg Ser Tyr Glu Val
85 90 95

45 Gly Ile Asn Lys Thr Ala Thr Val Glu Thr Ile Ala Asn Leu Leu Gln
100 105 110

50 Glu Val Gly Cys Asn His Ala Gln Ser Val Gly Phe Ser Thr Asp Gly
115 120 125

55 Phe Ala Thr Thr Thr Ser Met Arg Lys Met His Leu Ile Trp Val Thr
130 135 140

60 Ala Arg Met His Ile Glu Ile Tyr Lys Tyr Pro Ala Trp Ser Asp Val
145 150 155 160

65 Val Glu Val Glu Thr Trp Cys Gln Ser Glu Gly Arg Ile Gly Thr Arg
165 170 175

70 Arg Asp Trp Ile Leu Thr Asp Tyr Ala Thr Gly Gln Ile Ile Gly Arg
180 185 190

75 Ala Thr Ser Lys Trp Val Met Met Asn Gln Asp Thr Arg Arg Leu Gln

ES 2 909 143 T3

	195	200	205	
5	Lys Val Thr Asp Asp Val Arg Glu Glu Tyr Leu Val Phe Cys Pro Arg 210 215 220			
10	Glu Leu Arg Leu Ala Phe Pro Glu Glu Asn Asn Arg Ser Ser Lys Lys 225 230 235 240			
15	Ile Ser Lys Leu Glu Asp Pro Ala Gln Tyr Ser Lys Leu Gly Leu Val 245 250 255			
20	Pro Arg Arg Ala Asp Leu Asp Met Asn Gln His Val Asn Asn Val Thr 260 265 270			
25	Tyr Ile Gly Trp Val Leu Glu Ser Ile Pro Gln Glu Ile Ile Asp Thr 275 280 285			
30	His Glu Leu Gln Thr Ile Thr Leu Asp Tyr Arg Arg Glu Cys Gln His 290 295 300			
35	Asp Asp Ile Val Asp Ser Leu Thr Ser Val Glu Pro Ser Glu Asn Leu 305 310 315 320			
40	Glu Ala Val Ser Glu Leu Arg Gly Thr Asn Gly Ser Ala Thr Thr Thr 325 330 335			
45	Ala Gly Asp Glu Asp Cys Arg Asn Phe Leu His Leu Leu Arg Leu Ser 340 345 350			
50	Gly Asp Gly Leu Glu Ile Asn Arg Gly Arg Thr Glu Trp Arg Lys Lys 355 360 365			
55	Ser Ala Arg 370			
60	<210> 89 <211> 312 <212> ADN <213> Chlamydomonas reinhardtii <400> 89 ctttcttgcg ctatgacact tccagcaaaa ggtagggcgg gctgcgagac ggcttcccgg 60 cgctgcatgc aacaccgatg atgcttogac cccccgaagc tccttcgggg ctgcatgggc 120 gctccgatgc cgctccaggg cgagcgctgt ttaaatagcc aggccccga ttgcaaagac 180 attatagcga gctaccaaag ccatattcaa acacctagat cactaccact tctacacagg 240 cactcgagc ttgtgatcgc actccgctaa gggggcgcct cttcctcttc gtttcagtca 300			

ES 2 909 143 T3

caacccgcaa ac 312

5 <210> 90
 <211> 595
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Porción de construcción FADc del casete de expresión de ARN horquillado

<400> 90

15 actagtatgg ctatcaagac gaacaggcag cctgtggaga agcctccgtt cacgatcggg 60
 acgctgcgca aggccatccc cgcgactgt ttcgagcgcg cggcgcttcg tagcagcatg 120
 tacctggcct ttgacatcgc ggtcatgtcc ctgctctacg tcgctcgcac gtacatcgac 180

20 cctgcaccgg tgcctacgtg ggtcaagtac ggcacatcatgt ggccgctcta ctggttcttc 240
 cagggtgtgt tgaggggttt ggttgcccgt attgaggtcc tgggtggcgcg catggaggag 300
 aaggcgcctg tcccgtgac cccccggct accctcccgg caccttcag ggcgcgtacg 360

25 ggaagaacca gtagagcggc cacatgatgc cgtacttgac ccacgtaggc accggtgcag 420
 ggtcgatgta cgtcagcgcg acgtagagca gggacatgac cgcgatgtca aaggccaggt 480

30 acatgctgct acgaagcgcg ggcgctcga aacagtgcgc ggggatggcc ttgcgcagcg 540
 tcccgatcgt gaacggaggc ttctccacag gctgcctggt cgtcttgata gccat 595

35 <210> 91
 <211> 6101
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> construcción de casete de expresión FADc de ARN horquillado

<400> 91

45 gctcttcgcc gccgccactc ctgctcgagc gcgccgcgc gtgcgccgcc agcgccttgg 60
 ccttttcgcc gcgctcgtgc gcgctcgtga tgtccatcac cagggtccatg aggtctgctt 120
 tgcgccggct gagccactgc ttcgtccggg cggccaagag gagcatgagg gaggactcct 180

50 ggtccagggt cctgacgtgg tcgcggtctt gggagcgggc cagcatcatc tggctctgcc 240
 gcaccgaggc cgcctccaac tggctctcca gcagccgcag tcgccgccga ccctggcaga 300
 ggaagacagc tgaggggggt atgaattgta cagaacaacc acgagccttg tctaggcaga 360

55 atocctacca gtcattgctt tacctggatg acggcctgcg aacagctgtc cagcgacctt 420
 cgctgccgcc gcttctcccg cacgcttctt tccagcaccg tgatggcgcg agccagcgcg 480

60 gcacgctggc gctgcgcttc gccgatctga ggacagtcgg ggaactctga tcagtctaaa 540
 ccccttgccg cgttagtggt gccatccttt gcagaccggt gagagccgac ttgttgctgcg 600

ES 2 909 143 T3

ccacccccca caccacctoc tcccagacca attctgtcac ctttttggcg aaggcatcgg 660
 5 cctcggcctg cagagaggac agcagtgcc agccgctggg ggttggcggg tgcacgctca 720
 ggtacccttt cttgcgctat gacacttcca gcaaaaggta gggcgggctg cgagacggct 780
 tcccggcgct gcatgcaaca ccgatgatgc ttcgaccccc cgaagctcct tcggggctgc 840
 10 atgggcgctc cgatgccgct ccagggcgag cgctgtttaa atagccaggc ccccgattgc 900
 aaagacatta tagcgagcta ccaaagccat attcaaacac ctagatcact accacttcta 960
 15 cacaggccac tcgagcttgt gatcgcactc cgctaagggg ggcctcttc ctcttcgttt 1020
 cagtcacaac ccgcaaacgg cgcgccatgc tgctgcaggc cttcctgttc ctgctggccg 1080
 gcttcgccgc caagatcagc gcctccatga cgaacgagac gtccgaccgc cccctggtgc 1140
 20 acttcacccc caacaagggc tggatgaacg accccaacgg cctgtggtac gacgagaagg 1200
 acgccaagtg gcacctgtac ttccagtaca accogaacga caccgtctgg gggacgcctt 1260
 25 tgttctgggg ccacgccacg tccgacgacc tgaccaactg ggaggaccag cccatcgcca 1320
 tcgccccgaa ggcgaacgac tccggcgctt tctccggctc catggtggtg gactacaaca 1380
 acacctccgy cttcttcaac gacaccatcg acccgcgcca gcgctgcgtg gccatctgga 1440
 30 cctacaacac cccggagtcc gaggagcagt acatctccta cagcctggac ggcggtaca 1500
 ccttcaccga gtaccagaag aaccccgctg tggccgcaa ctccaccag ttccgcgacc 1560
 35 cgaaggtctt ctggtacgag ccctcccaga agtggatcat gaccgcgcc aagtcccagg 1620
 actacaagat cgagatctac tcctccgacg acctgaagtc ctggaagctg gagtcccgct 1680
 tcgccaacga gggcttctc ggctaccagt acgagtgcc cggcctgatc gaggtcccca 1740
 40 ccgagcagga cccagcaag tctactggg tgatgttcat ctccatcaac cccggcgccc 1800
 cggccggcgy ctccttcaac cagtacttcg tcggcagctt caacggcacc cacttcgagg 1860
 45 ccttcgacaa ccagtcccgc gtggtggact tcggcaagga ctactacgcc ctgcagacct 1920
 tcttcaacac cgacccgacc tacgggagcg ccctgggcat cgcgtgggcc tccaactggg 1980
 agtactccgc cttcgtgccc accaaccctt ggcgctcctc catgtccctc gtgcgcaagt 2040
 50 tctccctcaa caccgagtac caggccaacc cggagacgga gctgatcaac ctgaaggccg 2100
 agccgatcct gaacatcagc aacgccggcc cctggagccg gttcgccacc aacaccacgt 2160
 55 tgacgaaggc caacagctac aacgtcgacc tgtccaacag caccggcacc ctggagtctg 2220
 agctggtgta cgccgtcaac accaccocaga cgatctcaa gtccgtgttc gcggacctct 2280
 ccctctggtt caagggcctg gaggaccccg aggagtacct ccgcatgggc ttcgaggtgt 2340
 60 ccgctcctc cttcttctc gaccgcggga acagcaaggt gaagtctgtg aaggagaacc 2400
 cctacttcac caaccgatg agcgtgaaca accagccctt caagagcgag aacgacctgt 2460

ES 2 909 143 T3

	cctactacaa ggtgtacggc ttgctggacc agaacatcct ggagctgtac ttcaacgacg	2520
5	gcgacgtcgt gtccaccaac acctacttca tgaccaccgg gaacgcctg ggctccgtga	2580
	acatgacgac gggggtggac aacctgttct acatcgacaa gttccagggtg cgcgaggtca	2640
	agtgacaatt ggcagcagca gctcggatag tatcgacaca ctctggacgc tggctcgtgtg	2700
10	atggactgtt gccgccacac ttgctgcctt gacctgtgaa tatccctgcc gcttttatca	2760
	aacagcctca gtgtgtttga tcttgtgtgt acgcgctttt gcgagttgct agctgcttgt	2820
15	gctatthtgcg aataccacco ccagcatccc ctccctcgt ttcataatcgc ttgcatccca	2880
	accgcaactt atctacgctg tcttgcctatc cctcagcgt gctcctgctc ctgctcactg	2940
	ccctcgcac agccttggtt tgggctcgc ctgtattctc ctggactgc aacctgtaa	3000
20	ccagcactgc aatgctgatg cacgggaagt agtgggatgg gaacacaaat ggaggatccc	3060
	gcgtctcgaa cagagcgcgc agaggaacgc tgaaggctc gcctctgtcg cacctcagcg	3120
25	cgccatacac cacaataacc acctgacgaa tgcgcttggc tcttcgtcca ttagcgaagc	3180
	gtccggttca cacacgtgcc acgttggcga ggtggcaggc gacaatgatc ggtggagctg	3240
	atggctgaaa cgttcacagc ctaggatata cgaattcggc cgacaggacg cgcgtcaaa	3300
30	gtgctggctg tgtatgcctt gccggcagg tgcgttgcgc tgctggttag tgattccgca	3360
	acctgattt tggcgtctta ttttggcgtg gcaaacgctg gcgcccgcga gccgggccc	3420
35	cgccgatgcg gtgccccacg gctgcgggaa tccaagggag gcaagagcgc ccgggtcagt	3480
	tgaagggctt tacgcgcaag gtacagccgc tcttgcagg ctgcgtggtg gaattggacg	3540
	tgcaggctct gctgaagttc ctccaccgcc tcaccagcgg acaaagcacc ggtgtatcag	3600
40	gtccgtgtca tccactctaa agagctcgac tacgacctac tgatggcctt agattcttca	3660
	tcaaaaacgc ctgagacact tgcccaggat tgaactccc tgaagggacc accaggggcc	3720
45	ctgagttgtt ccttcccccc gtggcgagct gccagccagg ctgtacctgt gatcgaggct	3780
	ggcgggaaaa taggcttctg gtgctcaggc catgggaggc gcaggacagc tcatgaaacg	3840
	ccaacaatcg cacaattcat gtcaagctaa tcagctattt cctcttcacg agctgtaatt	3900
50	gtocccaaat tctggtctac cgggggtgat ccttcgtgta cgggcccttc cctcaacct	3960
	aggatgctc gcacgcggc gccgcgcaac tcgcgcgagg gccgagggtt tgggacgggc	4020
55	cgtcccgaat tgcagttgca cccggatgcg tggcaccttt tttgcgataa tttatgcaat	4080
	ggactgctct gcaaaattct ggctctgtcg ccaaccctag gatcagcggc gtaggatttc	4140
	gtaatcattc gtctgatgg ggagctaccg actaccctaa tatcagcccg actgcctgac	4200
60	gccagcgtcc acttttgtgc acacattcca ttcgtgccc aagacatttca ttgtggtgcg	4260
	aagcgtcccc agttacgctc acctgtttcc cgacctcctt actgttctgt cgacagagcg	4320

ES 2 909 143 T3

	ggcccacagg ccggtcgcag ccactagtat ggctatcaag acgaacaggc agcctgtgga	4380
5	gaagcctccg ttcacgatcg ggacgctgcg caaggccatc cccgcgcaact gtttcgagcg	4440
	ctcggcgctt cgtacgagca tgtacctggc ctttgacatc gcggtcatgt ccctgctcta	4500
	cgtcgcgctcg acgtacatcg accctgcacc ggtgcctacg tgggtcaagt acggcatcat	4560
10	gtggccgctc tactggttct tccagggtggt tttgaggggt ttggttgccc gtattgaggt	4620
	cctggtggcg cgcattggagg agaaggcgcc tgtcccgctg acccccccg ctaccctccc	4680
15	ggcaccttcc agggcgcgta cgggaagaac cagtagagcg gccacatgat gccgtacttg	4740
	accacgtag gcaccggtgc agggctgatg tacgtcgacg cgacgtagag cagggacatg	4800
	accgcgatgt caaaggccag gtacatgctg ctacgaagcg ccgagcgctc gaaacagtgc	4860
20	gcggggatgg ccttgcgcag cgtcccgatc gtgaacggag gcttctccac aggetgctg	4920
	ttcgtcttga tagccatctc gaggcagcag cagctcggat agtatcgaca cactctggac	4980
25	gctggctcgtg tgatggactg ttgccgccac acttgctgcc ttgacctgtg aatatccctg	5040
	ccgcttttat caaacagcct cagtgtgttt gatcttgtgt gtacgcgctt ttgcgagttg	5100
	ctagctgctt gtgctatttg cgaataccac ccccagcatc cccttccctc gtttcataac	5160
30	gcttgcatcc caaccgcaac ttatctacgc tgtcctgcta tocctcagcg ctgctcctgc	5220
	tcttgctcac tgcccctcgc acagccttgg tttgggctcc gctgtattc tcctggtact	5280
35	gcaacctgta aaccagcaact gcaatgctga tgcacgggaa gtagtgggat gggaaacaaa	5340
	atggaaagct gtagagctct tgttttcag aaggagttgc tccttgagcc tttcattctc	5400
	agcctcgata acctcaaag ccgctctaat tgtggagggg gttcgaattt aaaagcttg	5460
40	aatgtttggtt cgtgcgctcg gaacaagccc agacttgttg ctcaactggga aaaggacat	5520
	cagctccaaa aaacttgccg ctcaaaccgc gtacctctgc tttcgcgcaa tctgcctgt	5580
45	tgaaatcgcc accacattca tattgtgacg cttgagcagt ctgtaattgc ctcagaatgt	5640
	ggaatcatct gccccctgtg cgagccatg ccaggcatgt cgcgggagag gacaccgccc	5700
	actcgtacag cagaccatta tgctacctca caatagttca taacagtgac catatttctc	5760
50	gaagctcccc aacgagcacc tccatgctct gagtggccac cccccggccc tgggtgcttg	5820
	ggagggcag tcaaccgga tggggtacc gaaatccccg accggatccc accacccccg	5880
55	cgatgggaag aatctctccc cgggatgtgg gccaccacc agcacaacct gctggcccag	5940
	gcgagcgtca aaccatacca cacaaatata cttggcatcg gccctgaatt ccttctgccg	6000
	ctctgctacc cgggtcttct gtccgaagca ggggttgcta gggatcgctc cgagtccgca	6060
60	aacccttgctc gcgtggcggg gcttgttoga gcttgaagag c	6101

