

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 886 026**

51 Int. Cl.:

C12N 9/04 (2006.01)

C12P 7/42 (2006.01)

C12P 7/64 (2006.01)

C12N 1/19 (2006.01)

C12R 1/73 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.12.2014** **PCT/EP2014/077237**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.06.2015** **WO15086684**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2014** **E 14830951 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.07.2021** **EP 3080252**

54 Título: **Cepas de levadura y procedimiento para la producción de hidroxiácidos grasos y ácidos dicarboxílicos**

30 Prioridad:

12.12.2013 DE 102013022175

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.12.2021

73 Titular/es:

PROVIVI, INC. (100.0%)
1701 Colorado Avenue
Santa Monica, California 90404, US

72 Inventor/es:

GATTER, MICHAEL;
MATTHÄUS, FALK y
BARTH, GEROLD

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 886 026 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

Cepas de levadura y procedimiento para la producción de hidroxiácidos grasos y ácidos dicarboxílicos

5 La invención se refiere a diversas cepas de levadura de la especie *Yarrowia lipolytica*, así como procedimientos correspondientes para la producción biocatalítica de ω -hidroxiácidos grasos o ácidos dicarboxílicos con la ayuda de estas cepas.

10 En el caso de los ácidos dicarboxílicos se trata de ácidos carboxílicos con dos grupos carboxi (estructura general: $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$), que encuentran diversas aplicaciones en la industria química, p. ej., para la producción de fragancias, adhesivos, nailon y otras poliamidas, resinas, inhibidores de la corrosión o lubricantes. En particular, la producción biotecnológica de ácidos dicarboxílicos de cadena larga es de particular interés, ya que se forman una serie de subproductos indeseables en la síntesis química de estos.

15 Los ω -hidroxiácidos grasos contienen en el átomo de C_ω (átomo de C con la mayor distancia posible del grupo carboxi) un grupo hidroxilo (estructura general: $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_2\text{OH}$). Los ω -hidroxiácidos grasos son asimismo de gran importancia en la industria química, ya que se utilizan, entre otros, en lubricantes, adhesivos, agentes cosméticos y agentes terapéuticos contra el cáncer. Además, los ω -hidroxiácidos grasos podrían alcanzar una gran importancia en el futuro, ya que pueden utilizarse como monómeros para la síntesis de bioplásticos.

20 Para la obtención de ω -hidroxiácidos grasos y ácidos dicarboxílicos a partir de *n*-alcanos y ácidos grasos en el marco de esta invención, se utiliza la levadura no convencional *Yarrowia* (*Y.*) *lipolytica*. Se eligió la levadura *Y. lipolytica* como organismo huésped para la bioconversión, porque es capaz de utilizar una pluralidad de sustratos como fuente de carbono. Además de glucosa, glicerol, proteínas, alcoholes y acetato, a ellos pertenece también una gran cantidad de sustratos hidrófobos, tales como aceites vegetales, grasas, ácidos grasos y *n*-alcanos (Barth G y Gaillardin C (1997) FEMS Microbiol Rev 19: 219-237.). Los sustratos hidrófobos son emulsionados por las levaduras y son absorbidos en el interior de la célula con ayuda de transportadores de membrana especializados (Fickers P, Benetti PH, Wache Y, Marty A, Mauersberger S, Smit MS y Nicaud JM (2005) FEMS Yeast Res 5: 527-543.). Los *n*-alcanos absorbidos en la célula se convierten gradualmente en ácidos grasos con la misma longitud de cadena en el marco de la oxidación del alcano primario (monoterminal) (Fig. 1). Los ácidos grasos se descomponen a continuación en el marco de la β -oxidación a acetyl-CoA, que fluye hacia el ciclo del ácido tricarboxílico y glioxilato. Paralelamente a la β -oxidación de los ácidos grasos en los peroxisomas, la ω -oxidación tiene lugar en el retículo endoplasmático (véase la Fig. 1). Sin embargo, esta oxidación di-terminal de los ácidos grasos se produce de forma natural en un grado mucho menor que la β -oxidación.

35 Diferentes levaduras, tales como, p. ej., *Candida* (*C.*) *tropicalis* e *Y. lipolytica*, son capaces de convertir alcanos de cadena larga o ácidos grasos en ácidos α,ω -dicarboxílicos. Con el fin de que los sustratos hidrófobos puedan convertirse en el ácido dicarboxílico respectivo, su metabolismo debe evitarse en el marco de la β -oxidación. Esto se puede hacer, p. ej., eliminando los genes POX que codifican la acil-CoA oxidasa. Si se desactiva la β -oxidación, esto conduce a un aumento de la β -oxidación de los ácidos grasos (Smit et al. (2005) Biotechnol. Lett. 27: 859-864.).

40 La producción microbiana de ácidos dicarboxílicos de cadena larga ya se ha realizado con ayuda de la levadura *C. tropicalis*:

45 • Picataggio S, Rohrer T, Deanda K, Lanning D, Reynolds R, Mielenz J y Eirich LD (1992) Biotechnology (N Y) 10: 894-898.

50 La producción de ácidos dicarboxílicos se logró en este caso, principalmente, mediante la delección de los genes *POX4* y *POX5*. Existe una serie de patentes que protegen las cepas de producción correspondientes de *C. tropicalis*, así como los correspondientes procedimientos de producción (p. ej., documentos US4339536A, EP296506A2 y WO200017380A1).

55 Un documento de patente de 2013 se describe cómo se puede hacer que levaduras en general (de una manera en sí conocida) puedan producir cantidades elevadas de ácidos dicarboxílicos. En los ejemplos de realización, sin embargo, aquí solo se trata en especial de *C. tropicalis* (documentos WO201306730A2, WO201306733A2).

Asimismo, la producción microbiana de ácidos dicarboxílicos de cadena larga ya se llevó a cabo con ayuda de la levadura *C. tropicalis*:

60 • Lu W, Ness JE, Xie W, Zhang X, Minshull J y Gross RA (2010) J Am Chem Soc 132: 15451-15455.

Para ello, además de los genes *POX4* y *POX5*, se eliminaron seis genes del citocromo P450, cuatro de alcohol oxidasa y seis de alcohol deshidrogenasa. Estas cepas y procedimientos de producción ya están protegidos por patente (documento WO2011008232A2).

65 Además, ya se ha descrito cómo se puede inducir a *Y. lipolytica* a formar ácidos dicarboxílicos:

- Smit MS, Mokgoro MM, Setati E y Nicaud JM (2005) *Biotechnol Lett* 27: 859-864.

En este caso, se eliminaron todos los genes de acil-CoA oxidasa actualmente conocidos (*POX1*, *POX2*, *POX3*, *POX4*, *POX5* y *POX6*), así como el gen de acil-CoA-diacilglicerol-aciltransferasa (*DGA1*) y el gen de lecitina-colesterol-aciltransferasa (*LRO1*). Además, se sobre-expresó el gen de NADPH-citocromo P450-reductasa (*CPR1*) (documento WO200664131A8).

Junto a la producción biotecnológica de ω -hidroxiácidos grasos y ácidos dicarboxílicos con ayuda de levaduras modificadas genéticamente aprovechando la ω -oxidación intracelular de ácidos grasos, existen también otros procesos biotecnológicos que se basan en otras reacciones enzimáticas. Un ejemplo de esto lo representa el uso de monooxigenasa de Baeyer-Villiger, que cataliza la conversión de una cetona en un éster (documento WO2013151393A1).

Misión de la presente invención es proporcionar nuevas cepas de levadura de la especie *Y. lipolytica* que sean adecuadas para la producción microbiana de ω -hidroxiácidos grasos o ácidos dicarboxílicos, en cantidades mayores que las hasta ahora conocidas, así como un procedimiento para el cultivo de estas cepas.

El problema se resuelve mediante una cepa de levadura según la reivindicación 1, así como mediante un procedimiento según la reivindicación 8. Ejecuciones ventajosas se indican en las reivindicaciones dependientes. Por lo tanto, la invención proporciona lo siguiente:

Una cepa de levadura de la especie *Yarrowia lipolytica*, que presenta una reducción en la actividad de Fao1p, codificada por el gen FAO1: YALIOB14014g, en donde la cepa de levadura presenta también una reducción de las actividades de los genes de acil-CoA-oxidasas *POX1*, *POX2*, *POX3*, *POX4*, *POX5* y *POX6*, en donde las actividades de las proteínas Fao1p, *POX1*, *POX2*, *POX3*, *POX4*, *POX5* y *POX6* se reducen mediante

- (i) delección parcial o completa de los genes codificantes para Fao1p, *POX1*, *POX2*, *POX3*, *POX4*, *POX5* y *POX6* o
- (ii) expresión de genes no funcionales para Fao1p, *POX1*, *POX2*, *POX3*, *POX4*, *POX5* y *POX6* o
- (iii) inhibición o reducción de la actividad de los genes expresados para Fao1p, *POX1*, *POX2*, *POX3*, *POX4*, *POX5* y *POX6* por inserción, sustitución o mutación puntual en el gen que codifica la proteína.