ES 2 909 143 T3

```

<210> 92
<211> 595
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
5
<220>
<223> Porción de construcción FADc del casete de expresión de ARN horquillado

<400> 92
10 actagtatgg ctatcaagac gaacaggcag cctgtggaga agcctccggt cacgatcggg      60
   acgctgcgca aggccatccc cgcgcaactgt ttcgagcgct cggcgcttcg tagcagcatg      120
   tacctggcct ttgacatcgc ggtcatgtcc ctgctctacg tcgcgtcgac gtacatcgac      180
15 cctgcaccgg tgcctacgtg ggtcaagtac ggcatcatgt ggccgctcta ctggttcttc      240
   caggtgtggt tgagggtttt ggttgcccggt attgaggtcc tggtggcgcg catggaggag      300
20 aaggcgctcg tcccgetgac cccccggct accctcccgg caccttccag ggcgcgtacg      360
   ggaagaacca gtagagcggc cacatgatgc cgtacttgac ccacgtaggc accggtgcag      420
   ggtcgatgta cgtcgacgcg acgtagagca gggacatgac cgcgatgtca aaggccaggt      480
25 acatgctgct acgaagcgcc gagcgctcga aacagtgcgc ggggatggcc ttgctcagcg      540
   tcccgatcgt gaacggaggc ttctccacag gctgcctggt cgtcttgata gccat      595
30
<210> 93
<211> 5348
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
35
<220>
<223> construcción de casete de expresión FADc de ARN horquillado

<400> 93
40 gctcttcgcc gccgccaetc ctgctcgagc gcgcccgcgc gtgcgccgcc agcgccttgg      60
   ccttttcgcc gcgctcgtgc gcgtcgctga tgtccatcac caggtccatg aggtctgect      120
   tgcgccggct gagccaactgc ttcgtccggg cggccaagag gagcatgagg gaggactcct      180
45 ggtccagggt cctgacgtgg tcgcggtctt gggagcgggc cagcatcatc tggtcttgcc      240
   gcaccgaggc cgcctccaac tggctctcca gcagccgag tcgcccgcga ccctggcaga      300
50 ggaagacagg tgaggggggt atgaattgta cagaacaacc acgagccttg tctaggcaga      360
   atccctacca gtcatggctt tacctggatg acggcctgcg aacagctgtc cagcgacct      420
   cgctgcccgc gcttctcccg cacgcttctt tccagcaccg tgatggcgcg agccagcgcc      480
55 gcacgctggc gctgcgcttc gccgatctga ggacagtcgg ggaactctga tcagtctaaa      540
   cccccttgcg cgttagtgtt gccatccttt gcagaccggt gagagccgac ttggtgtgcg      600
60 ccacccccca caccacctcc tcccagacca attctgtcac ctttttggcg aaggcatcgg      660
   cctcggcctg cagagaggac agcagtgccc agccgctggg ggttggcgga tgcacgctca      720

```

ES 2 909 143 T3

	ggtacccttt cttgcgctat gacacttcca gcaaaaggta gggcgggctg cgagacggct	780
5	tcccggcgct gcatgcaaca ccgatgatgc ttcgaccccc cgaagctcct tcggggctgc	840
	atggggcgtc cgatgccgct ccagggcgag cgctgtttaa atagccaggc ccccgattgc	900
	aaagacatta tagcgagcta ccaaagccat attcaaacac ctagatcact accacttcta	960
10	cacaggccac tcgagcttgt gatcgcactc cgctaagggg ggcctcttc ctcttcgttt	1020
	cagtcacaac ccgcaaacgg cgcgccatgc tgctgcaggc cttcctgttc ctgctggccg	1080
15	gcttcgccgc caagatcagc gcctccatga cgaacgagac gtccgaccgc cccctgggtc	1140
	acttcacccc caacaagggc tggatgaacg accccaacgg cctgtggtac gacgagaagg	1200
	acgccaaagt gcacctgtac ttccagtaca accogaacga caccgtctgg gggacgcct	1260
20	tgttctgggg ccacgccacg tccgacgacc tgaccaactg ggaggaccag cccatcgcca	1320
	tcgccccgaa gcgcaacgac tccggcgctc tctccggctc catggtggtg gactacaaca	1380
25	acacctccgg cttcttcaac gacaccatcg acccgcgcca gcgctgcgtg gccatctgga	1440
	cctacaacac cccggagtcc gaggagcagt acatctccta cagcctggac ggcggctaca	1500
	ccttcaccga gtaccagaag aaccccgctc tgcccgccaa ctccaccag ttccgcgacc	1560
30	cgaaggtcct ctggtacgag ccctcccaga agtggatcat gaccgcggcc aagtcccagg	1620
	actacaagat cgagatctac tcctccgacg acctgaagtc ctggaagctg gagtccggt	1680
35	tcgccaacga gggcttctc ggetaccagt acgagtgcc cggcctgatc gaggtcccca	1740
	ccgagcagga cccagcaag tcctactggg tgatgttcat ctccatcaac cccggcgc	1800
	cggccggcgg ctcttcaac cagtacttcg tcggcagctt caacggcacc cacttcgagg	1860
40	ccttcgacaa ccagtcccgc gtggtggact tcggcaagga ctactacgcc ctgcagacct	1920
	tcttcaacac cgacctgacc tacgggagcg cctggggcat cgcgtgggcc tccaactggg	1980
45	agtactccgc cttcgtgcc accaaccctt ggcgtcctc catgtccctc gtgcgcaagt	2040
	tctccctcaa caccgagtac caggccaacc cggagacgga gctgatcaac ctgaaggccg	2100
	agccgatcct gaacatcagc aacgcggcc cctggagccg gttcgcacc aacaccacgt	2160
50	tgacgaaggc caacagctac aacgtcgacc tgtccaacag caccggcacc ctggagtctg	2220
	agctgggtga cgccgtcaac accaccaga cgatctcaa gtccgtgttc gcggacctct	2280
55	ccctctggtt caagggcctg gaggacccc aggagtacct ccgcatgggc ttcgaggtgt	2340
	ccgcgtcctc cttcttctg gaccgcggga acagcaaggt gaagtctctg aaggagaacc	2400
	cctacttcac caaccgatg agcgtgaaca accagccctt caagagcgag aacgacctgt	2460
60	cctactacaa ggtgtacggc ttgctggacc agaacatcct ggagctgtac ttcaacgacg	2520
	gcgacgtcgt gtccaccaac acctacttca tgaccaccgg gaacgccctg ggctccgtga	2580

ES 2 909 143 T3

	acatgacgac gggggtggac aacctgttct acatcgacaa gttccaggtg cgcgaggtca	2640
5	agtgacaatt ggcagcagca gctcggatag tatcgacaca ctctggacgc tggtcgtgtg atggactggt gccgccacac ttgctgcoctt gacctgtgaa tatccctgcc gcttttatca	2700 2760
	aacagcctca gtgtgtttga tcttgtgtgt acgcgctttt gcgagttgct agctgcttgt	2820
10	gctatattgcg aataccaccc ccagcatccc ctccctcgt ttcatatcgc ttgcatocca accgcaactt atctacgctg tcttctatc cctcagcgt gctcctgctc ctgctcactg	2880 2940
15	cccctcgcac agccttgggt tgggctcgc ctgtattctc ctggtaactgc aacctgtaaa ccagcactgc aatgctgatg cacgggaagt agtgggatgg gaacacaaat ggaggatccc	3000 3060
	gcgtctcgaa cagagcgcgc agaggaacgc tgaaggtctc gcctctgtcg cacctcagcg	3120
20	cggcatacac cacaataacc acctgacgaa tgcgcttgggt tcttcgtcca ttagcgaagc gtccggttca cacacgtgcc acgttggcga ggtggcaggt gacaatgatc ggtggagctg	3180 3240
25	atggtcgaaa cgttcacagc ctagggatat cgaattcctt tcttgcgcta tgacacttcc agcaaaaggt agggcgggct gcgagacggc ttcccggcgc tgcattgcaac accgatgatg	3300 3360
	cttcgacccc ccgaagctcc ttcggggctg catgggctgc cggatgccgc tccagggcga	3420
30	gcgctgttta aatagccagg cccccgattg caaagacatt atagcgagct accaaagcca tattcaaaca octagatcac taccacttct acacaggcca ctcgagcttg tgatcgact	3480 3540
35	ccgctaaggg ggcgcctctt cctcttctgt tcagtcacaa cccgcaaaca ctagtatggc tatcaagacg aacaggcagc ctgtggagaa gcctccgttc acgatcggga cgctgcgcaa	3600 3660
	ggccatcccc gcgcaactgt tcgagcgtc ggcgcttctg agcagcatgt acctggcctt	3720
40	tgacatcgcg gtcattgccc tgcctctact gcgctgcagc tacatcgacc ctgcaccggt gcctacgtgg gtcaagtacg gcatcatgtg gcgctctac tggttcttcc aggtgtgttt	3780 3840
45	gagggttttg gttgcccgta ttgaggtcct ggtggcgcgc atggaggaga aggcgcctgt cccgctgacc cccccggcta cctcccggc accttcagg gcgctgacgg gaagaaccag	3900 3960
	tagagcggcc acatgatgcc gtacttgacc cacgtaggca ccggtgcagg gtcgatgtac	4020
50	gtogacgcga cgtagagcag ggacatgacc gcgatgtcaa aggccaggta catgctgcta cgaagcggc agcgtcgaac acagtgcgcg gggatggcct tgcgcagcgt cccgatcgtg	4080 4140
55	aacggaggct tctccacagg ctgcctgttc gtcttgatag ccatctcgag gcagcagcag ctoggatagt atcgacacac tctggacgct ggtcgtgtga tggactgttg ccgccacact	4200 4260
	tgctgccttg acctgtgaat atccctgccg cttttatcaa acagcctcag tgtgtttgat	4320
60	cttgtgtgta cgcgcttttg cgagttgcta gctgcttgtg ctatattgca ataccacccc cagcatcccc ttccctcgtt tcatatogct tgcattccaa ccgcaactta tctacgctgt	4380 4440

ES 2 909 143 T3

	cctgctatcc ctcagcgtg ctctgctcc tgctcactgc ccctcgcaca gccttggttt	4500
5	gggctccgcc tgtattctcc tggactgca acctgtaaac cagcactgca atgctgatgc	4560
	acgggaagta gtgggatggg aacacaaatg gaaagctgta gagctcttgt tttccagaag	4620
	gagttgctcc ttgagccttt cattctcagc ctcgataacc tccaaagccg ctctaattgt	4680
10	ggaggggggt cgaatttaaa agcttggaaat gttggttcgt gcgtctggaa caagcccaga	4740
	cttggtgctc actgggaaaa ggaccatcag ctccaaaaaa cttgccgctc aaaccgcgta	4800
15	cctctgcttt cgcgcaatct gccctgttga aatcgccacc acattcatat tgtgacgctt	4860
	gagcagtctg taattgcctc agaatgtgga atcatctgcc ccctgtgcga gcccatgcca	4920
	ggcatgtcgc gggcgaggac acccgccact cgtacagcag accattatgc tacctcaaaa	4980
20	tagttcataa cagtgaccat atttctcga gctccccaac gagcacctcc atgctctgag	5040
	tggccacccc ccggccctgg tgcttgcgga gggcaggtca accggcatgg ggctaccgaa	5100
25	atccccgacc ggatcccacc acccccgcga tgggaagaat ctctccccgg gatgtgggcc	5160
	caccaccagc acaacctgct ggcccaggcg agcgtcaaac cataccacac aaatatcctt	5220
	ggcatcgccc ctgaattcct tctgccgctc tgctaccggt tgcttctgtc cgaagcaggg	5280
30	gttgctaggg atcgtctcga gtccgcaaac ccttgctcgcg tggcggggct tgttcgagct	5340
	tgaagagc	5348
35	<210> 94 <211> 1220 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
40	<220> <223> Porción de construcción FADc del casete de expresión de ARN horquillado	
	<400> 94	
45	actagttcac ttgtggaacc agagcgcgga gtcgtcctcg ggcgcgtccg ggacgacgta	60
	gcggcagtcg cgccagtcct cccacagggc gcggccgacc cagcggctgt cggactggta	120
	gtacttgccc aggatgggcc tgatggcggc ggaggcctcc tcggcgtggt agtgccggat	180
50	ggtgctgaag aggtggtgca gcacgtgggt gtcggagatg tgggtgcagga tgttgtccat	240
	gaagggcggg cccatggagc ggtccacggt ggccatggcg ccgcgcagcc agtcccagtc	300
55	cttctcgaag tagtgccgca gcgccgggtg cgtgtgctgg agcagcgtga tgagcacgag	360
	ccacatgttc acgatcaggt agggcaccac gtaggtcttg accagccagg cccagcccat	420
	ggtgcccggc agcacgctga gcccgctgag caccgccacc agcggcaggt cggagatgac	480
60	cacctgatg cgctcgcgct tgctgaagat gggcgaccac ggggtcaaagt ggttggcgaa	540
	gcgcgggtac ggccgcgagg cgacgtttaa catgaggtac agcggccagc ccagggtcag	600

ES 2 909 143 T3

	ggtgaccagc accttgccca tgcggatggg cagccactcc tccactcca ggccctcgtg	660
5	cgccactgcg cgggtgcggcg gcacaaacac ctcgtccttg tccaggcacc ccgtgttggg	720
	gtggtggcgg cgggtgcgagt gcttccagga gtagtagggc accagcagca ggctgtggaa	780
	caccaggccc acgccgtcgt tgatggcctg gctggaggaa aaggcctggt ggccgcactc	840
10	gtgcgcgcac acccagacac ccgtgccgaa ggccgcctgg aagggtgccg gagggtagcc	900
	gggggggtca gcgggacagg cgccttctcc tccatgcgcg ccaccaggac ctcaatacgg	960
15	gcaacaaaa ccctcaaaca cacctggaag aaccagtaga gcggccacat gatgccgtac	1020
	ttgaccacg taggcaccgg tgcagggtcg atgtacgtc acgcgacgta gagcagggac	1080
	atgaccgcga tgtcaaaggc caggtacatg ctgctacgaa gcgccgagcg ctcgaaacag	1140
20	tgcgcgggga tggccttgcg cagcgtcccg atcgtgaacg gaggcttctc cacaggctgc	1200
	ctgttcgtct tgatagccat	1220
25	<210> 95 <211> 6726 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
30	<220> <223> construcción de casete de expresión FADc de ARN horquillado	
	<400> 95	
35	gctcttcgcc gccgccaactc ctgctcgagc gcgccgcgc gtgcgcgcc agcgccttgg	60
	ccttttcgcc gcgctcgtgc gcgtcgtga tgtccatcac caggtccatg aggtctgcct	120
	tgcgccggt gagccactgc ttcgtccggg cggccaagag gagcatgagg gaggactcct	180
40	ggtccagggt cctgacgtgg tgcggctct gggagcgggc cagcatcatc tggctctgcc	240
	gcaccgaggc cgcctccaac tggctcctca gcagccgag tcgccgccga ccctggcaga	300
45	ggaagacagg tgaggggggt atgaattgta cagaacaacc acgagccttg tctaggcaga	360
	atccctacca gtcattgctt tacctggatg acggcctgcg aacagctgtc cagcgacct	420
	cgctgccgcc gcttctcccg cacgcttctt tccagcaccg tgatggcgcg agccagcgcc	480
50	gcacgctggc gctgcgcttc gccgatctga ggacagtcgg ggaactctga tcagtctaaa	540
	ccccttgcg cgttagtggt gccatccttt gcagaccggt gagagccgac ttgttgctgcg	600
55	ccaaccccc caccacctcc tcccagacca attctgtcac ctttttggcg aaggcatcgg	660
	cctcggcctg cagagaggac agcagtgccc agccgctggg ggttgccgga tgcacgctca	720
	ggtacccttt cttgcgctat gacacttcca gcaaaggta gggcgggctg cgagacggct	780
60	tcccggcgct gcatgcaaca ccgatgatgc ttccgacccc cgaagctcct tcggggctgc	840
	atgggcgctc cgatgccgct ccagggcgag cgctgtttaa atagccaggc ccccatttgc	900

ES 2 909 143 T3

	aaagacatta tagcgagcta ccaaagccat attcaaacac ctagatcact accacttcta	960
5	cacaggccac tcgagcttgt gatcgactc cgctaagggg ggcctcttc ctcttcgttt	1020
	cagtcacaac ccgcaaacgg cgcgccatgc tgctgcagge cttcctgttc ctgctggccg	1080
	gcttcgccgc caagatcagc gcctccatga cgaacgagac gtccgaccgc cccctgggtgc	1140
10	acttcacccc caacaagggc tggatgaacg accccaacgg cctgtggtac gacgagaagg	1200
	acgccaaagt gcacctgtac ttccagtaca acccgaacga caccgtctgg gggacgcctt	1260
15	tgttctgggg ccacgccacg tccgacgacc tgaccaactg ggaggaccag cccatcgcca	1320
	tcgccccgaa gcgcaacgac tccggcgctt tctccggctc catggtggtg gactacaaca	1380
	acacctccgg cttcttcaac gacaccatcg acccgcgcca gcgctgcgtg gccatctgga	1440
20	cctacaacac cccggagtcc gaggagcagt acatctccta cagcctggac ggcggctaca	1500
	ccttcaccga gtaccagaag aaccccgctg tgcccgccaa ctccaccag ttccgcgacc	1560
25	cgaaggtcct ctggtacgag ccctcccaga agtggatcat gaccgcggcc aagtcccagg	1620
	actacaagat cgagatctac tctccgacg acctgaagtc ctggaagctg gagtccgcgt	1680
	tcgccaacga gggcttctc ggctaccagt acgagtgccc cggcctgatc gaggtcccca	1740
30	ccgagcagga ccccagcaag tcctactggg tgatgttcat ctccatcaac cccggcgccc	1800
	cggccggcgg ctccttcaac cagtacttcg tcggcagctt caacggcacc cacttcgagg	1860
35	ccttcgacaa ccagtcccgc gtggtggact tcggcaagga ctactacgcc ctgcagacct	1920
	tcttcaacac cgacccgacc tacgggagcg ccctgggcat cgcgtgggcc tccaactggg	1980
	agtactccgc cttcgtgccc accaaccctt ggcgtcctc catgtccctc gtgcgcaagt	2040
40	tctccctcaa caccgagtac caggccaacc cggagacgga gctgatcaac ctgaaggccg	2100
	agccgatcct gaacatcagc aacgccggcc cctggagccg gttcgccacc aacaccacgt	2160
45	tgacgaaggc caacagctac aacgtcgacc tgtccaacag caccggcacc ctggagttcg	2220
	agctggtgta cgccgtcaac accaccaga cgatctcaa gtccgtgttc gcggacctct	2280
	ccctctggtt caagggcctg gaggaccccg aggagtacct ccgcatgggc ttcgaggtgt	2340
50	ccgcgtcctc cttcttctcg gaccgcggga acagcaaggt gaagtctctg aaggagaacc	2400
	cctacttcac caaccgcatg agcgtgaaca accagccctt caagagcgag aacgacctgt	2460
55	cctactacaa ggtgtacggc ttgctggacc agaacatcct ggagctgtac ttcaacgacg	2520
	gcgacgtcgt gtccaccaac acctacttca tgaccaccgg gaacgccctg ggctccgtga	2580
	acatgacgac gggggtggac aacctgttct acatcgacaa gttccagggtg cgcgaggcca	2640
60	agtgacaatt ggcagcagca gctcggatag tatcgacaca ctctggacgc tggctcgtgtg	2700
	atggactggt gccgccacac ttgctgcctt gacctgtgaa tatccctgcc gcttttatca	2760

ES 2 909 143 T3

	aacagcctca gtgtgtttga tcttgtgtgt acgcgctttt gcgagttgct agctgcttgt	2820
5	gctatattgcg aataccaccc ccagcatccc ctccctcgt ttcatacgc ttgcatccca	2880
	accgcaactt atctacgctg tcttgcctatc cctcagcgt gctcctgctc ctgctcaactg	2940
	cccctcgcac agccttggtt tgggctccgc ctgtattctc ctggactgac aacctgtaaa	3000
10	ccagcactgc aatgctgatg cacgggaagt agtgggatgg gaacacaaaat ggaggatccc	3060
	gcgtctcgaa cagagcgcgc agaggaacgc tgaaggtctc gcctctgctg cacctcagcg	3120
15	cggcatacac cacaataacc acctgacgaa tgcgcttggc tcttcgtcca ttagcgaagc	3180
	gtccggttca cacacgtgcc acgttggcga ggtggcaggt gacaatgatc ggtggagctg	3240
	atggctgaaa cgttcacagc ctagggatat cgaattcggc cgacaggacg cgcgtcaaag	3300
20	gtgctggtcg tgtatgcctt gcccggcagg tcgctgctgc tgctggttag tgattccgca	3360
	accctgattt tggcgtctta ttttggcgtg gcaaacgctg gcgcccgcga gccgggccgg	3420
25	ggcgatgctg gtgccccacg gctgccgga tccaagggag gcaagagcgc ccgggtcagt	3480
	tgaagggctt tacgcgcaag gtacagccgc tcctgcaagg ctgcgtggtg gaattggacg	3540
	tgcaggtcct gctgaagttc ctccaccgcc tcaccagcgg acaaagcacc ggtgtatcag	3600
30	gtccgtgtoa tccactctaa agagctogac tacgacctac tgatggcctt agattcttca	3660
	tcaaaaacgc ctgagacact tgcccaggat tgaactccc tgaagggacc accaggggcc	3720
35	ctgagttggt ccttcccccc gtggcgagct gccagccagg ctgtacctgt gatcgaggct	3780
	ggcgggaaaa taggctcgtg gtgctcaggt catgggaggt gcaggacagc tcatgaaacg	3840
	ccaacaatcg cacaattcat gtcaagctaa tcagctatct cctcttcacg agctgtaatt	3900
40	gtcccaaaaat tctggtctac cgggggtgat ccttcgtgta cgggcccttc cctcaacctt	3960
	aggtatgctc gcatgcggtc gccgcgcaac tcgcgcgagg gccgaggggt tgggacgggc	4020
45	cgtcccgaat tgcagttgca cccggatgct tggcaccttt tttgcgataa tttatgcaat	4080
	ggactgctct gcaaaaattct ggctctgctg ccaaccctag gatcagcggc gtaggatttc	4140
	gtaatcattc gtcctgatgg ggagctaccg actaccctaa tatcagcccg actgcctgac	4200
50	gccagcgtcc acttttgtgc acacattcca ttcgtgcca agacatttca ttgtggtgctg	4260
	aagcgtcccc agttacgctc acctgtttcc cgacctcctt actgttctgt cgacagagcg	4320
55	ggcccacagc ccggctcgcag ccaactagttc acttgtggaa ccagagcgcg gagtcgtcct	4380
	cgggcgcgct cgggacgacg tagcggcagt cgcgccagtc ctcccacagc gcgcggccga	4440
	cccagcggct gtcggactgg tagtacttgc ccaggatggg cctgatggcg gcggaggcct	4500
60	cctcggcgtg gtagtgccgg atggtgctga agaggtggtg cagcacgtgg gtgtcggaga	4560
	tgtggtgcag gatgttctcc atgaagggcg ggcccatgga gcggctccacg gtggccatgg	4620

ES 2 909 143 T3

	cgccgcgcag ccagtcccag tccttctcga agtagtgcg cagcgccggg tgcgtgtgct	4680
5	ggagcagcgt gatgagcacg agccacatgt tcacgatcag gtagggcacc acgtaggtct	4740
	tgaccagcca ggcccagccc atggtgcggc ccagcacgct gagcccgctg agcaccgcca	4800
	ccagcgccag gtcggagatg accacctcga tgcgctcgcg cttgctgaag atgggcgacc	4860
10	acgggtcaaa gtggttgcg aagcgcgggt acggccgcga ggcgacgttg aacatgaggt	4920
	acagcggcca gcccagggtc agggtagcca gcaccttgcc catgcggatg ggcagccact	4980
15	cctcccactc caggccctcg tgcgccactg cgcggtgcgg cggcacaac acctcgtcct	5040
	tgtccaggca ccccggttg gagtggtggc ggcggtgcga gtgcttcag gagtagtagg	5100
	gcaccagcag caggctgtgg aacaccaggc ccacgccgtc gttgatggcc tggctggagg	5160
20	aaaaggcctg gtggccgcac tcgtgcgcgc acaccagac acccgtgccg aaggcgcct	5220
	ggaaggtgcc gggagggtag ccgggggggt cagcgggaca ggcgccttct cctccatgcg	5280
25	cgccaccag acctcaatac gggcaaccaa aaccctcaaa cacacctgga agaaccagta	5340
	gagcggccac atgatgccgt acttgacca cgtaggcacc ggtgcagggt cgatgtacgt	5400
	cgacgcgacg tagagcaggg acatgaccgc gatgtcaaag gccaggtaca tgctgctacg	5460
30	aagcgcagcag cgctcgaaac agtgcgcggg gatggccttg cgcagcgtcc cgatcgtgaa	5520
	cggaggcttc tccacagget gcctgttcgt cttgatagcc atctcgaggc agcagcagct	5580
35	cggatagtat cgacacactc tggacgctgg tcgtgtgatg gactgttgcc gccacacttg	5640
	ctgccttgac ctgtgaatat ccctgccgct tttatcaaac agcctcagtg tgtttgatct	5700
	tgtgtgtacg cgcttttgcg agttgctagc tgcttgctct atttgcaat accaccccca	5760
40	gcatccccct ccctcgtttc atatcgcttg catcccacc gcaacttatc tacgctgtcc	5820
	tgctatccct cagcgtgct cctgctcctg ctcactgcc ctcgcacagc cttggtttgg	5880
45	gctccgcctg tattctcctg gtactgcaac ctgtaaacca gcaactgcaat gctgatgcac	5940
	gggaagtagt gggatgggaa cacaatgga aagctgtaga gctcttgttt tccagaagga	6000
	gttgctcctt gagcctttca ttctcagcct cgataacctc caaagccgct ctaattgtgg	6060
50	agggggttcg aatttaaaag cttggaatgt tggttcgtgc gtctggaaca agcccagact	6120
	tgttgctcac tgggaaaagg accatcagct ccaaaaaact tgccgctcaa accgcgtacc	6180
55	tctgctttcg cgcaatctgc cctgttgaaa tcgccaccac attcatattg tgacgcttga	6240
	gcagtctgta attgcctcag aatgtggaat catctgcccc ctgtgcgagc ccatgccagg	6300
	catgtcgcgg gcgaggacac ccgcoactcg tacagcagac cattatgcta cctcacaata	6360
60	gttcataaca gtgaccatat ttctcgaagc tccccaacga gcacctccat gctctgagtg	6420
	gccaccccc ggccctggtg cttgcggagg gcaggccaac cggcatgggg ctaccgaaat	6480

ES 2 909 143 T3

```

ccccgaccgg atcccaccac ccccgcgatg ggaagaatct ctccccggga tgtgggcca      6540
5  ccaccagcac aacctgctgg ccagggcag cgtcaaacca taccacaaa ataccttgg      6600
   catcggccct gaattccttc tgccgctctg ctaccgggtg cttctgtccg aagcaggggt      6660
   tgctagggat cgctccgagt ccgcaaacc ttgtcgcgtg gcggggcttg ttcgagcttg      6720
10 aagagc                                          6726

<210> 96
<211> 1220
15 <212> ADN
   <213> Secuencia Artificial

<220>
20 <223> Porción de construcción FADc del casete de expresión de ARN horquillado
   <400> 96
   actagtccac ttgtggaacc agagcgcgga gtcgtcctcg ggcgcgtccg ggacgacgta      60
25 gcggcagtcg cgccagtcct cccacagggc gcggccgacc cagcggctgt cggactggta      120
   gtacttgccc aggatgggcc tgatggcggc ggaggcctcc tcggcgtggt agtgcgggat      180
   ggtgctgaag aggtggtgca gcacgtgggt gtcggagatg tgggtgcagga tgttgtccat      240
30 gaagggcggg cccatggagc ggtccacggt ggccatggcg ccgcgagcc agtcccagtc      300
   cttctcgaag tagtgcgga gcgccgggtg cgtgtgctgg agcagcgtga tgagcacgag      360
35 ccacatgttc acgatcaggt agggcaccac gtaggtcttg accagccagg cccagcccat      420
   ggtgcgggcc agcacgctga gcccgctgag caccgccacc agcgccaggc cggagatgac      480
   cacctcgatg cgctcgcgct tgctgaagat gggcgaccac gggtcaaagt ggttggcgaa      540
40 gcgcggttac ggccgcgagg cgacgttga catgaggtac agcgccagc ccagggtcag      600
   ggtgaccagc accttgcca tcgagatggg cagccactcc tccactcca ggccctcgtg      660
45 cgccactgcg cgggtgcggcg gcacaaacac ctcgtccttg tccaggcacc ccgtgttga      720
   gtggtggcgg cgggtgcgagt gcttccagga gtagtagggc accagcagca ggctgtgga      780
   caccaggccc acgccgtcgt tgatggcctg gctggaggaa aaggcctggt ggccgcactc      840
50 gtgcgcgcac acccagacac ccgtgccgaa ggcgccctgg aagggtgccg gagggtagcc      900
   gggggggtca gcgggacagg cgccttctcc tccatgcgcg ccaccaggac ctcaatacgg      960
55 gcaacaaaaa ccctcaaaca cacctggaag aaccagtaga gcggccacat gatgccgtac      1020
   ttgaccacg taggcaccgg tgcagggctg atgtacgtcg acgcgacgta gagcagggac      1080
   atgaccgca tgtcaaaggc caggtacatg ctgctacgaa gcgccgagcg ctcgaaacag      1140
60 tgcgcgggga tggccttgcg cagcgtcccg atcgtgaacg gaggcttctc cacaggctgc      1200
   ctgttcgtct tgatagccat                                          1220

```

ES 2 909 143 T3

<210> 97
 <211> 5973
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> construcción de casete de expresión FADc de ARN horquillado