De acuerdo con la solicitud, se proporciona una cepa de levadura de la especie *Y. lipolytica* para la producción microbiana de ω -hidroxiácidos grasos a partir de sustratos hidrófobos, que presenta una reducción de las actividades de las acil-CoA-oxidasas (a saber, *POX1*: YALIOE32835g, *POX2*: YALIOF10857g, *POX3*: YALIOD24750g, *POX4*: YALIOE27654g, *POX5*: YALIOC23859g, *POX6*: YALIOE06567g), en donde en esta cepa de levadura están reducidas, además, las actividades de alcohol (graso)-deshidrogenasas (= alcohol (de ácido graso)-deshidrogenasas, a saber, elegidas de *FADH*: YALIOF09603g, *ADH1*: YALIOD25630g, *ADH2*: YALIOE17787g, *ADH3*: YALIOA16379g, *ADH4*: YALIOE15818g, *ADH5*: YALIOD02167g, *ADH6*: YALIOA15147g y/o *ADH7*: YALIOE07766g) y están reducidas las actividades de las alcohol(graso)-oxidasas (= alcohol (de ácido graso)-oxidasas relevantes, a saber, *FAO1*: YALIOB14014g), lo cual conduce a una formación incrementada de ω -hidroxiácidos grasos, preferiblemente ω -hidroxiácidos grasos lineales de acuerdo con la estructura general: $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_2\text{OH}$, $\text{HOOC}-(\text{C}_n\text{H}_{2n-2})-\text{CH}_2\text{OH}$, $\text{COOC}-(\text{C}_n\text{H}_{2n-4})-\text{CH}_2\text{OH}$ o $\text{HOOC}-(\text{C}_n\text{H}_{2n-6})-\text{CH}_2\text{OH}$, con n en el intervalo de 6 a 18, preferiblemente en el intervalo de 8 a 16, de un sustrato hidrófobo, en particular un *n*-alcano correspondiente o un ácido graso (y otros sustratos hidrófobos).

De manera particularmente preferida, el ω -hidroxiácido graso es un ω -hidroxiácido graso lineal de acuerdo con la estructura general: $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_2\text{OH}$, con n en el intervalo de 8 a 16.

La formación de ω -hidroxiácidos grasos o bien ácidos dicarboxílicos aumenta en el sentido de la presente invención si se incrementa en al menos un 10% en moles, de manera particularmente preferida en al menos un 20% en moles, en comparación con células de levadura sin la correspondiente modificación genética.

La invención se basa en el conocimiento obtenido recientemente de que pudo identificarse el gen que codifica la alcohol graso-oxidasa de *FAO1*: YALIOB14014g en la cepa de levadura de la especie *Y. lipolytica*,

Además, los autores de la invención han descubierto ahora, sorprendentemente, que la delección del gen que codifica la enzima Fao1p reduce la ω -oxidación adicional de los ω -hidroxiácidos grasos a aldehído de ácido graso o bien al ácido dicarboxílico en el marco de la ω -oxidación de ácidos grasos.

De manera particularmente ventajosa, la reducción de la actividad de los productos de *FADH*, *ADH1*, *ADH2*, *ADH3*, *ADH4*, *ADH5*, *ADH6*, *ADH7* y/o *FAO1* previene o reduce la oxidación adicional de los ω -hidroxiácidos grasos a aldehído de ácido graso o bien al ácido dicarboxílico en el marco de la ω -oxidación de ácidos grasos.

El gen de la alcohol graso-oxidasa no se ha descrito hasta ahora en *Y. lipolytica*. Su uso en el marco de campos de aplicación biotecnológicos representa igualmente una parte de esta invención.

Preferiblemente, por una reducción en la actividad de una proteína se ha de entender que se reduce la actividad de la proteína por célula. De manera particularmente preferida por ello debe entenderse la falta de actividad de la proteína en la célula de levadura.

La reducción de la actividad de las proteínas se puede conseguir mediante diversos procedimientos conocidos por el experto en la materia, tales como p. ej.:

- (i) mediante la inhibición o reducción de la expresión de los genes que lo codifican
- (ii) mediante la delección parcial o completa de los genes que lo codifican
- (iii) mediante la expresión de genes no funcionales
- (iv) mediante la inhibición o reducción de la actividad de los genes expresados.

La inhibición o reducción de la expresión de un gen que codifica una proteína puede tener lugar, por ejemplo, mediante la inhibición o reducción de la transcripción del gen codificante o de la traducción del ARNm formado. La delección de los genes codificantes puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante una expansión de los genes por medio de casetes de delección. La expresión de un producto génico disfuncional o de actividad reducida puede producirse, por ejemplo, mediante inserción, sustitución o mutación puntual en el gen que codifica la proteína.

En el caso de la reducción de la actividad, se prefiere la delección de un gen codificante.

Preferiblemente, la cepa de levadura según la invención para la producción de ω -hidroxiácidos grasos presenta, por consiguiente, una delección de los genes para las acil-CoA-oxidasas (*POX1*, *POX2*, *POX3*, *POX4*, *POX5* y *POX6*), así como para las alcohol (graso)-deshidrogenasas (*FADH*, *ADH1*, *ADH2*, *ADH3*, *ADH4*, *ADH5*, *ADH6*, *ADH7*) y/o para las alcohol (graso)- oxidasas (*FAO1*). Además, se reduce la formación de las células grasas, preferiblemente reduciendo la actividad de los productos génicos de *PAH1* y/o *SCT1*.

La delección de los genes *POX1*, *POX2*, *POX3*, *POX4*, *POX5* y *POX6* previene la β -oxidación y, por consiguiente, impide la degradación de los ácidos grasos (a acetil-CoA o bien propionil-CoA).

Preferiblemente, en la cepa de levadura según la invención para la producción microbiana de ω -hidroxiácidos grasos están incrementadas las actividades de cualquier o de la totalidad de los productos génicos del citocromo P450, en particular, de *ALK1*: YALIOE25982g, *ALK2*: YALIOF01320g, *ALK3*: YALIOA20130g, *ALK4*: YALIOB13816g, *ALK5*: YALIOB13838g, *ALK6*: YALIOB01848g, *ALK7*: YALIOA15488g, *ALK8*: YALIOC12122g, *ALK9*: YALIOB06248g, *ALK10*: YALIOB20702g, *ALK11*: YALIOC10054g y/o *ALK12*: YALIOA20130g. Ventajosamente, el aumento de productos génicos del citocromo P450 individuales o de la totalidad conduce a una formación incrementada de ω -hidroxiácidos grasos a partir del correspondiente sustrato hidrófobo, en particular *n*-alcanos y ácidos grasos.

Se puede prever ventajosamente que la actividad de la NADPH citocromo P450-reductasa (*CPR1*: YALIOD04422g) se incremente adicionalmente en la cepa de levadura según la invención para la producción microbiana de ω -hidroxiácidos grasos, lo cual conduce a una formación incrementada de ω -hidroxiácidos grasos a partir del sustrato hidrófobo correspondiente, especialmente *n*-alcanos y ácidos grasos.

Preferiblemente, en la cepa de levadura según la invención para la producción microbiana de ω -hidroxiácidos grasos se reduce adicionalmente la actividad de la ácido fosfatídico-defosfolidrolasa (*PAH1*: YALIOD27016p). Esto conduce ventajosamente a una reducción del tamaño de las células grasas y, por consiguiente, a una formación incrementada de ω -hidroxiácidos grasos o ácidos dicarboxílicos a partir del sustrato hidrófobo correspondiente, en particular *n*-alcanos y ácidos grasos.

Según una ejecución ventajosa de la presente invención, en la cepa de levadura según la invención para la producción microbiana de ω -hidroxiácidos grasos se reduce adicionalmente la actividad de la glicerol-3-fosfato-aciltransferasa (*SCT1*: YALIOC00209g), lo cual conduce ventajosamente a una reducción del tamaño de las células grasas y, por consiguiente, a una formación incrementada de ω -hidroxiácidos grasos a partir del sustrato hidrófobo correspondiente, en particular *n*-alcanos y ácidos grasos (y otros sustratos hidrófobos).

Se puede prever, además, que en la cepa de levadura para la producción microbiana de ω -hidroxiácidos grasos esté reducida adicionalmente la actividad de la fosfolípido-diacilglicerol-aciltransferasa (*LRO1*: YALIOE16797g), lo cual conduce a una reducción del tamaño de las células grasas y, por consiguiente, a una formación incrementada de ω -hidroxiácidos grasos a partir del sustrato hidrófobo correspondiente, en particular *n*-alcanos y ácidos grasos.

Además, se da a conocer que en la cepa de levadura según la invención para la producción microbiana de ω -hidroxiácidos grasos se reduce adicionalmente la actividad de la diacilglicerol-aciltransferasa (*DGA1*: YAL10E32769g), lo cual conduce a una reducción del tamaño de las células grasas y, por consiguiente, a una formación incrementada de ω -hidroxiácidos grasos a partir del sustrato hidrófobo correspondiente, en particular *n*-alcanos y ácidos grasos.