10 <400> 97
 gctcttcgcc gccgccactc ctgctcgagc gcgcccgcgc gtgcgccgcc agcgccttgg 60
 ccttttcgcc gcgctcgtgc gcgtcgtga tgtccatcac caggtccatg aggtctgcct 120
 15 tgcgcccggct gagccactgc ttctgcccgg cgccaagag gagcatgagg gaggactcct 180
 ggtccagggt cctgacgtgg tcgcggtctt gggagcgggc cagcatcatc tggctctgcc 240
 20 gcaccgaggc cgcctccaac tggctcctca gcagccgcag tcgcccgcga ccctggcaga 300
 ggaagacagg tgaggggggt atgaattgta cagaacaacc acgagccttg tctaggcaga 360
 atccctacca gtcatggctt tacctggatg acggcctgcg aacagctgtc cagcgacct 420
 25 cgctgccgcc gcttctcccg cacgcttctt tccagcaccg tgatggcgcg agccagcggc 480
 gcacgctggc gctgcgcttc gccgatctga ggacagtcgg ggaactctga tcagtctaaa 540
 30 cccccttgcg cgttagtggt gccatccttt gcagaccggt gagagccgac ttgttgtgcg 600
 ccacccccca caccacctcc tcccagacca attctgtcac ctttttggcg aaggcatcgg 660
 cctcggcctg cagagaggac agcagtgcc agccgctggg ggttggcgga tgcacgctca 720
 35 ggtacccttt cttgcgctat gacacttcca gcaaaaggta gggcgggctg cgagacggct 780
 tcccggcgct gcatgcaaca ccgatgatgc ttcgaccccc cgaagctcct tcggggctgc 840
 40 atgggcgctc cgatgccgct ccaggcgag cgctgtttaa atagccaggc ccccgattgc 900
 aaagacatta tagcgagcta ccaagccat attcaaacac ctagatcact accacttcta 960
 cacaggccac tcgagcttgt gatcgactc cgctaagggg gcgcctcttc ctcttcgttt 1020
 45 cagtcacaac ccgcaaacgg cgcgccatgc tgctgcaggc cttcctgttc ctgctggccg 1080
 gcttcgccgc caagatcagc gcctccatga cgaacgagac gtccgaccgc cccctggtgc 1140
 50 acttcacccc caacaagggc tggatgaacg accccaacgg cctgtggtac gacgagaagg 1200
 acgccaagtg gcacctgtac ttccagtaca accogaacga caccgtctgg gggacgcct 1260
 tgttctgggg ccacgccacg tccgacgacc tgaccaactg ggaggaccag cccatcgcca 1320
 55 tcgccccgaa gcgcaacgac tccggcgct tctccggctc catggtggtg gactacaaca 1380
 acacctccg cttcttcaac gacaccatcg acccgcgcca gcgctgcgtg gccatctgga 1440
 60 cctacaacac cccggagtcc gaggagcagt acatctccta cagcctggac ggcggctaca 1500
 ccttcaccga gtaccagaag aaccccgctc tgcccgccaa ctccaccag ttccgcgacc 1560

ES 2 909 143 T3

	cgaaggtctt	ctggtacgag	ccctcccaga	agtggatcat	gaccgcggcc	aagtcccagg	1620
5	actacaagat	cgagatctac	tcctccgacg	acctgaagtc	ctggaagctg	gagtccgctg	1680
	tcgccaacga	gggcttcctc	ggctaccagt	acgagtgcc	cggcctgatc	gaggtcccca	1740
	ccgagcagga	ccccagcaag	tctactggg	tgatgttcat	ctccatcaac	cccggcgccc	1800
10	cggccggcgg	ctccttcaac	cagtacttcg	tcggcagctt	caacggcacc	cacttcgagg	1860
	ccttcgacaa	ccagtcccgc	gtggtggact	tcggcaagga	ctactacgcc	ctgcagaact	1920
15	tcttcaacac	cgacccgacc	tacgggagcg	ccctgggcat	cgcgtgggcc	tccaactggg	1980
	agtactccgc	cttcgtgccc	accaaccct	ggcgtcctc	catgtccctc	gtgcgcaagt	2040
	tctccctcaa	caccgagtac	caggccaacc	cggagacgga	gctgatcaac	ctgaaggccg	2100
20	agccgatcct	gaacatcagc	aacgccggcc	cctggagccg	gttcgccacc	aacaccacgt	2160
	tgacgaaggc	caacagctac	aacgtcgacc	tgtccaacag	caccggcacc	ctggagtctg	2220
25	agctgggtga	cgccgtcaac	accaccaga	cgatctcaa	gtccgtgttc	gcgacactct	2280
	ccctctggtt	caagggcctg	gaggaccccg	aggagtacct	ccgcatgggc	ttcgaggtgt	2340
	ccgcgtcctc	cttcttcctg	gaccgcggga	acagcaaggt	gaagtctctg	aaggagaacc	2400
30	cctacttcac	caaccgcatg	agcgtgaaca	accagccctt	caagagcgag	aacgacctgt	2460
	cctactacaa	ggtgtacggc	ttgctggacc	agaacatcct	ggagctgtac	ttcaacgacg	2520
35	gcgacgtcgt	gtccaccaac	acctaactca	tgaccaccgg	gaacgcctg	ggctccgtga	2580
	acatgacgac	gggggtggac	aacctgttct	acatcgacaa	gttcagggtg	cgcgaggtca	2640
	agtgacaatt	ggcagcagca	gctcggatag	tatcgacaca	ctctggacgc	tggtcgtgtg	2700
40	atggactggt	gccgccacac	ttgctgcctt	gacctgtgaa	tatccctgcc	gcttttatca	2760
	aacagcctca	gtgtgtttga	tcttgtgtgt	acgcgctttt	gogagtgtct	agctgcttgt	2820
45	gctatattg	aataccaccc	ccagcatccc	cttcctcctg	ttcatatcgc	ttgcatcca	2880
	accgcaactt	atctacgctg	tctgtctatc	cctcagcget	gctcctgctc	ctgctcaactg	2940
	cccctcgac	agccttggtt	tgggetccgc	ctgtattctc	ctggactctg	aacctgtaaa	3000
50	ccagcactgc	aatgctgatg	cacgggaagt	agtgggatgg	gaacacaaat	ggaggatccc	3060
	gcgtctcgaa	cagagcgcgc	agaggaacgc	tgaaggtctc	gcctctgtcg	cacctcagcg	3120
55	cggcatacac	cacaataacc	acctgacgaa	tgcgcttggt	tcttcgtcca	ttagcgaagc	3180
	gtccggttca	cacacgtgcc	acgttggcga	ggtggcaggt	gacaatgatc	ggtggagctg	3240
	atggctgaaa	cgttcacagc	ctagggatat	cgaattcctt	tcttgcgcta	tgacacttcc	3300
60	agcaaaaggt	agggcgggct	gcgagacggc	ttcccggcgc	tgcatgcaac	accgatgatg	3360
	cttcgacccc	ccgaagetcc	ttcggggctg	catgggcgct	ccgatgccgc	tccagggcga	3420

ES 2 909 143 T3

	gcgctgttta	aatagccagg	ccccgattg	caaagacatt	atagcgagct	accaaagcca	3480
5	tattcaaaca	cctagatcac	taccacttct	acacaggcca	ctcgagcttg	tgatcgcact	3540
	ccgctaaggg	ggcgctctt	cctcttogtt	tcagtcacaa	cccgcaaaca	ctagttcact	3600
	tgtggaacca	gagcgcgag	tcgtcctcgg	gcgctccgg	gacgacgtag	cggcagtcgc	3660
10	gccagtcctc	ccacagggcg	cggccgaccc	agcggctgtc	ggactggtag	tacttgccca	3720
	ggatgggctc	gatggcgcg	gaggcctcct	cggcgtggta	gtgctggatg	gtgctgaaga	3780
	ggtggtgcag	cacgtgggtg	tcggagatgt	ggtgcaggat	gttgtccatg	aagggcgggc	3840
15	ccatggagcg	gtccacggtg	gccatggcgc	cgcgcagcca	gtcccagtcc	ttctcgaagt	3900
	agtgcggcag	cgccgggtgc	gtgtgctgga	gcagcgtgat	gagcacgagc	cacatgttca	3960
20	cgatcaggta	gggcaccacg	taggtcttga	ccagccaggc	ccagcccatg	gtgcggccca	4020
	gcacgctgag	cccgctgagc	accgccacca	gcgccaggtc	ggagatgacc	acctcgatgc	4080
	gctcgcgctt	gctgaagatg	ggcgaccacg	ggtcaaagtg	gttggcgaag	cgcgggtacg	4140
25	gcccgagagg	gacgttgaac	atgaggtaca	gcggccagcc	cagggtcagg	gtgaccagca	4200
	ccttgcccat	gcggatgggc	agccactcct	cccactccag	gccctcgtgc	gccactgcgc	4260
30	ggtgcggcgg	cacaaacacc	tcgtccttgt	ccaggcacc	cgtgttgag	tggtggcggc	4320
	ggtgcgagtg	cttccaggag	tagtagggca	ccagcagcag	gctgtggaac	accaggccca	4380
	gcgcgtcgtt	gatggcctgg	ctggaggaaa	aggcctggtg	gccgcactcg	tgcgcgcaca	4440
35	cccagacacc	cgtgccgaag	gcgccctgga	aggtgccggg	agggtagccg	ggggggtcag	4500
	cgggacaggc	gccttctcct	ccatgcgcgc	caccaggacc	tcaatacggg	caaccaaacc	4560
40	cctcaaacac	acctggaaga	accagtagag	cggccacatg	atgccgtact	tgaccacgt	4620
	aggcaccggt	gcagggtcga	tgtacgtcga	cgcgacgtag	agcagggaca	tgaccgcgat	4680
	gtcaaaggcc	aggtacatgc	tgctacgaag	cgcgagcgc	tcgaaacagt	gcgcggggat	4740
45	ggccttgcgc	agcgtcccga	tcgtgaacgg	aggttcttcc	acaggetgcc	tgttcgtctt	4800
	gatagccatc	tcgaggcagc	agcagctcgg	atagtatcga	cacactctgg	acgctggtcg	4860
50	tgtgatggac	tgttgccgcc	acacttgetg	ccttgacctg	tgaatatccc	tgccgctttt	4920
	atcaaacagc	ctcagtgtgt	ttgatcttgt	gtgtacgcgc	ttttgcgagt	tgctagctgc	4980
	ttgtgctatt	tgcaataacc	acccccagca	tccccttccc	tcgtttcata	tcgcttgcac	5040
55	cccaaccgca	acttatctac	gctgtcctgc	tatccctcag	cgctgctcct	gctcctgctc	5100
	actgccctc	gcacagcctt	ggtttgggct	ccgcctgtat	tctcctggta	ctgcaacctg	5160
60	taaaccagca	ctgcaatgct	gatgcacggg	aagtagtggg	atgggaacac	aatggaaag	5220
	ctgtagagct	cttgttttcc	agaaggagtt	gctccttgag	cctttcattc	tcagcctoga	5280

ES 2 909 143 T3

	taacctccaa agccgctcta attgtggagg gggttcgaat ttaaaagctt ggaatggttg	5340
5	ttcgtgctc tggaacaagc ccagacttgt tgctcactgg gaaaaggacc atcagctcca	5400
	aaaaacttgc cgctcaaacc gcgtacctct gctttcgcgc aatctgccct gttgaaatcg	5460
	ccaccacatt catattgtga cgcttgagca gtctgtaatt gcctcagaat gtggaatcat	5520
10	ctgccccctg tgcgagccca tgccaggcat gtcgcgggcg aggacacccg cactcgtac	5580
	agcagacat tatgctacct cacaatagtt cataacagt accatatttc tcgaagctcc	5640
15	ccaacgagca cctccatgct ctgagtggcc accccccggc cctggtgctt gcggagggca	5700
	ggtcaaccgg catggggcta ccgaaatccc cgaccggatc ccaccacccc cgcgatggga	5760
	agaatctctc cccgggatgt gggcccacca ccagcacaac ctgctggccc aggcgagcgt	5820
20	caaaccatac cacacaaata tccttggcat cggccctgaa ttccttctgc cgctctgcta	5880
	cccggtgctt ctgtccgaag caggggttgc tagggatcgc tccgagtccg caaaccttg	5940
25	tcgcgtggcg gggcttgttc gagcttgaag agc	5973
	<210> 98	
	<211> 1221	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> construcción con codones optimizados	
35	<400> 98	
	actagtatgg ccaccgcatc cactttctcg gcgttcaatg cccgctgcgg cgacctgctg	60
	cgctcggcgg gctccgggcc ccggcgcca gcgaggcccc tccccgtgcg cgggcgcgcc	120
40	gaggtgcacg tgcaggtgac ccactccctg gccccgaga agcgcgagat cttcaactcc	180
	ctgaacaact gggcccagga gaacatcctg gtgctgctga aggacgtgga caagtgctgg	240
45	cagccctccg acttcctgcc cgactccgcc tccgagggtc tcgacgagca ggtgatggag	300
	ctgcgcaagc gctgcaagga gatccccgac gactacttca tcgtgctggt gggcgacatg	360
	atcaccgagg aggccctgcc cacctaccag accatgctga acaccctgga cggcgtgcgc	420
50	gacgagaccg gcgcctccct gacccctgg gccatctgga cccgcgcctg gaccgccgag	480
	gagaaccgcc acggcgacct gctgaacaag tacctgtacc tgtccggccg cgtggacatg	540
55	aagcagatcg agaagacat ccagtacctg atcggctccg gcatggacc cgcaccgag	600
	aacaaccct acctgggctt catctacacc tccttcagag agcgcgccac cttcatctcc	660
	cacggcaaca ccgccgcct ggccaaggag cacggcgacc tgaagctggc ccagatctgc	720
60	ggcatcatcg ccgccgacga gaagcgccac gagaccgct acaccaagat cgtggagaag	780
	ctgttcgaga tcgaccccg cggcacctg ctggccctgg ccgacatgat gcgcaagaag	840