Además, se da a conocer que en la cepa de levadura según la invención para la producción microbiana de ω -hidroxiácidos grasos está incrementada adicionalmente la actividad de la glicerol-3-fosfato-deshidrogenasa (*GUT2*: YAL10B13970g), lo cual conduce a una reducción del tamaño de las células grasas y, por consiguiente, a una formación incrementada de ω -hidroxiácidos grasos a partir del sustrato hidrófobo correspondiente, en particular *n*-alcanos y ácidos grasos.

Se ha encontrado ahora, de manera particularmente ventajosa, que el aumento adicional de las actividades de triacilglicerol-lipasas relevantes (*TGL3/TGL4*: YAL10F10010g, YAL10D16379g, YAL10D17534g) en la cepa de levadura según la invención para la producción microbiana de ω -hidroxiácidos grasos conduce a una reducción del tamaño de las células grasas y, por lo tanto, a una formación incrementada de ω -hidroxiácidos grasos a partir del correspondiente sustrato hidrófobo, en particular *n*-alcanos y ácidos grasos.

Particularmente ventajosa se ha manifestado la reducción de la actividad del transportador de citrato y oxalacetato (*YHM2*: YAL10B10736g) y/o la reducción de la actividad de la proteína transportadora de citrato (*CTP1*: YAL10F26323g) en la cepa de levadura según la invención para la producción microbiana de ω -hidroxiácidos grasos, ya que con ello se produce y/o se secreta al medio de cultivo una menor cantidad de ácidos orgánicos.

Opcionalmente, se puede prever que en la cepa de levadura según la invención para la producción microbiana de ω -hidroxiácidos grasos, esté incrementado el transporte de ω -hidroxiácidos grasos desde la célula de levadura o bien desde el retículo endoplasmático al citoplasma, p. ej., por la actividad incrementada de transportadores de membrana específicos, lo cual conduce a una formación incrementada de ω -hidroxiácidos grasos a partir del sustrato hidrófobo correspondiente, en particular *n*-alcanos y ácidos grasos.

Preferiblemente, en la cepa de levadura según la invención para la producción microbiana de ω -hidroxiácidos grasos está incrementado adicionalmente el transporte de los sustratos hidrófobos en la célula de levadura o bien de las organelas respectivas (peroxisomas, retículo endoplasmático), p. ej., por la actividad incrementada de transportadores de membrana específicos, lo cual conduce a una formación incrementada de ω -hidroxiácidos grasos a partir del sustrato hidrófobo correspondiente, en particular *n*-alcanos y ácidos grasos.

La invención se refiere también al uso de la cepa de levadura según la invención para la producción microbiana de ω -hidroxiácidos grasos de la estructura general: $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n\text{-OH}$, $\text{HOOC}-(\text{C}_n\text{H}_{2n-2})\text{-CH}_2\text{OH}$, $\text{COOC}-(\text{C}_n\text{H}_{2n-4})\text{-CH}_2\text{OH}$ o $\text{HOOC}-(\text{C}_n\text{H}_{2n-6})\text{-CH}_2\text{OH}$, con *n* en el intervalo de 6 a 18, a partir de un sustrato hidrófobo.

Además, se da a conocer una cepa de levadura de la especie *Y. lipolytica* para la producción microbiana de ácidos dicarboxílicos a partir de *n*-alcanos y ácidos grasos (y otros sustratos hidrófobos) la cual presenta una reducción de las actividades de las acil-CoA-oxidasas (a saber, *POX1*: YAL10E32835g, *POX2*: YAL10F10857g, *POX3*: YAL10D24750g, *POX4*: YAL10E27654g, *POX5*: YAL10C23859g, *POX6*: YAL10E06567g) y se caracteriza porque en esta cepa de levadura están reducidas adicionalmente las actividades de alcohol (graso)-deshidrogenasas relevantes (a saber, elegidas de *FADH*: YAL10F09603g, *ADH1*: YAL10D25630g, *ADH2*: YAL10E17787g, *ADH3*: YAL10A16379g, *ADH4*: YAL10E15818g, *ADH5*: YAL10D02167g, *ADH6*: YAL10A15147g y/o *ADH7*: YAL10E07766g) y están incrementadas las actividades de alcohol(graso)-oxidasas relevantes (a saber, *FAO1*: YAL10B14014g), lo cual conduce a una formación incrementada de ácidos dicarboxílicos, preferiblemente de acuerdo con la estructura general: $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n\text{-COOH}$, $\text{HOOC}-(\text{C}_n\text{H}_{2n-2})\text{-COOH}$, $\text{COOC}-(\text{C}_n\text{H}_{2n-4})\text{-COOH}$ o $\text{HOOC}-(\text{C}_n\text{H}_{2n-6})\text{-COOH}$, con *n* en el intervalo de 6 a 18, preferiblemente en el intervalo de 8 a 16, a partir de *n*-alcanos y ácidos grasos (y otros sustratos hidrófobos).

La cepa de levadura dada a conocer para la producción de ácidos dicarboxílicos presenta preferiblemente una delección de los genes *POX1*, *POX2*, *POX3*, *POX4*, *POX5* y *POX6*. Además, presenta una actividad incrementada de los productos de *FADH*, *ADH1*, *ADH2*, *ADH3*, *ADH4*, *ADH5*, *ADH6*, *ADH7* y/o *FAO1*. Además, se reduce la formación de las células grasas, preferiblemente reduciendo la actividad de los productos génicos de *PAH1* y/o *SCT1*.

De manera particularmente ventajosa, el incremento de la actividad de los productos génicos de *FADH*, *ADH1*, *ADH2*, *ADH3*, *ADH4*, *ADH5*, *ADH6*, *ADH7* y/o *FAO1* potencia la oxidación adicional de los ω -hidroxiácidos grasos a aldehído de ácido graso o bien al ácido dicarboxílico en el marco de la ω -oxidación de ácidos grasos, de modo que se formen en mayor medida los ácidos dicarboxílicos deseados.

Preferiblemente, por una actividad incrementada de una proteína debe entenderse que está incrementada la actividad por célula, lo cual se puede lograr mediante el aumento de la cantidad de proteína o mediante el aumento de la actividad de la propia proteína. El incremento en la cantidad de proteína se caracteriza por el hecho de que se forma más proteína que con una cepa inalterada en las mismas condiciones. El incremento de la actividad propia de la

proteína se caracteriza por el hecho de que la misma cantidad de proteína en una cepa modificada presenta una actividad mayor que en una cepa inalterada.

Se puede generar una actividad incrementada de las proteínas de diferentes formas:

(i) mediante la introducción del gen relevante en múltiples, preferiblemente de 8 a 12 copias, en el genoma del organismo (efecto gen-dosis)

(ii) mediante el intercambio del promotor natural del gen relevante por un promotor más fuerte que el natural, preferiblemente un promotor que posea al menos el 50% de la actividad del promotor del gen alfa del factor de elongación de la traducción 1 (*TEF1*: YALI0C09141g), lo más preferiblemente un promotor que posea al menos la actividad del promotor *TEF1*. En este caso, se pueden elegir promotores que estén activos durante todo el cultivo o solo en una fase de crecimiento deseada (efecto de regulación génica).

En el caso del aumento de la actividad, se prefiere particularmente la introducción adicional del gen relevante bajo el control de un promotor fuerte, preferiblemente el promotor *TEF1* de *Yarrowia lipolytica*.

De acuerdo con la invención, las cepas de levadura de la especie *Y. lipolytica* para la producción de ω -hidroxiácidos grasos o bien de ácidos dicarboxílicos no son capaces de degradar ácidos grasos en el marco de la β -oxidación. Esto puede garantizarse, por ejemplo, mediante las siguientes medidas:

(i) Reducción de la actividad de acil-CoA-oxidasas (*POX1*: YALI0E32835g, *POX2*: YALI0F10857g, *POX3*: YALI0D24750g, *POX4*: YALI0E27654g, *POX5*: YALI0C23859g, *POX6*: YALI0E06567g)

(ii) Prevención de la biogénesis de peroxisomas, p. ej., mediante reducción de la actividad de las peroxinas (p. ej., *PEX10*: YALI0C01023g)

Para la producción de ω -hidroxiácidos grasos, además de prevenir la β -oxidación, debe evitarse o reducirse la oxidación de los ω -hidroxiácidos grasos a aldehído de ácido graso o bien a ácido dicarboxílico en el marco de la ω -oxidación. Esto se puede garantizar de la siguiente manera:

(i) Reducción de la actividad de alcohol (graso)-deshidrogenasas relevantes (*FADH*: YALI0F09603g, *ADH1*: YALI0D25630g, *ADH2*: YALI0E17787g, *ADH3*: YALI0A16379g, *ADH4*: YALI0E15818g, *ADH5*: YALI0D02167g, *ADH6*: YALI0A15147g, *ADH7*: YALI0E07766g)

(ii) Reducción de la actividad de alcohol (graso)-oxidasas relevantes (*FAO1*: YALI0B14014g)

Preferiblemente, el rendimiento del producto también aumenta al influir directamente en las vías metabólicas relevantes, en particular éstas son:

(i) el aumento de la actividad de los productos génicos del citocromo P450 (*ALK1*: YALI0E25982g, *ALK2*: YALI0F01320g, *ALK3*: YALI0A20130g, *ALK4*: YALI0B13816g, *ALK5*: YALI0B13838g, *ALK6*: YALI0B01848g, *ALK7*: YALI0A15488g, *ALK8*: YALI0C12122g, *ALK9*: YALI0B06248g, *ALK10*: YALI0B20702g, *ALK11*: YALI0C10054g, *ALK12*: YALI0A20130g)

(ii) el aumento de la actividad de los productos génicos de la NADPH-citocromo P450-reductasa (*CPR1*: YALI0D04422g)

Solo para la producción de ácidos dicarboxílicos:

(iii) el aumento de la actividad de alcohol (graso)-deshidrogenasas relevantes (*FADH*: YALI0F09603g, *ADH1*: YALI0D25630g, *ADH2*: YALI0E17787g, *ADH3*: YALI0A16379g, *ADH4*: YALI0E15818g, *ADH5*: YALI0D02167g, *ADH6*: YALI0A15147g, *ADH7*: YALI0E07766g)

(iv) el aumento de la actividad de alcohol (graso)-oxidasas relevantes (*FAO1*: YALI0B14014g)

(v) el aumento de la actividad de aldehído (graso)-deshidrogenasas relevantes (*FALDH1*: YALI0A17875g, *FALDH2*: YALI0E15400g, *FALDH3*: YALI0B01298g, *FALDH4*: YALI0F23793g)

En el marco de las investigaciones de los autores de la invención, se encontró que las células forman células grasas muy grandes (*cuerpos lipídicos*) en el curso del cultivo. Se puede partir del hecho de que los ácidos grasos (o sus derivados intracelulares) se esterifican con glicerol y se almacenan intracelularmente en las células grasas. Esto reduce el rendimiento del producto finalmente logrado.

Preferiblemente, las modificaciones genéticas conducen a una formación de células grasas más pequeñas y, por consiguiente, a un rendimiento incrementado del producto, en particular éstas son:

- (i) la reducción de la actividad de la ácido fosfatídico-defosfohidrolasa (*PAH1*: YAL10D27016p)
- (ii) la reducción de la actividad de la fosfolípido-diacilglicerol-aciltransferasa (*LRO1*: YAL10E16797g)
- (iii) la reducción de la actividad de la diacilglicerol-aciltransferasa (*DGA1*: YAL10E32769g)
- (iv) la reducción de la actividad de la glicerol-3-fosfato-aciltransferasa (*SCT1*: YAL10C00209g)
- (v) el aumento de la actividad de la glicerol-3-fosfato- deshidrogenasa (*GUT2*: YAL10B13970g)
- (vi) el aumento de la actividad de las triacilglicerol-lipasas (*TGL3/TGL4*: YAL10F10010g, YAL10D16379g, YAL10D17534g)
- En particular, la reducción de la actividad de la ácido fosfatídico-defosfohidrolasa, de la diacilglicerol-aciltransferasa y/o de la glicerol-3-fosfato-aciltransferasa conduce a un rendimiento de producto incrementado, es decir, una producción de ω -hidroxiácidos grasos o bien ácidos dicarboxílicos.
- Además, se incrementa el transporte de los sustratos al interior de la célula o de las respectivas organelas (peroxisomas, retículo endoplasmático) y el transporte de los productos (ω -hidroxiácidos grasos y ácidos dicarboxílicos) desde la célula o bien desde las respectivas organelas. Esto se puede garantizar, por ejemplo, aumentando la actividad de transportadores específicos.
- Según una ejecución particularmente preferida de la presente invención, la combinación de varias de las modificaciones genéticas mencionadas anteriormente conduce a un rendimiento de producto incrementado, a un rendimiento incrementado y/o a un rendimiento espacio-tiempo incrementado.
- Como cepa de partida para la construcción de una cepa de acuerdo con la invención se puede utilizar un aislado de tipo salvaje de la levadura *Y. lipolytica*, preferiblemente la cepa H222. La cepa H222 fue depositada el 29.04.2013 en la DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, D-38142 Braunschweig) bajo el número DSM 27185 de acuerdo con el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para Fines de Procedimientos de Patentes.
- Se requiere un marcador de selección para utilizar una cepa para el tratamiento genético adicional. Este marcador de la selección se puede introducir en la cepa de una manera en sí conocida, p. ej., en forma de auxotrofia de uracilo. Alternativamente, se puede recurrir a cepas auxotróficas de uracilo ya conocidas, preferiblemente a la cepa H222-S4 (Mauersberger S, Wang HJ, Gaillardin C, Barth G y Nicaud JM (2001) J Bacteriol 183: 5102-5109.).
- Se introducen genes o construcciones adicionales que reemplazan genes existentes, preferiblemente mediante procedimientos habituales que son conocidos en el estado de la técnica. Para garantizar una transcripción eficaz de los genes introducidos, se prefiere enlazar los promotores que funcionan para el organismo con el marco de lectura abierto de los genes. En este caso, se pueden utilizar tanto promotores constitutivos como promotores que dependen de las condiciones de cultivo.
- Preferiblemente, los genes introducidos que codifican las enzimas mencionadas se disponen funcionalmente bajo el control de un promotor constitutivo, pudiendo ser que los promotores sean idénticos o diferentes entre sí.
- Se utilizan preferiblemente promotores constitutivos. Se utiliza de forma especialmente preferente el promotor del factor de elongación de la traducción 1 alfa (pTEF1).
- Alternativamente, los genes introducidos se colocan preferiblemente bajo el control de un promotor que depende de las condiciones de cultivo. Preferiblemente, los activadores o bien inductores activan el promotor (también denominado operador en el sentido de la solicitud) que depende de las condiciones de cultivo interactuando directamente con un promotor regulable o bien uniéndose a una proteína represora que luego se libera del promotor. Al poner en contacto la cepa de levadura de acuerdo con la invención con un activador y/o inductor, las enzimas arriba mencionadas se sintetizan en la cepa de levadura de acuerdo con la invención y, por consiguiente, están disponibles para la reacción biocatalítica de un sustrato hidrófobo, en particular un *n*-alcano o un ácido graso correspondiente.
- En una ejecución de la invención, los promotores que dependen de las condiciones de cultivo se diferencian entre sí, de modo que los promotores pueden activarse de una manera específica para la señal primaria. Por lo tanto, la presencia de diferentes activadores y/o inductores en la cepa de levadura puede conducir ventajosamente a la expresión de genes seleccionados, con lo cual se minimiza el estrés para una célula de levadura recombinante.
- Las correspondientes secuencias de ácido nucleico para promotores (p. ej., pTEF1, pPOX2, pPOT1, pXPR1, pICL1) que pueden utilizarse para un procedimiento según la invención, son muy conocidas por el experto en la materia o

pueden encontrarse en bancos de datos conocidos. Junto a los promotores introducidos artificialmente en organismos, también pueden utilizarse ventajosamente promotores naturales para un procedimiento de acuerdo con la invención.

Asimismo, se prefiere proveer el marco de lectura abierto de los genes con un terminador. Preferiblemente, se utiliza el terminador del gen de isocitrato liasa (ICL1t).

También se da a conocer un procedimiento para la producción biocatalítica de ω -hidroxiácidos grasos, preferiblemente de acuerdo con la estructura general: $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_2\text{OH}$, $\text{HOOC}-(\text{C}_n\text{H}_{2n-2})-\text{CH}_2\text{OH}$, $\text{COOC}-(\text{C}_n\text{H}_{2n-4})-\text{CH}_2\text{OH}$ o $\text{HOOC}-(\text{C}_n\text{H}_{2n-6})-\text{CH}_2\text{OH}$, con n en el intervalo de 6 a 18, preferiblemente en el intervalo de 8 a 16, a partir de un sustrato hidrófobo, que comprende las siguientes etapas:

a) proporcionar células de levadura de al menos una cepa de levadura de la especie *Y. lipolytica*, la cual presenta

(i) una reducción de las actividades de las acil-CoA-oxidasas,

(ii) una actividad reducida de alcohol (graso)-deshidrogenasas relevantes y

(iii) una actividad reducida de alcohol (graso)-oxidasas relevantes,

en un medio de cultivo adecuado,

b) poner en contacto las células de levadura con el sustrato hidrófobo, en donde el sustrato hidrófobo se hace reaccionar con al menos una de las enzimas de las células de levadura seleccionadas del grupo

(i) productos génicos del citocromo P450,

(ii) NADPH-citocromo P450-reductasa y

(iii) aldehído (graso)-deshidrogenasas para dar el producto de reacción ω -hidroxiácido graso

c) aislamiento del ω -hidroxiácido graso.

De manera particularmente preferida, el ω -hidroxiácido graso es un ω -hidroxiácido graso lineal de acuerdo con la estructura general: $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_2\text{OH}$, con n en el intervalo de 8 a 16.

De acuerdo con una ejecución preferida del procedimiento dado a conocer para la producción biocatalítica de ω -hidroxiácidos grasos, puede estar previsto que la reacción para dar el producto de reacción ω -hidroxiácido graso tenga lugar adicionalmente con las alcohol (graso)-oxidasas y alcohol (graso)-deshidrogenasas que quedan en las células de levadura utilizadas.