ES 2 909 143 T3

gtgtccatgc ccgcccacct gatgtacgac ggccaggacg acaacctggt cgagaacttc 900

5 tcttccgtgg cccagcgctt gggcgtgtac accgccaagg actacgccga catcctggag 960

ttcctggtgg gccgctggga catcgagaag ctgaccggcc tgtccggcga gggccgcaag 1020

gcccaggact acgtgtgcac cctgcccccc cgcattccgc gcctggagga gcgcgccag 1080

10 tcccgcgtga agaaggctc cgccaccccc ttctcctgga tcttcggccg cgagatcaac 1140

ctgatggact acaaggacca cgacggcgac tacaaggacc acgacatcga ctacaaggac 1200

15 gacgacgaca agtgaatcga t 1221

<210> 99
 <211> 390
 <212> PRT
 20 <213> Olea europae

<400> 99

25 Met Ala Leu Lys Leu Cys Phe Pro Pro His Lys Met Pro Ser Phe Pro
 1 5 10 15

30 Asp Ala Arg Ile Arg Ser His Arg Val Phe Met Ala Ser Thr Ile His
 20 25 30

Ser Pro Ser Met Glu Val Gly Lys Val Lys Lys Pro Phe Thr Pro Pro
 35 40 45

35 Arg Glu Val His Val Gln Val Thr His Ser Leu Ala Pro Glu Lys Arg
 50 55 60

40 Glu Ile Phe Asn Ser Leu Asn Asn Trp Ala Gln Glu Asn Ile Leu Val
 65 70 75 80

45 Leu Leu Lys Asp Val Asp Lys Cys Trp Gln Pro Ser Asp Phe Leu Pro
 85 90 95

50 Asp Ser Ala Ser Glu Gly Phe Asp Glu Gln Val Met Glu Leu Arg Lys
 100 105 110

Arg Cys Lys Glu Ile Pro Asp Asp Tyr Phe Ile Val Leu Val Gly Asp
 115 120 125

55 Met Ile Thr Glu Glu Ala Leu Pro Thr Tyr Gln Thr Met Leu Asn Thr
 130 135 140

60 Leu Asp Gly Val Arg Asp Glu Thr Gly Ala Ser Leu Thr Pro Trp Ala
 145 150 155 160

ES 2 909 143 T3

Ile Trp Thr Arg Ala Trp Thr Ala Glu Glu Asn Arg His Gly Asp Leu
165 170 175

5
Leu Asn Lys Tyr Leu Tyr Leu Ser Gly Arg Val Asp Met Lys Gln Ile
180 185 190

10
Glu Lys Thr Ile Gln Tyr Leu Ile Gly Ser Gly Met Asp Pro Arg Thr
195 200 205

15
Glu Asn Asn Pro Tyr Leu Gly Phe Ile Tyr Thr Ser Phe Gln Glu Arg
210 215 220

20
Ala Thr Phe Ile Ser His Gly Asn Thr Ala Arg Leu Ala Lys Glu His
225 230 235 240

25
Gly Asp Leu Lys Leu Ala Gln Ile Cys Gly Ile Ile Ala Ala Asp Glu
245 250 255

30
Lys Arg His Glu Thr Ala Tyr Thr Lys Ile Val Glu Lys Leu Phe Glu
260 265 270

35
Ile Asp Pro Asp Gly Thr Val Leu Ala Leu Ala Asp Met Met Arg Lys
275 280 285

40
Lys Val Ser Met Pro Ala His Leu Met Tyr Asp Gly Gln Asp Asp Asn
290 295 300

45
Leu Phe Glu Asn Phe Ser Ser Val Ala Gln Arg Leu Gly Val Tyr Thr
305 310 315 320

50
Ala Lys Asp Tyr Ala Asp Ile Leu Glu Phe Leu Val Gly Arg Trp Asp
325 330 335

55
Ile Glu Lys Leu Thr Gly Leu Ser Gly Glu Gly Arg Lys Ala Gln Asp
340 345 350

60
Tyr Val Cys Thr Leu Pro Pro Arg Ile Arg Arg Leu Glu Glu Arg Ala
355 360 365

Gln Ser Arg Val Lys Lys Ala Ser Ala Thr Pro Phe Ser Trp Ile Phe
370 375 380

Gly Arg Glu Ile Asn Leu
385 390

<210> 100

ES 2 909 143 T3

<211> 726
 <212> ADN
 <213> Prototheca moriformis

5 <400> 100
 gctcttcgcc gccgccactc ctgctcgagc gcgcccgcgc gtgcgccgcc agcgccttgg 60
 ccttttcgcc gcgctcgtgc gcgtcgtga tgtccatcac caggtccatg aggtctgcct 120
 10 tgcgcccggct gagccactgc ttcgtccggg cggccaagag gagcatgagg gaggactcct 180
 ggtccagggt cctgacgtgg tcgcggtctt gggagcgggc cagcatcatc tggctctgcc 240
 gcaccgaggc cgcctccaac tggctctcca gcagccgcag tcgcccgcga ccctggcaga 300
 15 ggaagacagg tgaggggggt atgaattgta cagaacaacc acgagccttg tctaggcaga 360
 atccctacca gtcattgctt tacctggatg acggcctgcg aacagctgtc cagcgacct 420
 20 cgctgcccgc gcttctcccg cacgcttctt tccagcaccg tgatggcgcg agccagcggc 480
 gcacgctggc gctgcgcttc gccgatctga ggacagtcgg ggaactctga tcagtctaaa 540
 ccccttgctg cgttagtgtt gccatccttt gcagaccggg gagagccgac ttgttgtgcg 600
 25 ccacccccca caccacctcc tcccagacca attctgtcac ctttttggcg aaggcatcgg 660
 cctcggcctg cagagaggac agcagtgccc agccgctggg ggttggcggg tgacagctca 720
 30 ggtacc 726

<210> 101
 <211> 749
 <212> ADN
 <213> Prototheca moriformis

35 <400> 101
 gagctccttg ttttccagaa ggagttgctc cttgagcctt tcattctcag cctcgataac 60
 40 ctocaaagcc gctctaattg tggagggggg tcgaatttaa aagcttgaa tgttggttcg 120
 tgcgtctgga acaagcccag acttgttgct cactgggaaa aggaccatca gctccaaaaa 180
 45 acttgccgct caaacccgct acctctgctt tcgcgcaatc tgccctgttg aaatcggcac 240
 cacattcata ttgtgacgct tgagcagtct gtaattgcct cagaatgtgg aatcatctgc 300
 cccctgtgcg agcccatgcc aggcattgctg cgggagagga caccgcccac tcgtacagca 360
 50 gaccattatg ctacctcaca atagttcata acagtgacca tatttctcga agctcccca 420
 cgagcacctc catgctctga gtggccaccc ccggccctg gtgcttgccg agggcaggtc 480
 55 aaccggcatg gggctaccga aatccccgac cggatccac caccgccgcg atgggaagaa 540
 tctctccccg ggatgtgggc ccaccaccag cacaacctgc tggcccaggc gagcgtcaaa 600
 ccataccaca caaatatcct tggcatoggc cctgaattcc ttctgccgct ctgctaccgc 660
 60 gtgcttctgt ccgaagcagg ggttgctagg gatcgctccg agtccgcaaa cccttgcgc 720

ES 2 909 143 T3

```

gtggcggggc ttgttcgagc ttgaagagc                                749

5  <210> 102
   <211> 719
   <212> ADN
   <213> Secuencia Artificial

10 <220>
    <223> construcción sintética

    <400> 102
    gggctggtct gaatccttca ggcgggtggt acccgagaaa gaaaggggtgc cgatttcaaa    60
15 gcagacccat gtgccgggcc ctgtggcctg tgttggcgcc tatgtagtca cccccctca    120
    cccaattgtc gccagtttgc gcactccata aactcaaaac agcagcttct gagctgcgct    180
20 gttcaagaac acctctgggg tttgctcacc cgcgaggtcg acgcccagca tggctatcaa    240
    gacgaacagg cagcctgtgg agaagcctcc gttcacgatc gggacgctgc gcaaggccat    300
    ccccgcgcac tgtttcgagc gctcggcgct tcgtagcagc atgtacctgg cctttgacat    360
25 cgcggtcattg tccctgctct acgtcgcgtc gacgtacatc gaccctgcac cggtgccctac    420
    gtgggtcaag tacggcatca tgtggccgct ctactggttc ttccaggtgt gtttgaggggt    480
30 tttggttgcc cgtattgagg tcctgggtggc gcgcatggag gagaaggcgc ctgtcccgct    540
    gacccccccg gctaccctcc cggcaccttc cagggcgcct tcggcacggg tgtctggggtg    600
    tgcgcgcacg agtgcggccca ccaggccttt tcctccagcc aggccatcaa cgacggcgctg    660
35 ggctggtgtg tccacagcct gctgctggtg ccctactact cctggaagca ctcgcaccg    719

40 <210> 103
    <211> 732
    <212> ADN
    <213> Secuencia Artificial

45 <220>
    <223> construcción sintética

    <400> 103
    ccgccaccac tccaacacgg ggtgcctgga caaggacgag gtgtttgtgc cgccgcaccg    60
50 cgcagtggcg cagcagggcc tggagtggga ggagtggctg cccatccgca tgggcaaggt    120
    gctggtcacc ctgaccctgg gctggccgct gtacctcatg ttcaacgtcg cctcgcggcc    180
    gtaccgcgcy ttcgccaacc actttgacct gtggtcgccc atcttcagca agcgcgagcg    240
55 catcgagggtg gtcattctcg acctggcgct ggtggcggtg ctcagcgggc tcagcgtgct    300
    gggccgcacc atgggctggg cctggctggt caagacctac gtggtgccct acctgatcgt    360
60 gaacatgtgg ctcggtctca tcacgtgct ccagcacacg caccgcgcyg tgccgacta    420
    cttcgagaag gactgggact ggctgcgcyg cgccatggcc accgtggacc gctccatggg    480

```

ES 2 909 143 T3

```

ccgcgcccttc atggacaaca tcctgcacca catctccgac acccactgtc tgcaccacct      540
cttcagcacc atccccgact accacgcca ggaggcctcc gccgccatca ggcccactct      600
5  gggcaagtac taccagtccg acagccgctg ggtcggccgc gccctgtggg aggactggcg      660
cgactgccgc tacgtcgtcc cggacgcgcc cgaggacgac tccgcgctct ggttcacaa      720
10  gtgagtgagt ga                                                              732

<210> 104
<211> 384
<212> PRT
15  <213> Carthamus tinctorius

<400> 104

Met Ala Thr Ala Ser Thr Phe Ser Ala Phe Asn Ala Arg Cys Gly Asp
20  1          5          10          15

Leu Arg Arg Ser Ala Gly Ser Gly Pro Arg Arg Pro Ala Arg Pro Leu
25          20          25          30

Pro Val Arg Gly Arg Ala Ala Thr Gly Glu Gln Pro Ser Gly Val Ala
30          35          40          45

Ser Leu Arg Glu Ala Asp Lys Glu Lys Ser Leu Gly Asn Arg Leu Arg
35          50          55          60

Leu Gly Ser Leu Thr Glu Asp Gly Leu Ser Tyr Lys Glu Lys Phe Val
40  65          70          75          80

Ile Arg Cys Tyr Glu Val Gly Ile Asn Lys Thr Ala Thr Ile Glu Thr
45          85          90          95

Ile Ala Asn Leu Leu Gln Glu Val Gly Gly Asn His Ala Gln Gly Val
50          100          105          110

Gly Phe Ser Thr Asp Gly Phe Ala Thr Thr Thr Thr Met Arg Lys Leu
55          115          120          125

His Leu Ile Trp Val Thr Ala Arg Met His Ile Glu Ile Tyr Arg Tyr
60          130          135          140

Pro Ala Trp Ser Asp Val Ile Glu Ile Glu Thr Trp Val Gln Gly Glu
65          145          150          155

Gly Lys Val Gly Thr Arg Arg Asp Trp Ile Leu Lys Asp Tyr Ala Asn
70          165          170          175

```

ES 2 909 143 T3

Gly Glu Val Ile Gly Arg Ala Thr Ser Lys Trp Val Met Met Asn Glu
180 185 190

5 Asp Thr Arg Arg Leu Gln Lys Val Ser Asp Asp Val Arg Glu Glu Tyr
195 200 205

10 Leu Val Phe Cys Pro Arg Thr Leu Arg Leu Ala Phe Pro Glu Glu Asn
210 215 220

15 Asn Asn Ser Met Lys Lys Ile Pro Lys Leu Glu Asp Pro Ala Glu Tyr
225 230 235 240

20 Ser Arg Leu Gly Leu Val Pro Arg Arg Ser Asp Leu Asp Met Asn Lys
245 250 255

His Val Asn Asn Val Thr Tyr Ile Gly Trp Ala Leu Glu Ser Ile Pro
260 265 270

25 Pro Glu Ile Ile Asp Thr His Glu Leu Gln Ala Ile Thr Leu Asp Tyr
275 280 285

30 Arg Arg Glu Cys Gln Arg Asp Asp Ile Val Asp Ser Leu Thr Ser Arg
290 295 300

35 Glu Pro Leu Gly Asn Ala Ala Gly Val Lys Phe Lys Glu Ile Asn Gly
305 310 315 320

Ser Val Ser Pro Lys Lys Asp Glu Gln Asp Leu Ser Arg Phe Met His
325 330 335

40 Leu Leu Arg Ser Ala Gly Ser Gly Leu Glu Ile Asn Arg Cys Arg Thr
340 345 350

45 Glu Trp Arg Lys Lys Pro Ala Lys Arg Met Asp Tyr Lys Asp His Asp
355 360 365

50 Gly Asp Tyr Lys Asp His Asp Ile Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
370 375 380

<210> 105
<211> 408
55 <212> PRT
<213> Cuphea wrightii
<400> 105

60 Met Val Val Ala Ala Ala Ala Ser Ser Ala Phe Phe Pro Val Pro Ala
1 5 10 15

ES 2 909 143 T3

Pro Arg Pro Thr Pro Lys Pro Gly Lys Phe Gly Asn Trp Pro Ser Ser
 20 25 30
 5
 Leu Ser Gln Pro Phe Lys Pro Lys Ser Asn Pro Asn Gly Arg Phe Gln
 35 40 45
 10 Val Lys Ala Asn Val Ser Pro His Pro Lys Ala Asn Gly Ser Ala Val
 50 55 60
 15 Ser Leu Lys Ser Gly Ser Leu Asn Thr Leu Glu Asp Pro Pro Ser Ser
 65 70 75 80
 20 Pro Pro Pro Arg Thr Phe Leu Asn Gln Leu Pro Asp Trp Ser Arg Leu
 85 90 95
 Arg Thr Ala Ile Thr Thr Val Phe Val Ala Ala Glu Lys Gln Phe Thr
 100 105 110
 25 Arg Leu Asp Arg Lys Ser Lys Arg Pro Asp Met Leu Val Asp Trp Phe
 115 120 125
 30 Gly Ser Glu Thr Ile Val Gln Asp Gly Leu Val Phe Arg Glu Arg Phe
 130 135 140
 35 Ser Ile Arg Ser Tyr Glu Ile Gly Ala Asp Arg Thr Ala Ser Ile Glu
 145 150 155 160
 40 Thr Leu Met Asn His Leu Gln Asp Thr Ser Leu Asn His Cys Lys Ser
 165 170 175
 Val Gly Leu Leu Asn Asp Gly Phe Gly Arg Thr Pro Glu Met Cys Thr
 180 185 190
 45 Arg Asp Leu Ile Trp Val Leu Thr Lys Met Gln Ile Val Val Asn Arg
 195 200 205
 50 Tyr Pro Thr Trp Gly Asp Thr Val Glu Ile Asn Ser Trp Phe Ser Gln
 210 215 220
 55 Ser Gly Lys Ile Gly Met Gly Arg Glu Trp Leu Ile Ser Asp Cys Asn
 225 230 235 240
 60 Thr Gly Glu Ile Leu Val Arg Ala Thr Ser Ala Trp Ala Met Met Asn
 245 250 255
 Gln Lys Thr Arg Arg Phe Ser Lys Leu Pro Cys Glu Val Arg Gln Glu

ES 2 909 143 T3

	260	265	270	
5	Ile Ala Pro His Phe Val Asp Ala Pro Pro Val Ile Glu Asp Asn Asp 275 280 285			
10	Arg Lys Leu His Lys Phe Asp Val Lys Thr Gly Asp Ser Ile Cys Lys 290 295 300			
15	Gly Leu Thr Pro Gly Trp Asn Asp Phe Asp Val Asn Gln His Val Ser 305 310 315 320			
20	Asn Val Lys Tyr Ile Gly Trp Ile Leu Glu Ser Met Pro Thr Glu Val 325 330 335			
25	Leu Glu Thr Gln Glu Leu Cys Ser Leu Thr Leu Glu Tyr Arg Arg Glu 340 345 350			
30	Cys Gly Arg Glu Ser Val Val Glu Ser Val Thr Ser Met Asn Pro Ser 355 360 365			
35	Lys Val Gly Asp Arg Ser Gln Tyr Gln His Leu Leu Arg Leu Glu Asp 370 375 380			
40	Gly Ala Asp Ile Met Lys Gly Arg Thr Glu Trp Arg Pro Lys Asn Ala 385 390 395 400			
45	Gly Thr Asn Arg Ala Ile Ser Thr 405			
50	<210> 106 <211> 1155 <212> ADN <213> Secuencia Artificial			
55	<220> <223> Secuencia con codones optimizados			
60	<400> 106 atggccaccg catccacttt ctcggcgttc aatgcccgct gggcgacct gcgtcgctcg 60 gcgggctccg ggccccggcg cccagcgagg cccctccccg tgcgcgggcg cgccgccacc 120 ggcgagcagc cctccggcgt ggctccctg cgcgaggccg acaaggagaa gtcctggggc 180 aaccgcctgc gcctgggctc cctgaccgag gacggcctgt cctacaagga gaagtctgtg 240 atccgctgct acgaggtggg catcaacaag accgccacca tcgagaccat cgccaacctg 300 ctgcaggagg tgggcggcaa ccacgccag ggcgtgggct tctccaccga cggcttcgcc 360 accaccacca ccatgcgcaa gctgcacctg atctgggtga ccgccgcat gcacatcgag 420			

ES 2 909 143 T3

	atctaccgct accccgcctg gtccgacgtg atcgagatcg agacctgggt gcagggcgag	480
	ggcaaggtgg gcacccgccg cgactggatc ctgaaggact acgccaacgg cgaggtgatc	540
5	ggccgcgccca cctccaagtg ggtgatgatg aacgaggaca cccgccgcct gcagaaggtg	600
	tccgacgacg tgcgcgagga gtacctggtg ttctgcccc gcaccctgcg cctggccttc	660
10	cccgaggaga acaacaactc catgaagaag atccccaaagc tggaggacc cgcgagtac	720
	tccgcctg gcttggtgcc ccgccctcc gacctggaca tgaacaagca cgtgaacaac	780
	gtgacctaca tggctgggc cctggagtcc atccccccg agatcatcga cacccacgag	840
15	ctgcaggcca tcacctgga ctaccgccgc gagtgccagc gcgacgacat cgtggactcc	900
	ctgacctccc gcgagcccct gggcaacgcc gccggcgtga agttcaagga gatcaacggc	960
20	tccgtgtccc ccaagaagga cgagcaggac ctgtcccgt tcatgcacct gctgcctcc	1020
	gccggctccg gcctggagat caaccgctgc cgcaccgagt ggcgcaagaa gcccgccaag	1080
	cgcatggact acaaggacca cgacggcgac tacaaggacc acgacatcga ctacaaggac	1140
25	gacgacgaca agtga	1155
30	<210> 107 <211> 1236 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
35	<220> <223> secuencia con codones optimizados	
40	<400> 107 atggtggtgg ccgccgccgc cagcagcgcc ttcttcccc tgccccccc ccgccccacc	60
	cccaagcccc gcaagttcgg caactggccc agcagcctga gccagccctt caagcccaag	120
	agcaacccca acggccgctt ccaggtgaag gccaacgtga gccccacgg gcgcgcccc	180
	aaggccaacg gcagcgccgt gagcctgaag tccggcagcc tgaacaccct ggaggacccc	240
45	cccagcagcc ccccccccg caccttctg aaccagctgc ccgactggag ccgctgcgc	300
	accgccatca ccacctggtt cgtggccgcc gagaagcagt tcacccgctt ggaccgcaag	360
	agcaagcgcc ccgacatgct ggtggactgg ttcggcagcg agaccatcgt gcaggacggc	420
50	ctggtgttcc gcgagcgctt cagcatccgc agctacgaga tcggcgccga ccgcaccgcc	480
	agcatcgaga ccctgatgaa ccacctgcag gacaccagcc tgaaccactg caagagcgtg	540
55	ggcctgctga acgacggctt cggccgcacc cccgagatgt gcacccgcga cctgatctgg	600
	gtgctgacca agatgcagat cgtggtgaac cgctaccca cctggggcga cacctggag	660
	atcaacagct ggttcagcca gagcggcaag atcggcatgg gccgcgagtg gctgatcagc	720
60	gactgcaaca ccggcgagat cctggtgctc gccaccagcg cctgggcoat gatgaaccag	780

ES 2 909 143 T3

```

aagacccgcc gcttcagcaa gctgccctgc gaggtgcgcc aggagatcgc cccccacttc      840
gtggacgccc cccccgtgat cgaggacaac gaccgcaagc tgcacaagtt cgacgtgaag      900
5  accggcgaca gcatctgcaa gggcctgacc cccggctgga acgacttcga cgtgaaccag      960
cacgtgagca acgtgaagta catcggtgga attctggaga gcatgcccac cgaggtgctg     1020
10 gagacccagg agctgtgcag cctgacctg gagtaccgcc gcgagtgcgg ccgcgagagc     1080
gtggtggaga gcgtgaccag catgaacccc agcaaggtgg gcgaccgcag ccagtaccag     1140
cacctgctgc gcctggagga cggcggcagc atcatgaagg gccgcaccga gtggcgcccc     1200
15 aagaacgccg gcaccaaccg cgccatcagc acctga

<210> 108
<211> 612
20 <212> ADN
   <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> construcción de secuencia de ADN donadora 5' de la construcción de
25 direccionamiento de recombinación homóloga de FATA1 de Prototheca moriformis inactivada

<400> 108
gctcttcgga gtcactgtgc cactgagttc gactggtagc tgaatggagt cgctgctcca      60
30 ctaaacgaat tgtcagcacc gccagccggc cgaggaccgc agtcatagcg agggtagtag     120
cgcgccatgg caccgaccag cctgcttgcc agtactggcg tctcttccgc ttctctgtgg     180
tctctgcgcg gctccagcgc gtgcgctttt ccggtggatc atgcgggtccg tggcgcaccg     240
35 cagcggccgc tgcccatgca gcgccgctgc ttccgaacag tggcggtcag ggccgcaccc     300
gcggtagccg tccgtccgga acccgcccaa gagttttggg agcagcttga gccctgcaag     360
40 atggcgggag acaagcgcac cttcctggag gagcaccggt gcgtggaggt ccggggctga     420
ccggccgctc cattcaacgt aatcaatcgc atgatgatca gaggacacga agtcttggtg     480
gcggtggcca gaaacactgt ccattgcaag ggcatagggg tgcgttcctt cacctctcat     540
45 ttctcatttc tgaatccctc cctgctcact ctttctctc ctccttcccg ttcacgcagc     600
attcggggta cc                                                                612

50 <210> 109
   <211> 528
   <212> ADN
   <213> Secuencia Artificial

55 <220>
   <223> construcción de secuencia de ADN donadora 3' de la construcción de
   direccionamiento de recombinación homóloga de FATA1 de Prototheca moriformis inactivada

60 <400> 109
gacaggtggt ttggctggat ggggaaacgc tggctgcggg attcgatcct gctgcttata      60

```

ES 2 909 143 T3

	tctccctgg aagcacacc acgactctga agaagaaaac gtgcacacac acaacccaac	120
5	cggccgaata tttgcttct tatcccgggt ccaagagaga ctgcatgcc cccctcaatc	180
	agcatcctcc tcctgcccgc ttcaatcttc cctgcttgcc tgcgcccgcg gtgcgccgtc	240
	tgcccgccca gtcagtcact cctgcacagg ccccttgctg gcagtgctcc tgtacccttt	300
10	accgctcctt ccattctgcg aggcccccta ttgaatgtat togttgctg tgtggccaag	360
	cgggctgctg ggcgcgccgc cgtcgggcag tgctcggcga ctttgccgga agccgattgt	420
15	tcttctgtaa gccacgcgct tgctgctttg ggaagagaag ggggggggta ctgaatggat	480
	gaggaggaga aggaggggta ttggtattat ctgagttggg tgaagagc	528
20	<210> 110 <211> 767 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
25	<220> <223> Porción de construcción FATA del casete de expresión de ARN horquillado	
	<400> 110	
	atggcaccga ccagcctgct tgccagtact ggcgtctctt ccgcttctct gtggctctct	60
30	gcgcgctcca gcgcgtgcgc ttttccgggt gatcatgcgg tccgtggcgc accgcagcgg	120
	ccgctgcca tgcagcgcgc ctgcttccga acagtggcgg tcagggccgc acccgcggta	180
35	gccgtccgct ccgaaccgc ccaagagttt tgggagcagc ttgagccctg caagatggcg	240
	gaggacaagc gcatcttct ggaggagcac cggtgctggt aggtccgggg ctgaccggcc	300
	gtcgcattca acgtaatcaa tcgcatgatg atcagaggac acgaagtctt ggtggcgggtg	360
40	gccagaaaca ctgtccattg caagggcata gggatgcggt ccttcacctc tcatttctca	420
	tttctgaatc cctccctgct cactctttct cctcctcctt cccgttcaag cagcattcgg	480
45	ggcaacgagg tgggcccgtg ctctccagg aagatgcgct tgcctccgc catcttgcaag	540
	ggctcaagct gctcccaaaa ctcttgggcg ggttccggac ggacggctac cgcgggtgcg	600
	gccctgaccg cactgttctg gaagcagcgg cgtgcatgg gcagcggccg ctgcggtgcg	660
50	ccacggaccg catgatccac cggaaaagcg cacgcgctgg agcgcgcaga ggaccacaga	720
	gaagcggaag agacgccagt actggcaagc aggtggctg gtgcat	767
55	<210> 111 <211> 3499 <212> ADN <213> Secuencia Artificial	
60	<220> <223> construcción sintética	

ES 2 909 143 T3

<400> 111
gctcttcgga gtcactgtgc cactgagttc gactggtagc tgaatggagt cgctgctcca 60
5 ctaaacgaat tgtcagcacc gccagccggc cgaggaccog agtcatagcg agggtagtag 120
cgcgccatgg caccgaccag cctgcttgcc agtactggcg tctcttccgc ttctctgtgg 180
tcctctgcmc gctccagcmc gtgcgctttt ccggtggatc atgcggtccg tggcgcaccg 240
10 cagcggccgc tgcccatgca gcgccgctgc ttccgaacag tggcggtcag ggccgcaccc 300
gcggtagccg tccgtccgga acccgcccaa gagttttggg agcagcttga gccctgcaag 360
15 atggcggagg acaagcgcac cttcctggag gagcaccggc gcgtggaggc ccggggctga 420
ccggccgctc cattcaacgt aatcaatcmc atgatgatca gaggacacga agtcttggtg 480
gcggtggcca gaaacactgt ccattgcaag gccataggga tgcgttcctt cacctctcat 540
20 ttctcatttc tgaatccctc cctgctcact ctttctctc ctcttcccg ttcacgcagc 600
attcggggta ccctttcttg cgctatgaca cttccagcaa aaggtagggc gggctgcmg 660
25 acggcttccc ggcgctgcat gcaaacccga tgatgcttcg accccccgaa gctccttcgg 720
ggctgcatgg gcgctccgat gccgctccag ggcgagcgc gtttaaatag ccaggcccc 780
gattgcaaag acattatagc gagctaccaa agccatattc aaacacctag atcactacca 840
30 cttctacaca ggccactcga gcttgtgatc gcaactccgc aagggggcmc ctcttctct 900
tcgtttcagt cacaaccgc aaacggcmc ccattgctgc gcaggcctt ctgttctgc 960
35 tggcggctt cgccgccaag atcagcgcct ccattgacgaa cgagacgtcc gaccgcccc 1020
tggtgcactt ccccccaac aagggtgga tgaacgacc caacggcctg tggtagcmg 1080
agaaggacgc caagtggcac ctgtacttcc agtacaacc gaacgacacc gtctggggga 1140
40 cgcccttgtt ctggggccac gccacgtccg acgacctgac caactgggag gaccagcca 1200
tcgccatcmc cccgaagcmc aacgactccg gcgcttctc cggtccatg gtggtggact 1260
45 acaacaacac ctccgcttc ttcaacgaca ccattgaccc gcgccagcmc tgcgtggcca 1320
tctggaccta caacacccg gagtccgagg agcagtacat ctctacagc ctggacggcg 1380
gctacacctt caccgagtac cagaagaacc ccgtgctggc cgccaactcc accagttcc 1440
50 gcgacccgaa ggtcttctgg tacgagcct cccagaagtg gatcatgacc gcggccaagt 1500
cccaggacta caagatcmg atctactcct ccgacgacct gaagtcctgg aagctggagt 1560
55 ccgcttcmc caacgagggc ttctcggct accagtacga gtgccccgc ctgactcmg 1620
tccccaccga gcaggacccc agcaagctc actgggtgat gttcatctcc atcaacccg 1680
gcgccccgc cggcggctcc ttcaaccagt acttctcgg cagcttcaac ggcacccact 1740
60 tcgaggcctt cgacaaccag tcccgcgtgg tggacttcmg caaggactac tacgccctgc 1800
agaccttctt caacaccgac ccgacctacg ggagcgcct gggcatcmg tggcctcca 1860

ES 2 909 143 T3

	actgggagta ctccgccttc gtgcccacca acccoctggcg ctccctccatg tccctcgtgc	1920
5	gcaagttctc cctcaacacc gagtaccagg ccaacccgga gacggagctg atcaacctga	1980
	aggccgagcc gatcctgaac atcagcaacg ccggcccctg gagccggttc gccaccaaca	2040
	ccacgttgac gaaggccaac agctacaacg tcgacctgtc caacagcacc ggcaccctgg	2100
10	agttcgagct ggtgtacgcc gtcaacacca cccagacgat ctccaagtcc gtgttcgogg	2160
	acctctccct ctggttcaag ggcctggagg accccgagga gtacctccgc atgggcttcg	2220
15	agggtgccgc gtcctccttc ttctggacc gcgggaacag caagggtgaag ttcgtgaagg	2280
	agaacccta cttaccaac cgcatgagcg tgaacaacca gcccttcaag agcgagaacg	2340
	acctgtccta ctacaagtg tacggcttgc tggaccagaa catcctggag ctgtacttca	2400
20	acgacggcga cgtcgtgtcc accaacacct acttcatgac caccgggaac gccctgggct	2460
	ccgtgaacat gacgacgggg gtggacaacc tgttctacat cgacaagttc caggtgcgcg	2520
25	aggtaagtgc acaattggca gcagcagctc ggatagtatc gacacactct ggacgctggt	2580
	cgtgtgatgg actggttccg ccacacttgc tgccttgacc tgtgaatata cctgccgctt	2640
	ttatcaaaca gcctcagtgt gtttgatctt gtgtgtacgc gcttttgcca gttgctagct	2700
30	gcttgtgcta tttgcgaata ccaccccag catccccttc cctcgtttca tatcgcttgc	2760
	atcccaaccg caacttatct acgctgtcct gctatccctc agcgctgctc ctgctcctgc	2820
35	tcaactcccc tcgcacagcc ttggtttggg ctccgcctgt attctcctgg tactgcaacc	2880
	tgtaaaccag cactgcaatg ctgatgcacg ggaagtatg ggatgggaac acaaatggag	2940
	gatcgtagag ctcaactagta tcgatttcca agacaggggtg gttggctgga tggggaaacg	3000
40	ctgggtcgcgg gattcgatcc tgcctgctt atcctccctg gaagcacacc cacgactctg	3060
	aagaagaaaa cgtgcacaca cacaacccaa ccggccgaat atttgcttcc ttatcccggg	3120
45	tccaagagag actgcgatgc cccctcaat cagcctcctc ctccctgccg cttcaatctt	3180
	ccctgcttgc ctgcgcccgc ggtgcgcgct ctgcccgcc agtcagtcac tcctgcacag	3240
	gccccttgct cgcagtgctc ctgtaccctt taccgctcct tccattctgc gaggccccct	3300
50	attgaatgta ttcggtgcct gtgtggccaa gcgggctgct gggcgcgccg ccgtcgggca	3360
	gtgctcggcg actttggcgg aagccgattg ttcttctgta agccacgcgc ttgctgcttt	3420
55	gggaagagaa ggggggggggt actgaatgga tgaggaggag aaggaggggt attggtatta	3480
	tctgagttgg gtgaagagc	3499

60	<210> 112	
	<211> 6514	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	

ES 2 909 143 T3

<220>

<223> construcción sintética

5 <400> 112
gctcttcgga gtcactgtgc cactgagttc gactggtagc tgaatggagt cgctgctcca 60
ctaaacgaat tgtcagcacc gccagccggc cgaggaccgc agtcatagcg agggtagtag 120
10 cgcgccatgg caccgaccag cctgcttgcc agtactggcg tctcttccgc ttctctgtgg 180
tcctctgcgc gctccagcgc gtgcgctttt ccggtggatc atgcggtccg tggcgcaaccg 240
cagcggccgc tgcccatgca gcgcccgtgc ttccgaacag tggcggtcag ggccgcaccc 300
15 gcggtagccg tccgtccgga acccgcccaa gagttttggg agcagcttga gccctgcaag 360
atggcggagg acaagcgc atctctggag gagcaccggt gcgtggaggc ccggggctga 420
20 ccggccgctc cattcaacgt aatcaatcgc atgatgatca gaggacacga agtcttgggtg 480
gcggtggcca gaaacactgt ccattgcaag ggcataggga tgcgttcctt cacctctcat 540
ttctcatttc tgaatccctc cctgctcact ctttctcctc ctccttcccg ttcacgcagc 600
25 attcggggta ccctttcttg cgctatgaca cttccagcaa aaggtagggc gggctgcgag 660
acggcttccc ggcgctgcat gcaacaccga tgatgcttcg accccccgaa gctccttcgg 720
30 ggctgcatgg gcgctccgat gccgctocag ggcgagcgc gtttaaatag ccaggcccc 780
gattgcaaag acattatagc gagctaccaa agccatattc aaacacctag atcactacca 840
cttctacaca ggccaactga gcttgtgatc gcaactccgct aagggggcgc ctcttctct 900
35 tcgtttcagt cacaaccgc aaacggcgc ccatgctgct gcaggccttc ctgttctgc 960
tggccggctt cgccgccaag atcagcgcct ccatgacgaa cgagacgtcc gaccgcccc 1020
40 tggtgcaact ccccccaac aagggtgga tgaacgacc caacggcctg tggtagcagc 1080
agaaggacgc caagtggcac ctgtacttcc agtacaacc gaacgacacc gtctggggga 1140
cgcccttgtt ctggggccac gccacgtccg acgacctgac caactgggag gaccagcca 1200
45 tcgccatcgc cccgaagcgc aacgactccg gcgccttctc cggctccatg gtggtggact 1260
acaacaacac ctccggttc ttcaacgaca ccatcgacc gcgccagcgc tgcgtggcca 1320
50 tctggaccta caacaccccg gagtccgagg agcagtacat ctcctacagc ctggacggcg 1380
gctacacctt caccgagtac cagaagaacc ccgtgctggc cgccaactcc acccagttcc 1440
gcgacccgaa ggtcttctgg tacgagccct ccagaagtg gatcatgacc gcgccaagt 1500
55 ccaggaacta caagatcgag atctactcct ccgacgacct gaagtcctgg aagctggagt 1560
ccgcgttcgc caacgagggc ttctctggct accagtacga gtgccccggc ctgatcgagg 1620
60 tccccaccga gcaggacccc agcaagtcc actgggtgat gttcatctcc atcaacccc 1680
gcgccccggc oggcggctcc ttcaaccagt acttcgtcgg cagcttcaac ggcacccact 1740