Preferiblemente, las células de levadura de al menos una cepa de levadura en el procedimiento según la invención para la producción biocatalítica de ω -hidroxiácidos grasos de la especie *Y. lipolytica* se eligen de la cepa de levadura según la invención para la producción microbiana de ω -hidroxiácidos grasos.

Sorprendentemente, se ha demostrado que después de la reacción biocatalítica del sustrato hidrófobo para dar el producto de reacción deseado ω -hidroxiácidos grasos, estos no se metabolizan más en las células de levadura según la invención de una cepa de levadura de la especie *Y. lipolytica* (es decir, se descomponen en el metabolismo del catalizador de célula completa) y se acumulan en el componente acuoso. El ω -hidroxiácido graso se acumula ventajosamente en el medio de cultivo como resultado de ser descargado de las células de levadura.

Preferiblemente, la puesta en contacto de la cepa de levadura con un sustrato hidrófobo mediante la adición directa al componente líquido tiene lugar en forma de líquido y/o sólido. En el caso de la adición directa a la cepa de levadura, también puede encontrar aplicación una fase orgánica como depósito de sustrato, con lo cual se puede optimizar el tiempo de ejecución del proceso.

En el sentido de la presente invención, se entiende por un sustrato hidrófobo una sustancia de por sí insoluble en agua, que presenta una cadena principal hidrocarbonada, eventualmente ramificada y/o insaturada con 8 a 20 átomos de carbono. Preferiblemente, el sustrato hidrófobo se elige del grupo de los n -alcanos de estructura general: $\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$ (p. ej., dodecano, pentadecano, hexadecano) o alquenos de estructura general $\text{H}_3\text{C}-(\text{C}_n\text{H}_{2n-2})-\text{CH}_3$, $\text{H}_3\text{C}-(\text{C}_n\text{H}_{2n-4})-\text{CH}_3$ o $\text{H}_3\text{C}-(\text{C}_n\text{H}_{2n-6})-\text{CH}_3$, en donde n es un número entero en el intervalo de 6 a 18, de los ácidos grasos saturados eventualmente ramificados de la estructura general: $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$, en donde n es un número entero en el intervalo de 6 a 18 (p. ej., ácido dodecanoico, ácido hexadecanoico, ácido pentadecanoico, ácido fitoico) de los ácidos grasos insaturados de estructura general: $\text{HOOC}-(\text{C}_n\text{H}_{2n-2})-\text{CH}_3$, $\text{COOC}-(\text{C}_n\text{H}_{2n-4})-\text{CH}_3$ o $\text{HOOC}-(\text{C}_n\text{H}_{2n-6})-\text{CH}_3$, en donde n es un número entero en el intervalo de 6 a 18 (p. ej., ácido oleico, ácido linoleico, ácido araquidónico) y ésteres alquílicos de ácidos grasos de estructura general: $\text{ROOC}-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$, con n en el intervalo de 6 a 18 y en donde R es un radical alquilo C_{1-4} eventualmente ramificado.

De manera particularmente preferida pero no exclusiva, los *n*-alcanos, alquenos o bien ácidos grasos saturados o bien insaturados antes mencionados, con una longitud de cadena (número de átomos de carbono en la cadena más larga) de ocho a dieciocho átomos de carbono, es decir, *n* en el intervalo de 6 a 16, sirven como sustrato hidrófobo para la bioconversión.

De acuerdo con una ejecución alternativa preferida de la presente invención, para la bioconversión sirven preferiblemente, pero no exclusivamente, *n*-alcanos y ácidos grasos con una longitud de cadena de ocho a dieciocho átomos de carbono, es decir, *n* en el intervalo de 6 a 16 como sustrato hidrófobo.

Según una ejecución preferida del procedimiento de acuerdo con la invención, la concentración del sustrato hidrófobo al comienzo de la producción es de 1 a 50 gramos por litro de medio de cultivo (g l^{-1}), de manera particularmente preferida de 5 a 40 g l^{-1} .

Además, se da a conocer un procedimiento para la preparación de ácidos dicarboxílicos, preferiblemente de acuerdo con la estructura general: $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOH}$, $\text{HOOC}-(\text{C}_n\text{H}_{2n-2})-\text{COOH}$, $\text{COOC}-(\text{C}_n\text{H}_{2n-4})-\text{COOH}$ o $\text{HOOC}-(\text{C}_n\text{H}_{2n-6})-\text{COOH}$, con *n* en el Intervalo de 6 a 18, preferiblemente en el intervalo de 8 a 16, a partir de un sustrato hidrófobo, en particular elegido de *n*-alcanos y ácidos grasos, que comprende las siguientes etapas:

a) proporcionar células de levadura de al menos una cepa de levadura de la especie *Y. lipolytica*, la cual presenta

(i) una reducción de las actividades de las acil-CoA-oxidasas,

(ii) una actividad incrementada de alcohol (graso)-deshidrogenasas relevantes y

(iii) una actividad incrementada de alcohol (graso)-oxidasas relevantes,

en un medio de cultivo adecuado,

b) poner en contacto las células de levadura con el sustrato hidrófobo, en donde el sustrato hidrófobo se hace reaccionar con al menos una de las enzimas de las células de levadura seleccionadas del grupo

(i) de los productos génicos del citocromo P450,

(ii) de la NADPH-citocromo P450-reductasa,

(iii) de las alcohol (graso)-deshidrogenasas según a),

(iv) de las alcohol (graso)-deshidrogenasas según a) y

(v) aldehído (graso)-deshidrogenasa,

para dar el producto de reacción ácido dicarboxílico,

c) aislamiento del ácido dicarboxílico.

De manera particularmente preferida, el ácido dicarboxílico graso es un ácido dicarboxílico lineal de acuerdo con la estructura general: $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_2\text{OH}$, con *n* en el intervalo de 8 a 16.

Preferiblemente, en las células de levadura para el procedimiento dado a conocer para la preparación de ω -hidroxiácidos, están adicionalmente las actividades de los distintos o de todos los productos génicos del citocromo P450, en particular, de *ALK1*: YALIOE25982g, *ALK2*: YALIOF01320g, *ALK3*: YALIOA20130g, *ALK4*: YALIOB13816g, *ALK5*: YALIOB13838g, *ALK6*: YALIOB01848g, *ALK7*: YALIOA15488g, *ALK8*: YALIOC12122g, *ALK9*: YALIOB06248g, *ALK10*: YALIOB20702g, *ALK11*: YALIOC10054g y/o *ALK12*: YALIOA20130g. Ventajosamente, el aumento de distintos o de todos productos génicos del citocromo P450 conduce a una formación incrementada de ω -hidroxiácidos grasos o ácidos dicarboxílicos a partir del correspondiente sustrato hidrófobo, en particular *n*-alcanos y ácidos grasos.

Ventajosamente, puede estar previsto que la actividad de la NADPH-citocromo P450-reductasa (*CPR1*: YALIOD04422g) se incremente en las células de levadura para el procedimiento según la invención para la preparación de ω -hidroxiácidos grasos o ácidos dicarboxílicos, lo cual conduce a una formación incrementada de ω -hidroxiácidos grasos o ácidos dicarboxílicos a partir del sustrato hidrófobo correspondiente, en particular *n*-alcanos y ácidos grasos.

Según una ejecución preferida del procedimiento dado a conocer para la preparación de ácidos dicarboxílicos, en las células de levadura están incrementadas adicionalmente las actividades de alcohol (graso)-deshidrogenasas relevantes (a saber, *FADH*: YALIOF09603g, *ADH1*: YALIOD25630g, *ADH2*: YALIOE17787g, *ADH3*: YALIOA16379g, *ADH4*: YALIOE15818g, *ADH5*: YALIOD02167g, *ADH6*: YALIOA15147g, *ADH7*: YALIOE07766g), lo cual conduce

ventajosamente a una formación incrementada de ácidos dicarboxílicos a partir del sustrato hidrófobo correspondiente, en particular *n*-alcanos y ácidos grasos.

5 Preferiblemente, en las células de levadura del procedimiento dado a conocer para la preparación de ácidos dicarboxílicos, están incrementadas las actividades de las alcohol (graso)-oxidasas relevantes (*FAO1*: YALI0B14014g), lo cual conduce a una formación incrementada de ácidos dicarboxílicos a partir del sustrato hidrófobo correspondiente, en particular *n*-alcanos y ácidos grasos

10 Según una ejecución preferida del procedimiento dado a conocer para la preparación de ácidos dicarboxílicos, en las células de levadura están incrementadas adicionalmente las actividades de aldehído (graso)-deshidrogenasas relevantes (*FALDH1*: YALI0A17875g, *FALDH2*: YALI0E15400g, *FALDH3*: YALI0B01298g, *FALDH4*: YALI0F23793g), lo cual conduce a una formación incrementada de ácidos dicarboxílicos a partir del sustrato hidrófobo correspondiente, en particular *n*-alcanos y ácidos grasos.

15 Los rendimientos de ω -hidroxiácidos grasos o bien ácidos dicarboxílicos en el procedimiento de acuerdo con la invención durante un período de tiempo de un día (es decir, 24 h) se encuentran preferiblemente en el intervalo de 1 a 20 g l⁻¹, de manera particularmente preferida en el intervalo de 4 a 15 g l⁻¹.