ES 2 909 143 T3

	tcgaggcctt cgacaaccag tcccgcgtgg tggacttcgg caaggactac tacgccctgc	1800
5	agaccttctt caacaccgac ccgacctacg ggagcgcctt gggcatcgcg tgggcctcca	1860
	actgggagta ctccgccttc gtgcccacca acccctggcg ctctccatg tccctcgtgc	1920
	gcaagttctc cctcaacacc gagtaccagg ccaacccgga gacggagctg atcaacctga	1980
10	aggccgagcc gatcctgaac atcagcaacg ccggcccctg gagccggttc gccaccaaca	2040
	ccacgttgac gaaggccaac agctacaacg tcgacctgtc caacagcacc ggcaccctgg	2100
15	agttcgagct ggtgtacgcc gtcaaacacca cccagacgat ctccaagtcc gtgttcgcgg	2160
	acctctccct ctggttcaag ggctggagg accccgagga gtacctccgc atgggcttcg	2220
	agggtgccgc gtctctcttc ttctggacc gcgggaacag caaggtgaag ttcgtgaagg	2280
20	agaaccctta cttaccaaac cgcatgagcg tgaacaacca gcccttcaag agcgagaacg	2340
	acctgtccta ctacaaggty tacggcttgc tggaccagaa catcctggag ctgtacttca	2400
25	acgacggcga cgtcgtgtcc accaacacct acttcatgac caccgggaac gccctgggct	2460
	ccgtgaacat gacgacgggg gtggacaacc tgttctacat cgacaagttc caggtgcgcg	2520
	aggtaagty acaattggca gcagcagctc ggatagtatc gacacactct ggacgtggt	2580
30	cgtgtgatgg actggtgcog ccacacttgc tgccctgacc tgtgaatata cctgccgctt	2640
	ttatcaaaca gcctcagtgt gtttgatctt gtgtgtacgc gcttttgca gttgctagct	2700
35	gcttgtgcta tttgcgaata ccacccccag catccccctc cctcgtttca tategettgc	2760
	atoccaaccg caacttatct acgctgtcct gctatccctc agcgctgctc ctgctcctgc	2820
	tactgcccc tcgcacagcc ttggtttggg ctccgcctgt attctcctgg tactgcaacc	2880
40	tgtaaaccag cactgcaatg ctgatgcacg ggaagtagtg ggatgggaac acaaatggag	2940
	gatcccgct ctcgaacaga gcgcgcagag gaacgctgaa ggtctgcct ctgtcgcacc	3000
45	tcagcgcggc atacaccaca ataaccacct gacgaatgcg cttggttctt cgtccattag	3060
	cgaagcgtcc ggttcacaca cgtgccacgt tggcgaggty gcaggtgaca atgatcggty	3120
	gagctgatgg tcgaaacgtt cacagcctag ggatatcgaa ttcggccgac aggacgcgcg	3180
50	tcaaaggtyc tggtcgtgta tgccctggcc ggcaggtycgt tgctgctgct ggttagtgat	3240
	tcgcgaacct tgattttggc gtcttatttt ggcgtggcaa acgctggcgc ccgcgagccg	3300
55	ggcggcggc gatgcggtgc cccacggctg ccggaatcca agggaggcaa ggcgcgccg	3360
	gtcagttgaa gggctttacg cgcaaggtyc agccgctcct gcaaggctgc gtggtggaat	3420
	tggacgtgca ggtcctgctg aagttcctcc accgcctcac cagcggacaa agcaccggtg	3480
60	tatcaggtcc gtgtcatcca ctctaaagag ctcgactacg acctactgat ggccttagat	3540
	tcttcatcaa aaacgcctga gacacttgcc caggattgaa actccctgaa gggaccacca	3600

ES 2 909 143 T3

	ggggccctga gttgttcctt cccccgtgg cgagctgcca gccaggctgt acctgtgac	3660
5	gaggctggcg ggaaaatagg cttcgtgtgc tcaggctatg ggaggtgcag gacagctcat	3720
	gaaacgccaa caatcgcaca attcatgtca agctaatacag ctatttcctc ttcacgagct	3780
	gtaattgtcc caaaattctg gtctaccggg ggtgatcctt cgtgtacggg cccttcctc	3840
10	aaccctaggt atgcgcgcat gcggtcgccg cgcaactcg cgcagggccg agggtttggg	3900
	acgggccgtc ccgaaatgca gttgcacccg gatgctggc accttttttg cgataattta	3960
15	tgcaatggac tgctctgcaa aattctggct ctgtcgccaa ccctaggatc agcggcgtag	4020
	gatttcgtaa tcattcgtcc tgatggggag ctaccgacta ccctaatac agcccactg	4080
	cctgacgcca gcgtccactt ttgtgcacac attccattcg tgcccaagac atttcattgt	4140
20	ggtgccaagc gtccccagtt acgtcacct gtttcccgac ctccttactg ttctgtcgac	4200
	agagcgggcc cacaggccgg tcgcagccac tagtatggtg gtggccgccg ccgccagcag	4260
25	cgcttcttc cccgtgcccg cccccgccc ccccccaag cccggcaagt tcggcaactg	4320
	gcccagcagc ctgagccagc cttcaagcc caagagcaac cccaacggcc gcttccaggt	4380
	gaaggccaac gtgagcccc acgggcgcgc cccaaggcc aacggcagcg ccgtgagcct	4440
30	gaagtccggc agcctgaaca ccctggagga cccccagc agccccccc cccgcacctt	4500
	cctgaaccag ctgcccgaact ggagccgcct gcgcaccgcc atcaccaccg tgttcgtggc	4560
35	cgccgagaag cagttcaccg gcctggaccg caagagcaag cgccccgaca tgctggtgga	4620
	ctggttcggc agcgagacca tcgtgcagga cggcctggtg ttccgcgagc gcttcagcat	4680
	ccgcagctac gagatcggcg ccgaccgcac cgccagcatc gagaccctga tgaaccacct	4740
40	gcaggacacc agcctgaacc actgcaagag cgtgggcctg ctgaacgacg gcttcggccg	4800
	cacccccgag atgtgcaccc gcgacctgat ctgggtgctg accaagatgc agatcgtggt	4860
45	gaaccgctac ccacactggg gcgacaccgt ggagatcaac agctggttca gccagagcgg	4920
	caagatcggc atgggcccgg agtggtgat cagcgactgc aacaccggcg agatcctggt	4980
	gcgcgccacc agcgcctggg ccatgatgaa ccagaagacc cgccgcttca gcaagetgcc	5040
50	ctgcgaggtg cgccaggaga tcgccccca cttcgtggac gcccccccg tgatcgagga	5100
	caacgaccgc aagctgcaca agttcgacgt gaagaccggc gacagcatct gcaagggcct	5160
55	gacccccggc tggaacgact tcgacgtgaa ccagcacgtg agcaacgtga agtacatcgg	5220
	ctggattctg gagagcatgc ccaccgaggt gctggagacc caggagctgt gcagcctgac	5280
	cctggagtac cgccgcgagt gcgcccgca gagcgtggtg gagagcgtga ccagcatgaa	5340
60	ccccagcaag gtgggcgacc gcagccagta ccagcacctg ctggcctgg aggacggcgc	5400
	cgacatcatg aagggccgca ccgagtggcg cccaagaac gccggcacca accgcgcat	5460

ES 2 909 143 T3

cagcacctga ttaattaact cgaggcagca gcagctcgga tagtatcgac aactctgga 5520
 5 cgctggctgt gtgatggact gttgccgcca cacttgctgc cttgacctgt gaatatccct 5580
 gccgctttta tcaaacagcc tcagtgtggt tgatcttggt tgtacgcgct tttgcgagtt 5640
 gctagctgct tgtgctatth gcgaatacca cccccagcat ccccttcctt cgtttcatat 5700
 10 cgcttgcatc ccaaccgcaa cttatctacg ctgtcctgct atccctcagc gctgctcctg 5760
 ctctgctca ctgcccctcg cacagccttg gtttgggctc gcctgtatt ctctggtac 5820
 15 tgcaacctgt aaaccagcac tgcaatgctg atgcacggga agtagtggga tgggaacaca 5880
 aatggaaagc ttgagctctt gttttccaga aggagttgct ccttgagcct ttcattctca 5940
 gcctcgataa cctccaaagc cgctctaatt gtggaggggg ttcgaagaca ggggtggttg 6000
 20 ctggatgggg aaacgctggt cgcgggattc gatcctgctg cttatatcct ccctggaagc 6060
 acaccacga ctctgaagaa gaaaacgtgc acacacacaa cccaaccggc cgaatatttg 6120
 25 ctctcttatc ccgggtccaa gagagactgc gatgcccccc tcaatcagca tcctcctccc 6180
 tgccgcttca atcttccctg cttgctgctg cccgcggtgc gccgtctgcc cgcccagtea 6240
 gtcactcctg cacaggcccc ttgtgcgag tgctcctgta cctttaccg ctcttccat 6300
 30 tctgcgaggc ccctattga atgtattcgt tgctgtgtg gccaaagcgg ctgctgggag 6360
 cgccgctgc gggcagtgt cggcgacttt ggcggaagcc gattgttctt ctgtaagcca 6420
 35 cgcgcttctg gctttgggaa gagaaggggg ggggtactga atggatgagg aggagaagga 6480
 ggggtatttg tattatctga gttgggtgaa gagc 6514

 <210> 113
 40 <211> 5546
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 45 <223> construcción sintética

 <400> 113
 gctcttcgcc gccgcaactc ctgctcgagc gcgcccgcgc gtgcgcccgc agcgcttgg 60
 50 ccttttcgcc gcgctcgtgc gcgtcgtga tgtccatcac caggccatg aggtctgctt 120
 tgccgctgct gagccactgc ttcgtccggg cggccaagag gagcatgagg gaggactcct 180
 55 ggtccagggc cctgacgtgg tcgcgctctt gggagcgggc cagcatcatc tggtctgcc 240
 gcaccgaggc cgcctccaac tggctcctca gcagccgag tcgcccgcga ccctggcaga 300
 ggaagacagg tgaggggggt atgaattgta cagaacaacc acgagccttg tctaggcaga 360
 60 atccctacca gtcattgctt tacctggatg acggcctgct aacagctgtc cagcgacct 420
 cgctgccgcc gcttctcccg cacgcttctt tccagcaccg tgatggcgcg agccagcgcc 480

ES 2 909 143 T3

	gcacgctggc gctgcgcttc gccgatctga ggacagtcgg ggaactctga tcagtctaaa	540
5	cccccttgcg cgttagtgtt gccatccttt gcagaccggt gagagccgac ttgttgctgc	600
	ccacccccca caccacctcc tcccagacca attctgtcac ctttttggcg aaggcatcgg	660
	cctcggcctg cagagaggac agcagtgcc agccgctggg ggttggcgga tgcacgctca	720
10	ggtacccttt cttgcgctat gacacttcca gaaaaggta gggcgggctg cgagacggct	780
	tcccggcgct gcatgcaaca ccgatgatgc ttcgaccccc cgaagctcct tcggggctgc	840
15	atgggcgctc cgatgccgct ccagggcgag cgctgtttaa atagccaggc ccccgattgc	900
	aaagacatta tagcgagcta ccaaagccat attcaaacac ctagatcact accacttcta	960
	cacaggccac tcgagcttgt gatcgactc cgctaagggg ggcctcttc ctcttcgttt	1020
20	cagtcacaac ccgcaaactc tagaatatca atgctgctgc aggccttctt gttcctgctg	1080
	gccggcttcg ccgccaagat cagcgcctcc atgacgaacg agacgtccga ccgccccctg	1140
25	gtgcacttca cccccaaaaa gggctggatg aacgaccca acggcctgtg gtacgacgag	1200
	aaggacgcca agtggcacct gtacttocag tacaaccgga acgacaccgt ctgggggacg	1260
	cccttgttct ggggccacgc cagtcogac gacctgacca actgggagga ccagcccatc	1320
30	gccatcgccc cgaagcgcaa cgactcggc gccttctccg gctccatggt ggtggactac	1380
	aaacacacct ccggttctt caacgacacc atcgaccgc gccagcgtg cgtggccatc	1440
35	tggacctaca acaccccgga gtccgaggag cagtacatct cctacagcct ggacggcggc	1500
	tacaccttca ccgagtacca gaagaacccc gtgctggccg ccaactccac ccagttccgc	1560
	gaccggaag tcttctggta cgagccctcc cagaagtgga tcatgaccgc ggccaagtcc	1620
40	caggactaca agatcgagat ctactcctcc gacgacctga agtcctggaa gctggagtcc	1680
	gcgttcgcca acgaggctt cctcggctac cagtacgagt gccccggcct gatcgaggtc	1740
45	cccaccgagc aggaccccag caagtctac tgggtgatgt tcatctccat caaccccggc	1800
	gccccggccg gcggtcctt caaccagtac ttcgtcggca gttcaacgg cacccacttc	1860
	gaggccttcg acaaccagtc ccgctgggtg gacttcggca aggactacta cgccctgcag	1920
50	accttcttca acaccgacc gacctacggg agcgccttg gcatcgctg ggcctccaac	1980
	tgggagtact ccgcttcgt gccaccaac ccctggcgt cctccatgtc cctcgtgogc	2040
55	aagttctccc tcaacaccga gtaccaggcc aaccgggaga cggagctgat caacctgaag	2100
	gccgagccga tcctgaacat cagcaacgcc ggcccctgga gccggttcgc caccaacacc	2160
	acgttgacga aggccaacag ctacaacgtc gacctgtcca acagaccgg cacctggag	2220
60	ttcgagctgg tgtacgccgt caacaccacc cagacgatct ccaagtccgt gttcgcggac	2280
	ctctccctct ggttcaaggg cctggaggac cccgaggagt acctccgcat gggcttcgag	2340