20 Según una ejecución preferida, la preparación de ω -hidroxiácidos grasos y ácidos dicarboxílicos tiene lugar en un biorreactor (fermentador) en el que se fermenta una cepa de levadura según la invención en condiciones de crecimiento adecuadas en un medio de cultivo adecuado.

25 Además, se dan a conocer procedimientos para la preparación de ω -hidroxiácidos grasos y ácidos dicarboxílicos, que se caracterizan porque un microorganismo según la invención se cultiva en un biorreactor (fermentador) de una manera en sí conocida.

30 Preferiblemente, el aislamiento del producto de reacción ω -hidroxiácidos grasos y ácidos dicarboxílicos tiene lugar por extracción del componente acuoso con un disolvente orgánico elegido del grupo de los ésteres de ácido ftálico, de manera particularmente preferida acetato de etilo, éster diisononílico del ácido 1,2-ciclohexanodicarboxílico y Mesamoll®, y/o de los hidrocarburos alifáticos ramificados y/o lineales, preferiblemente con 5 a 16 átomos de carbono, tales como, p. ej., *n*-pentano, ciclopentano, *n*-hexano, ciclohexano, *n*-heptano, *n*-octano, ciclooctano, *n*-decano, *n*-dodecano o *n*-hexadecano. Preferiblemente, los disolventes orgánicos mencionados sirven en un sistema monofásico acuoso para la extracción después de la conversión del sustrato hidrófobo. Alternativamente, los disolventes orgánicos mencionados sirven en un sistema bifásico en forma de una segunda fase junto al medio de cultivo como depósito para el sustrato hidrófobo y/o para la separación del producto de reacción.

40 El aislamiento de los ácidos dicarboxílicos y/o ω -hidroxiácidos grasos mediante extracción del componente acuoso con un disolvente orgánico tiene lugar preferiblemente después de la separación de las células de levadura en forma de biomasa del medio de cultivo, teniendo lugar la separación de las células de levadura en forma de biomasa del medio de cultivo preferiblemente por centrifugación o filtración.

45 Preferiblemente, la extracción de los productos de reacción ω -hidroxiácidos grasos y ácidos dicarboxílicos tiene lugar con un disolvente orgánico a un valor del pH entre 0 y 8, de manera particularmente preferida entre 1 y 7, de manera muy particularmente preferida entre 1 y 6.

50 Eventualmente, para la purificación de los ácidos dicarboxílicos y/o ω -hidroxiácidos grasos, se lleva a cabo una destilación después de la extracción, separándose preferiblemente el disolvente orgánico. Preferiblemente, la separación del disolvente orgánico tiene lugar por evaporación a una presión entre 0,1 y 1000 mbar, de manera particularmente preferida entre 0,1 y 750 mbar, de manera muy particularmente preferida entre 1 y 400 mbar.

55 Preferiblemente, en una cepa de levadura para el procedimiento dado a conocer para la preparación de ω -hidroxiácidos grasos o bien ácidos dicarboxílicos está reducida adicionalmente la actividad de la ácido fosfatídico-defosfohidrolasa (*PAH1*: YALI0D27016p). Esto conduce ventajosamente a una reducción del tamaño de las células grasas y, por consiguiente, a una formación incrementada de ω -hidroxiácidos grasos o ácidos dicarboxílicos a partir del sustrato hidrófobo correspondiente, en particular *n*-alcanos y ácidos grasos.

60 Según una ejecución preferida del procedimiento dado a conocer para la preparación de ω -hidroxiácidos grasos o bien ácidos dicarboxílicos, en la cepa de levadura empleada está reducida adicionalmente la actividad de la glicerol-3-fosfato-aciltransferasa (*SCT1*: YALI0C00209g), lo cual conduce ventajosamente a una reducción del tamaño de las células grasas y, por consiguiente, a una formación incrementada de ω -hidroxiácidos grasos o ácidos dicarboxílicos a partir del sustrato hidrófobo correspondiente, en particular *n*-alcanos y ácidos grasos (y otros sustratos hidrófobos).

65 Se puede prever también, además, que en el procedimiento dado a conocer para la preparación microbiana de ácidos dicarboxílicos o bien ω -hidroxiácidos grasos, en las células de levadura de la cepa de levadura empleada esté reducida adicionalmente la actividad de la fosfolípido-diacilglicerol-aciltransferasa (*LRO1*: YALI0E16797g), lo cual conduce a

una reducción del tamaño de las células grasas y, por consiguiente, a una formación incrementada de ω -hidroxiácidos grasos o ácidos dicarboxílicos a partir del sustrato hidrófobo correspondiente, en particular *n*-alcanos y ácidos grasos.

Según una ejecución preferida, en la cepa de levadura según la invención para la producción microbiana de ω -hidroxiácidos grasos o bien ácidos dicarboxílicos está reducida adicionalmente la actividad de la diacilglicerol-aciltransferasa (*DGA1*: YALIOE32769g), lo cual conduce a una reducción del tamaño de las células grasas y, por consiguiente, a una formación incrementada de ω -hidroxiácidos grasos o ácidos dicarboxílicos a partir del sustrato hidrófobo correspondiente, en particular *n*-alcanos y ácidos grasos.

Según una ejecución preferida del procedimiento dado a conocer para la preparación de ω -hidroxiácidos grasos o bien ácidos dicarboxílicos, en las células de levadura de la cepa de levadura correspondientemente empleada está reducida adicionalmente la actividad de la glicerol-3-fosfato-aciltransferasa (*GUT2*: YALIOB13970g), lo cual conduce a una reducción del tamaño de las células grasas y, por consiguiente, a una formación incrementada de ω -hidroxiácidos grasos o ácidos dicarboxílicos a partir del sustrato hidrófobo correspondiente, en particular *n*-alcanos y ácidos grasos.

Se ha encontrado ahora, de manera particularmente ventajosa, que el aumento adicional de las actividades de triacilglicerol-lipasas relevantes (*TGL3/TGL4*: YALIOF10010g, YALIOD16379g, YALIOD17534g) en las células de levadura utilizadas para la producción microbiana de ω -hidroxiácidos grasos o bien ácidos dicarboxílicos conduce a una reducción del tamaño de las células grasas y, por consiguiente, a una formación incrementada de ω -hidroxiácidos grasos o ácidos dicarboxílicos a partir del correspondiente sustrato hidrófobo, en particular *n*-alcanos y ácidos grasos.

Preferiblemente, en las células de levadura de la cepa de levadura utilizada para el procedimiento dado a conocer para la preparación de ω -hidroxiácidos grasos o bien ácidos dicarboxílicos está incrementado adicionalmente el transporte de los sustratos hidrófobos en la célula de levadura o bien de las organelas respectivas (peroxisomas, retículo endoplasmático), p. ej., por la actividad incrementada de transportadores de membrana específicos, lo cual conduce a una formación incrementada de ω -hidroxiácidos grasos o ácidos dicarboxílicos a partir del sustrato hidrófobo correspondiente, en particular *n*-alcanos y ácidos grasos.

Opcionalmente, se puede prever que en las células de levadura para la producción microbiana de ω -hidroxiácidos grasos o bien ácidos dicarboxílicos esté incrementado adicionalmente el transporte de ω -hidroxiácidos grasos y ácidos dicarboxílicos desde la célula de levadura o bien desde el retículo endoplasmático al citoplasma, p. ej., por la actividad incrementada de transportadores de membrana específicos, lo cual conduce a una formación incrementada de ω -hidroxiácidos grasos o ácidos dicarboxílicos a partir del sustrato hidrófobo correspondiente, en particular *n*-alcanos y ácidos grasos y a una acumulación en el medio de cultivo.

Particularmente ventajosa se ha manifestado la reducción de la actividad del transportador de citrato y oxalacetato (*YHM2*: YALIOB10736g) y/o la reducción de la actividad de la proteína transportadora de citrato (*CTP1*: YALIOF26323g) en las células de levadura para el procedimiento según la invención para la producción microbiana de ω -hidroxiácidos grasos o bien ácidos dicarboxílicos, ya que con ello se produce y/o se secreta al medio de cultivo una menor cantidad de ácidos orgánicos.

El medio de cultivo es preferiblemente un medio mínimo. En el sentido de la presente invención, se entiende por un medio mínimo un medio de cultivo acuoso que contiene todos los sustratos (p. ej., fuente de carbono, sales minerales, oligoelementos, vitaminas) necesarios para el crecimiento de las células de levadura en forma disuelta, pero que al mismo tiempo no presenta sustancias constitutivas complejas o bien biomoléculas complejas (p. ej., extracto de levadura, peptona, triptona, etc.). El experto conoce del estado de la técnica un gran número de medios mínimos para cultivar células de levadura.

Junto al sustrato hidrófobo ofrecido para la bioconversión, se debe proporcionar durante el cultivo otra fuente de carbono (fuente de C; sustrato para la obtención de energía), a partir del cual la célula puede obtener energía.