ES 2 909 143 T3

gtgtccggt cctccttctt cctggaccgc ggaacagca aggtgaagtt cgtgaaggag 2400
 5 aaccctact tcaccaaccg catgagcgtg aacaaccagc cttcaagag cgagaacgac 2460
 ctgtcctact acaaggtgta cggcttgctg gaccagaaca tctggagct gtacttcaac 2520
 gacggcgacg tcgtgtccac caacacctac ttcatgacca cggggaacgc cctgggctcc 2580
 10 gtgaacatga cgacgggggt ggacaacctg ttctacatcg acaagttcca ggtgcgcgag 2640
 gtcaagtgac aattggcagc agcagctcgg atagtatcga cacactctgg acgctggtcg 2700
 15 tgtgatggac tgttgccgcc aacttgctg cettgacctg tgaatatccc tgccgctttt 2760
 atcaaacagc ctcaagtgtg ttgatcttgt gtgtacgcgc ttttgcgagt tgctagctgc 2820
 ttgtgctatt tgcgaatacc acccccagca tcccctccc tegtttcata tcgcttgcac 2880
 20 cccaaccgca acttatctac gctgtcctgc tatccctcag cgctgctcct gctcctgctc 2940
 actgcccctc gcacagcctt ggtttgggct ccgcctgtat tctcctggta ctgcaacctg 3000
 25 taaaccagca ctgcaatgct gatgcacggg aagtagtggg atgggaacac aaatggagga 3060
 tcccgctct cgaacagagc gcgcagagga acgctgaagg tctcgctct gtcgcacctc 3120
 agcgcggcat acaccacaat aaccacctga cgaatgcgct tggttctctg tccattagcg 3180
 30 aagcgtccgg ttcacacacg tgccacgttg gcgaggtggc aggtgacaat gatcggtgga 3240
 gctgatggtc gaaacgttca cagcctaggg atatcgaatt ctttcttgc gctatgacac 3300
 35 ttccagcaaa aggtagggcg ggctgcgaga cggcttcccg gcgctgcatg caacaccgat 3360
 gatgcttca cccccgaag ctcttcggg gctgcatggg cgctccgatg ccgctccagg 3420
 gcgagcgtg tttaaatagc caggccccg attgcaaaga cattatagcg agctacaaa 3480
 40 gccatattca aacacctaga tcactaccac ttctacacag gccactcgag cttgtgatcg 3540
 cactccgcta agggggcgcc tcttctctt cgtttcagtc acaaccgca aacctagta 3600
 45 tggcaccgac cagcctgctt gccagtactg gcgtctcttc cgcttctctg tggtcctctg 3660
 cgcgctccag cgcgtgcgct tttccgggtg atcatgcggt ccgtggcgca ccgcagcggc 3720
 cgctgcccat gcagcgcgc tgcttccgaa cagtggcggc cagggccgca cccgcggtag 3780
 50 ccgtccgtcc ggaaccgcc caagagttt ggagcagct tgagccctgc aagatggcgg 3840
 aggacaagcg catcttctctg gaggagcacc ggtgcgtgga ggtccggggc tgaccggccg 3900
 55 tcgcattcaa cgtaatcaat cgcgatgata tcagaggaca cgaagtcttg gtggcgggtg 3960
 ccagaaacac tgtccattgc aagggcatag ggatgcgttc cttcacctct catttctcat 4020
 ttctgaatcc ctccctgctc actctttctc ctctccttc ccgttcacgc agcattcggg 4080
 60 gcaacgaggt gggcccgtgc tctccagga agatgcgctt gtctccgcc atcttgcagg 4140
 gctcaagctg ctccaaaac tcttgggctg gttccggacg gacggctacc gcgggtgcgg 4200

ES 2 909 143 T3

	ccctgaccgc cactgttcgg aagcagcggc gctgcatggg cagcggccgc tgcggtgcgc	4260
5	cacggaccgc atgatccacc ggaaaagcgc acgcgctgga gcgcgcagag gaccacagag	4320
	aagcgggaaga gacgccagta ctggcaagca ggctggtcgg tgccatatcg atagatctct	4380
	taaggcagca gcagctcggg tagtatcgac aactctgga cgctggtcgt gtgatggact	4440
10	gttgccgcca cacttgctgc cttgacctgt gaatatccct gccgcttcta tcaaacagcc	4500
	tcagtgtggt tgatcttggt tgtacgcgct tttgcgagtt gctagctgct tgtgctatct	4560
15	gcgaatacca cccccagcat ccccttcctt cgtttcatat cgcttgcatc ccaaccgcaa	4620
	cttatctacg ctgtcctgct atccctcagc gctgctcctg ctctgctca ctgccctcgc	4680
	cacagccttg gtttgggctc cgctgtatt ctctgggtac tgcaacctgt aaaccagcac	4740
20	tgcaatgctg atgcacggga agtagtggga tgggaacaca aatggaaagc ttaattaaga	4800
	gctcttggtt tccagaagga gttgctcctt gaggccttca ttctcagcct cgataacctc	4860
25	caaagccgct ctaattgtgg agggggttcg aatttaaaag cttggaatgt tggttcgtgc	4920
	gtctggaaca agcccagact tgttgctcac tgggaaaagg accatcagct ccaaaaaact	4980
	tgccgctcaa accgcgtacc tctgctttcg cgcaatctgc cctggtgaaa tcgccaccac	5040
30	attcatattg tgacgcttga gcagtctgta attgcctcag aatgtggaat catctgcccc	5100
	ctgtgctgagc ccatgccagg catgtcggcg gcgaggacac ccgccactcg tacagcagac	5160
35	cattatgcta cctcacaata gttcataaca gtgaccatat ttctcgaagc tccccaaaga	5220
	gcacctccat gctctgagtg gccaccccc ggccctgggtg cttgctggag gcaggtcaac	5280
	cggcattggg ctaccgaaat ccccgaccgg atcccaccac ccccgcatg ggaagaatct	5340
40	ctccccggga tgtgggcccc ccaccagcac aacctgctgg ccagggcgag cgtcaaacca	5400
	taccacacaa atatccttgg catcggccct gaattccttc tgccgctctg ctaccgggtg	5460
45	cttctgtccg aagcaggggt tgctagggat cgctccgagt ccgcaaacc ttgtcgcgtg	5520
	gcggggcttg ttcgagcttg aagagc	5546
50		

REIVINDICACIONES

- 5 1. Microbio de *Chlorella* o *Prototheca* modificado genéticamente para eliminar o regular a la baja un gen endógeno de acil-ACP tioesterasa.
2. Microbio de la reivindicación 1, en donde el microbio está diseñado para alterar una acil-ACP tioesterasa endógena.
- 10 3. Microbio de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la acil-ACP tioesterasa endógena se elimina por recombinación homóloga.
4. Microbio de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el microbio está diseñado para expresar un ARN inhibidor que actúa sobre una acil-ACP tioesterasa endógena.
- 15 5. Microbio de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el microbio comprende además uno o más genes exógenos que son expresados por la célula.
6. Microbio de la reivindicación 5, en donde el gen exógeno codifica una sacarasa, una acil-ACP tioesterasa o una desaturasa.
- 20 7. Microbio de la reivindicación 6, en donde el/los gen(es) exógeno(s) codifica(n): una sacarasa; una acil-ACP tioesterasa; o una sacarasa y una acil-ACP tioesterasa.
- 25 8. Microbio de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el microbio es *Prototheca moriformis* o *Chlorella protothecoides*.
9. Microbio de la reivindicación 8, en donde el microbio es *Prototheca moriformis*.
- 30 10. Método para producir un aceite microbiano, donde el método comprende:
- a. cultivar un microbio según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9; y
- b. separar el aceite del microbio.
- 35 11. Método de la reivindicación 10, que además incluye el paso de:
- c. someter el aceite a refinado, blanqueo, desodorización o desgomado para producir aceite microbiano RBD.
- 40 12. Método de la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en donde el método comprende adicionalmente añadir un antioxidante, un desactivador de iones metálicos, un inhibidor de la corrosión, un desemulsionante, un aditivo antidesgaste, un depresor del punto de fluidez o un compuesto antihidrólisis al aceite microbiano.
- 45 13. Aceite producido mediante el método de cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en donde el aceite comprende menos del 7,5 % de C18:2, y en donde:
- i) el número de copias del gen exógeno es superior a 2;
- ii) el gen exógeno es la tioesterasa FatB2 de *Cuphea wrightii*; y
- iii) el microbio es *Prototheca moriformis*.

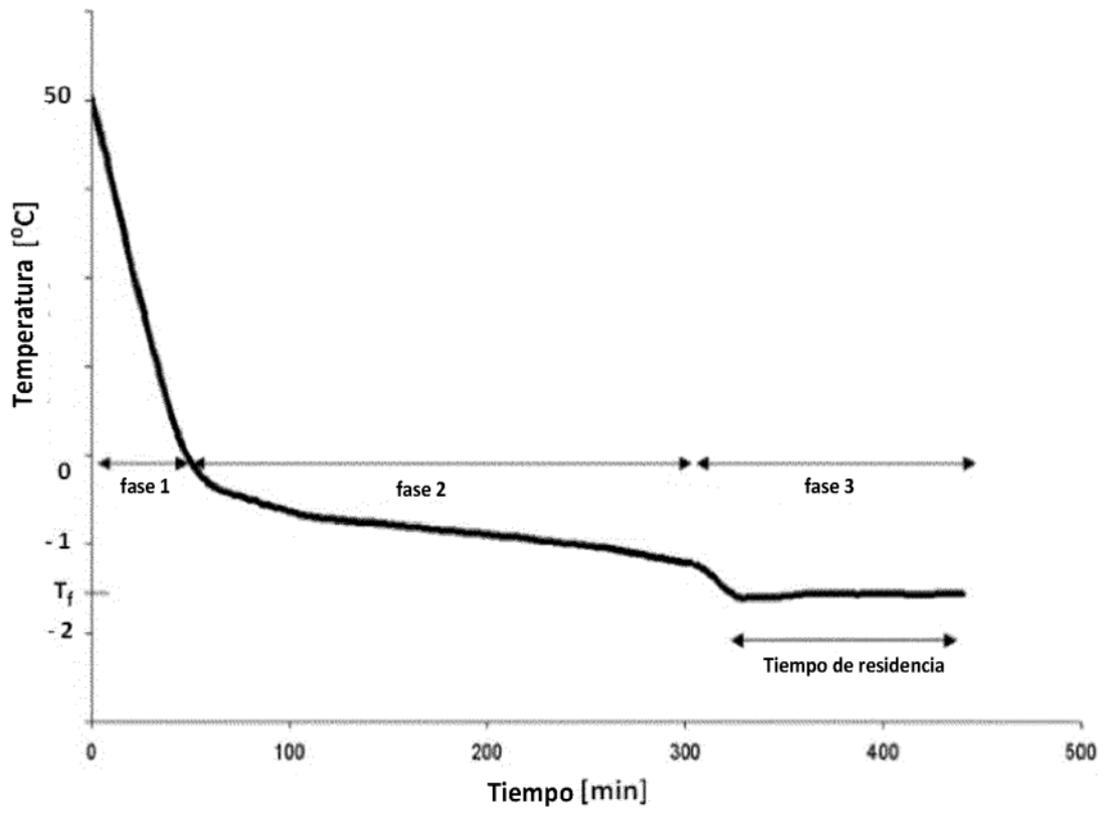


Fig. 1

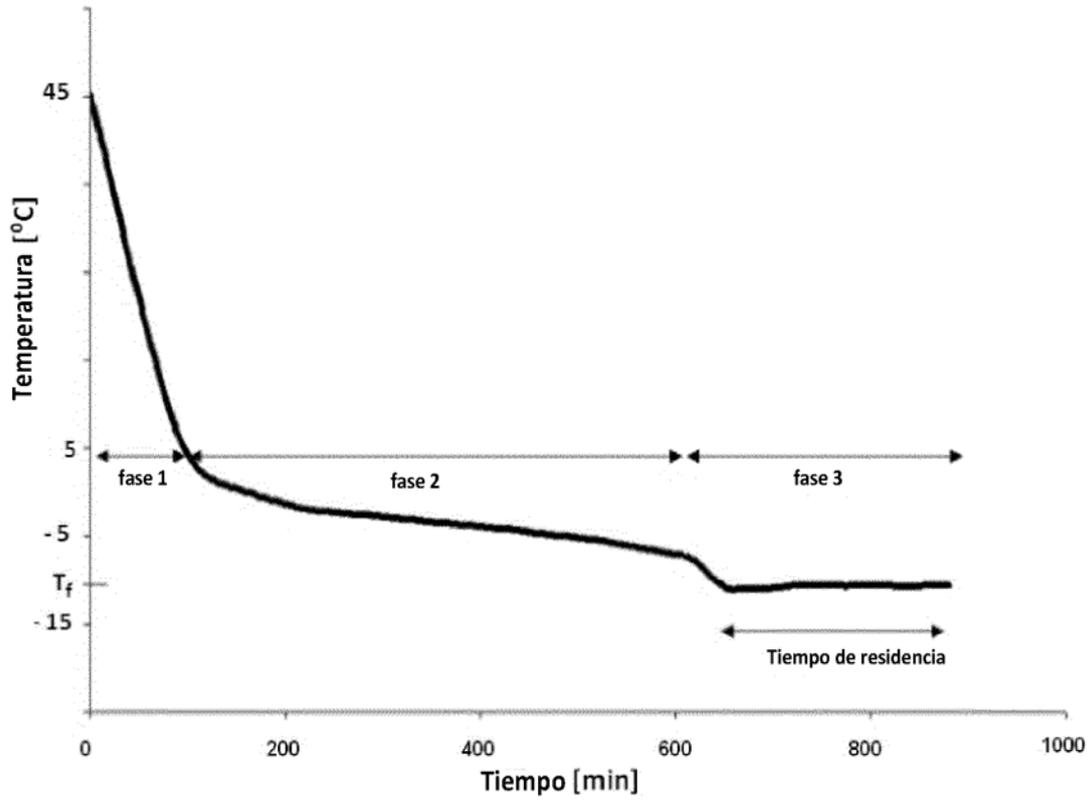


Fig. 2

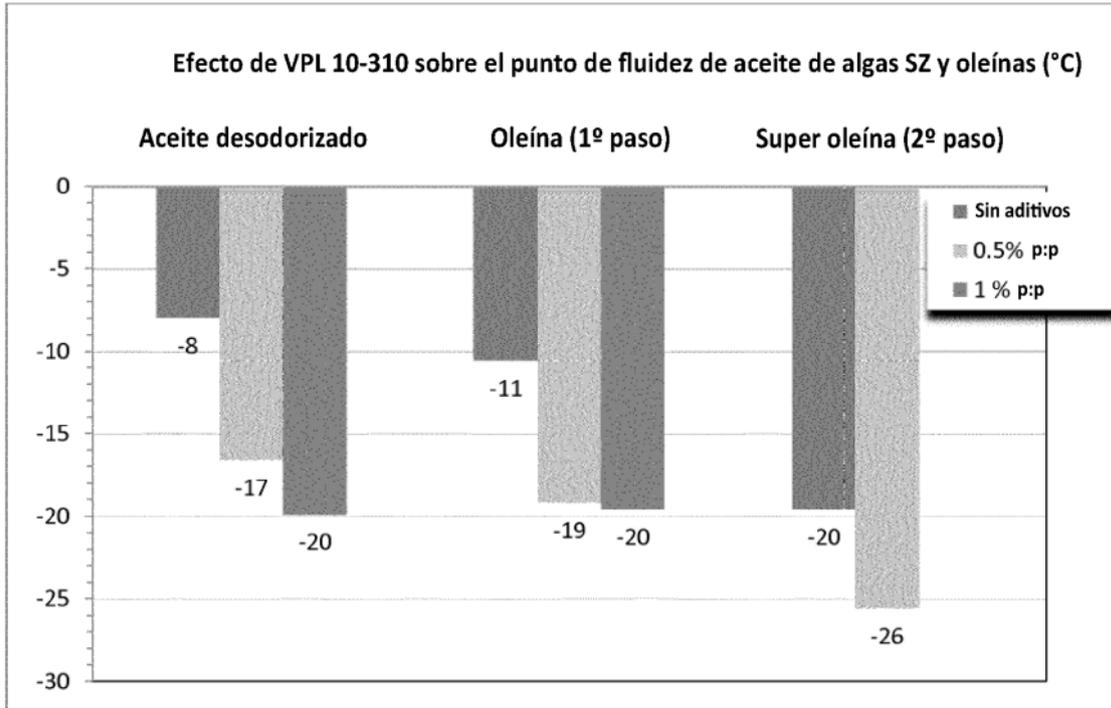


Fig. 3