Preferiblemente, por lo tanto, se añaden al medio de cultivo como fuente de C monosacáridos o bien disacáridos, p. ej., glucosa, D-fructosa, xilosa, maltosa, sacarosa y/o alcoholes polihídricos, tales como, p. ej., glicerol, glicerol bruto y manitol, de manera particularmente preferida la fuente de carbono añadida es glucosa.

En particular, como fuente de nitrógeno (fuente de N) para el cultivo de cepas de levadura en el procedimiento según la invención se utilizan amonio/amoniaco o aminoácidos, tales como glutamina/glutamato.

En el caso del cultivo de una cepa según la invención, se han de preferir condiciones de cultivo en las que las células grasas son relativamente escasas y la tasa de conversión de los sustratos ofrecidos es relativamente grande.

Una limitación del crecimiento de las células evita que cantidades demasiado grandes del sustrato empleado se almacenen en las células, lo que reduce el rendimiento del producto y aparezca una limitación de oxígeno que reduzca la productividad.

Una posible forma de limitación es la limitación de nitrógeno. En la levadura *Y. lipolytica* esta limitación conduce a una interrupción del crecimiento después de que se haya agotado la fuente de nitrógeno y a la formación de ácido cítrico y ácido iso-cítrico. El contenido de nitrógeno en el medio durante la fase de producción, es decir, después de poner en contacto las células de levadura con el sustrato hidrófobo, debería ser preferiblemente menor que 2 g l⁻¹, preferiblemente menor que 1 g l⁻¹, muy preferiblemente menor que 0,5 g l⁻¹, lo más preferiblemente 0 g l⁻¹. La fase de producción se caracteriza porque se une una fase de fuerte crecimiento (fase de crecimiento) y ya solo presenta un crecimiento bajo (en comparación con la tasa de crecimiento), pero una formación de producto incrementada.

Preferiblemente, el cultivo en el fermentador tiene lugar bajo parámetros del proceso controlados, manteniéndose constante de manera particularmente preferida el valor del pH en el medio de cultivo (durante una determinada fase de crecimiento). La fermentación tiene lugar de manera especialmente preferida bajo condiciones de limitación.

El valor de pH en el medio de cultivo debería corresponder, después del contacto, es decir, durante la fase de crecimiento, al valor fisiológicamente preferido de 5,5 y, durante la fase de producción, es decir, después de poner en contacto las células de levadura con el sustrato hidrófobo, preferiblemente a 5,5-9,0, de manera particularmente preferida a 7,0-9,0 y de manera especialmente preferida a 8,0.

Las células de levadura se cultivan preferiblemente bajo condiciones fisiológicas a una temperatura entre 0 y 60 °C, preferiblemente entre 10 y 50 °C, de manera particularmente preferida entre 20 y 40 °C, estando el valor del pH del medio de cultivo entre 2,0 y 9,0, preferentemente entre 5,5 y 9,0, de manera particularmente preferida entre 7,0 y 9,0, de manera especialmente preferida en torno a 8,0.

Preferiblemente, en el procedimiento dado a conocer las condiciones de limitación mencionadas se combinan entre sí.

Se da a conocer también un kit para la producción biocatalítica de ácidos dicarboxílicos u ω -hidroxiácidos grasos, que contiene:

a) al menos un tipo de células de levadura, preferiblemente un tipo de células de levadura modificadas según la invención de la cepa de levadura de la especie *Y. lipolytica* en un componente acuoso y/o

b) al menos un tipo de células de levadura crioconservadas, preferiblemente de un tipo de células de levadura modificadas según la invención de la cepa de levadura de la especie *Y. lipolytica*.

La biomasa en forma de células de levadura para el procedimiento dado a conocer para la producción biocatalítica de ácidos dicarboxílicos u ω -hidroxiácidos grasos puede obtenerse de una manera conocida por el experto en la técnica de precultivo de las células de levadura a emplear de manera correspondiente (cultivo en medio completo y/o medio mínimo), por ejemplo mediante cultivo en medio completo, tal como el medio YPD (medio DSM N° 393), pero preferiblemente mediante cultivo en un medio que permita la generación de altas densidades celulares, por ejemplo mediante cultivo en medio mínimo (p. ej., glucosa al 5% (p/v), 20 g l⁻¹ de CaCO₃, 1 g l⁻¹ de KH₂PO₄, 0,16 g l⁻¹ de K₂HPO₄ x 3 H₂O, 3 g l⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 0,7 g l⁻¹ de MgSO₄ x 7 H₂O, 0,5 g l⁻¹ de NaCl, 0,4 g l⁻¹ de Ca(NO₃)₂ x 4 H₂O, 0,5 mg l⁻¹ de H₃BO₃, 0,04 mg l⁻¹ de CuSO₄ x 5 H₂O, 0,1 mg l⁻¹ de KI, 0,4 mg l⁻¹ de MnSO₄ x 4 H₂O, 0,2 mg l⁻¹ de Na₂MoO₄ x 2 H₂O, 0,4 mg l⁻¹ de ZnSO₄ x 7 H₂O, 6 mg l⁻¹ de FeCl₃ x 6 H₂O, 0,3 mg l⁻¹ de hidrocloreuro de tiamina) en particular mayor que 1 x 10⁹ células por ml. El cultivo de este precultivo de las células de levadura del kit según la invención tiene lugar preferiblemente en matraces de agitación usuales de laboratorio, pero para generar mayores cantidades de biomasa, también es posible el cultivo bajo condiciones controladas en el fermentador.

Otro aspecto de la invención se refiere también al uso de células de levadura de la cepa de levadura de la especie *Y. lipolytica* modificada según la invención, un procedimiento según la invención o un kit según la invención.

Perfeccionamientos preferidos de la invención resultan de las combinaciones de las reivindicaciones.

La invención se ha de explicar con más detalle a continuación con ayuda de algunos ejemplos de realización y Figuras asociadas. Los siguientes Ejemplos sirven para ilustrar adicionalmente la invención sin limitar la invención a los mismos.

En este caso, muestran

Fig. 1:

las vías metabólicas para la degradación de sustratos hidrófobos por parte de *Y. lipolytica*.

Fig. 2:

la acumulación de ácidos dicarboxílicos y ω -hidroxiácidos grasos en *Y. lipolytica* H222ΔP, H222ΔPΔA y H222ΔPΔF utilizando diversos sustratos hidrófobos.

Fig. 3:

la bioconversión del ácido pentadecanoico en ácido ω -hidroxipentadecanoico por parte de *Y. lipolytica* H222 Δ P Δ F.

Fig. 4:

la formación de células grasas en *Y. lipolytica* H222 Δ P Δ F, H222 Δ P Δ F Δ D, H222 Δ P Δ F Δ H y H222 Δ P Δ F Δ S.

Fig. 5:

la acumulación de ácido dodecanodioico y ω -hidroxiácido dodecanoico en el cultivo de diversas cepas de la levadura *Y. lipolytica* utilizando dodecano como sustrato.

Fig. 6:

la actividad enzimática de la alcohol (graso)-deshidrogenasa y -oxidasa en el cultivo de diversas cepas de la levadura *Y. lipolytica* utilizando dodecano como sustrato.

Fig. 7:

la bioconversión de dodecano en ω -hidroxiácido dodecanoico y ácido dodecanodioico por parte de *Y. lipolytica* H222 Δ P Δ F.

Explicaciones de las modificaciones genéticas:

- Δ P Deleción de los genes de la acil-CoA-oxidasa (*POX1-6*)
- Δ F Deleción del gen de la alcohol (graso)-oxidasa (*FAO1*)
- Δ A Deleción de los genes de la alcohol (graso)-deshidrogenasa (*FADH*, *ADH1-7*)
- Δ D Deleción del gen de diacilglicerol-aciltransferasa (*DGA1*)
- Δ H Deleción del gen de ácido fosfatídico-defosfohidrolasa (*PAH1*)
- Δ S Deleción del gen de glicerol-3-fosfato-aciltransferasa (*SCT1*)
- oC Sobre-expresión del gen de la NADPH-citocromo P450-reductasa *CPR1*
- oF Sobre-expresión del gen de alcohol (graso)-oxidasa *FAO1*

Explicaciones del protocolo de secuencias

SEQ ID NO. 1: Secuencia de ADN del plásmido pJET1.2/blunt (Fermentas).

SEQ ID NO. 2: Secuencia de ADN del plásmido pUCBM21 (Boehringer Ingelheim).

SEQ ID NO. 3: Secuencia de ADN del plásmido artificial pUC-Lys2-DK2.

SEQ ID NO. 5: Secuencia de ADN del plásmido artificial pINTB_HMG1.

La Fig. 1 muestra que los *n*-alcanos son recogidos en la célula y luego se transforman en el ácido graso correspondiente con la misma longitud de cadena en el marco de la oxidación del alcano primaria. A continuación, los ácidos grasos se descomponen en acetil-CoA (o bien propionil-CoA) en el marco de la β -oxidación. La oxidación dimeral de ácidos grasos (ω -oxidación) puede tener lugar en paralelo. Se indican los nombres de las sustancias químicas formadas, así como los nombres de las enzimas involucradas y los genes correspondientes. ALK1: YALIOE25982g, ALK2: YALIOF01320g, ALK3: YALIOA20130g, ALK4: YALIOB13816g, ALK5: YALIOB13838g, ALK6: YALIOB01848g, ALK7: YALIOA15488g, ALK8: YALIOC12122g, ALK9: YALIOB06248g, ALK10: YALIOB20702g, ALK11: YALIOC10054g, ALK12: YALIOA20130g, CPR1: YALIOD04422g, FADH: YALIOF09603g, ADH1: YALIOD25630g, ADH2: YALIOE17787g, ADH3: YALIOA16379g, ADH4: YALIOE15818g, ADH5: YALIOD02167g, ADH6: YALIOA15147g, ADH7: YALIOE07766g, ADH8: YALIOC12595g, FAO1: YALIOB14014g, FALDH1: YALIOA17875g, FALDH2: YALIOE15400g, FALDH3: YALIOB01298g, FALDH4: YALIOF23793g, FAA1: YALIOD17864g, POX1: YALIOE32835g, POX2: YALIOF10857g, POX3: YALIOD24750g, POX4: YALIOE27654g, POX5: YALIOC23859g, POX6: YALIOE06567g, MFE2: YALIOE15378g, POT1: YALIOE18568g.

En la Fig.2 se cultivaron *Y. lipolytica* H222ΔP, H222ΔPΔA y H222ΔPΔF en medio mínimo con glicerol y diversos *n*-alcanos y ácidos grasos (DD: dodecano; DDS: ácido dodecanoico; PD: pentadecano; PDS: ácido pentadecanoico; HD: hexadecano; HDS: ácido hexadecanoico) cultivado en matraz de agitación (glicerol al 3% (v/v) + glicerol al 0,5% (v/v) después de 48 h, *n*-alcano al 1% (v/v) o ácido graso al 1% (v/v), 20 g l⁻¹ de CaCO₃, 17,3 g l⁻¹ de KH₂PO₄, 1,35 g l⁻¹ de K₂HPO₄ x 3 H₂O, 3 g l⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 0,7 g l⁻¹ de MgSO₄ x 7 H₂O, 0,5 g l⁻¹ de NaCl, 0,4 g l⁻¹ de Ca(NO₃)₂ x 4 H₂O, 0,5 mg l⁻¹ de H₃BO₃, 0,04 mg l⁻¹ de CuSO₄ x 5 H₂O, 0,1 mg l⁻¹ de KI, 0,4 mg l⁻¹ de MnSO₄ x 4 H₂O, 0,2 mg l⁻¹ de Na₂MoO₄ x 2 H₂O, 0,4 mg l⁻¹ de ZnSO₄ x 7 H₂O, 6 mg l⁻¹ de FeCl₃ x 6 H₂O, 0,3 mg l⁻¹ de hidrocloreuro de tiamina). Las cantidades de los ácidos dicarboxílicos y ω-hidroxiácidos grasos formados (DDDS: ácido dodecanodioico; ω-HDDS: ω-hidroxiácido dodecanoico; PDDS: ácido pentadecanodioico; ω-HPDS: ω-hidroxiácido pentadecanoico; HDDS: ácido hexadecanodioico; ω-HHDS: ω-hidroxiácido hexadecanoico) se determinó después de 96 h de cultivo mediante cromatografía de gases.

En la Fig. 3 se cultivó *Y. lipolytica* H222ΔPΔF en medio mínimo con glucosa y ácido pentadecanoico (PDS) como fuentes de carbono en matraz de agitación (glucosa al 3% (v/v), PDS al 1% (p/v), 17,3 g l⁻¹ de KH₂PO₄, 1,35 g l⁻¹ de K₂HPO₄ x 3 H₂O, 3 g l⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 0,7 g l⁻¹ de MgSO₄ x 7 H₂O, 0,5 g l⁻¹ de NaCl, 0,4 g l⁻¹ de Ca(NO₃)₂ x 4 H₂O, 0,5 mg l⁻¹ de H₃BO₃, 0,04 mg l⁻¹ de CuSO₄ x 5 H₂O, 0,1 mg l⁻¹ de KI, 0,4 mg l⁻¹ de MnSO₄ x 4 H₂O, 0,2 mg l⁻¹ de Na₂MoO₄ x 2 H₂O, 0,4 mg l⁻¹ de ZnSO₄ x 7 H₂O, 6 mg l⁻¹ de FeCl₃ x 6 H₂O, 0,3 mg l⁻¹ de hidrocloreuro de tiamina). La concentración de glucosa se mantuvo entre 2 y 3% (p/v) mediante realimentación regular (flechas). Después de 5 días, se añadió ácido pentadecanoico al 1% (p/v). Los derivados del ácido pentadecanoico formados, ω-hidroxiácido pentadecanoico (ω-HPDS) y ácido pentadecanodioico (PDDS), se cuantificaron mediante cromatografía de gases. Las células se observaron al microscopio hacia el final del cultivo, y las células grasas se tiñeron con rojo Nilo.

La Fig. 4 muestra el cultivo de *Y. lipolytica* H222ΔPΔF, H222ΔPΔFΔD, H222ΔPΔFΔH y H222ΔPΔFΔS en medio mínimo con glucosa y ácido pentadecanoico (PDS) como fuentes de carbono (glucosa al 3% (v/v), PDS al 1% (p/v), 17,3 g l⁻¹ de KH₂PO₄, 1,35 g l⁻¹ de K₂HPO₄ x 3 H₂O, 3 g l⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 0,7 g l⁻¹ de MgSO₄ x 7 H₂O, 0,5 g l⁻¹ de NaCl, 0,4 g l⁻¹ de Ca(NO₃)₂ x 4 H₂O, 0,5 mg l⁻¹ de H₃BO₃, 0,04 mg l⁻¹ de CuSO₄ x 5 H₂O, 0,1 mg l⁻¹ de KI, 0,4 mg l⁻¹ de MnSO₄ x 4 H₂O, 0,2 mg l⁻¹ de Na₂MoO₄ x 2 H₂O, 0,4 mg l⁻¹ de ZnSO₄ x 7 H₂O, 6 mg l⁻¹ de FeCl₃ x 6 H₂O, 0,3 mg l⁻¹ de hidrocloreuro de tiamina). La concentración de glucosa se mantuvo entre 2 y 3% (p/v) mediante realimentación regular. Después de 3 días, se añadió ácido pentadecanoico al 1% (p/v). Las células se observaron al microscopio después de 5 días, tiñéndose las células grasas con rojo Nilo (arriba: imagen de microscopio óptico; abajo: imagen de microscopio de fluorescencia).

En la Fig. 5 se cultivaron el fermentador *Y. lipolytica* H222ΔP, H222ΔPΔA, H222ΔPΔF, H222ΔPΔAΔF, H222ΔPΔF, H222ΔPΔC, H222ΔPΔD, H222ΔPΔH, H222ΔPΔS, H222ΔPΔAΔFΔC, H222ΔPΔAΔFΔD, H222ΔPΔAΔFΔH y H222ΔPΔAΔFΔS. Como medio de cultivo servía en este caso medio mínimo con (glucosa al 5% (p/v), 1 g l⁻¹ de KH₂PO₄, 0,16 g l⁻¹ de K₂HPO₄ x 3 H₂O, 3 g l⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 0,7 g l⁻¹ de MgSO₄ x 7 H₂O, 0,5 g l⁻¹ de NaCl, 0,4 g l⁻¹ de Ca(NO₃)₂ x 4 H₂O, 0,5 mg l⁻¹ de H₃BO₃, 0,04 mg l⁻¹ de CuSO₄ x 5 H₂O, 0,1 mg l⁻¹ de KI, 0,4 mg l⁻¹ de MnSO₄ x 4 H₂O, 0,2 mg l⁻¹ de Na₂MoO₄ x 2 H₂O, 0,4 mg l⁻¹ de ZnSO₄ x 7 H₂O, 6 mg l⁻¹ de FeCl₃ x 6 H₂O, 0,3 mg l⁻¹ de hidrocloreuro de tiamina). El cultivo tuvo lugar en el fermentador a 28 °C. La saturación de oxígeno se ajustó al 55%. Las células se inocularon con una DO₆₀₀ de 1 y se incubaron durante 24 h a pH 5,5 (titulación automatizado de HCl y NaOH). Luego se añadieron 15 g l⁻¹ de DD y el pH se ajustó a 8,0. Se añadió glucosa cada 24 h para ajustar una concentración final de 5% (p/v). Las cantidades de ácido dodecanodioico (DDDS) y ω-hidroxiácido dodecanoico (ω-HDDS) formados se determinaron mediante cromatografía de gases después del cultivo durante 2, 3 y 4 días.

La Fig. 6 muestra las actividades enzimáticas de las alcohol (graso)-deshidrogenasas y -oxidasa en lisados celulares de las cepas de *Yarrowia lipolytica* H222ΔP, H222ΔPΔA, H222ΔPΔF, H222ΔPΔAΔF und H222ΔPΔF. Las células se cultivaron tal como se describe en el Ejemplo 8 y se recolectaron y se disgregaron después de tres días.

En el caso de la Fig. 7 se cultivó *Y. lipolytica* H222ΔPΔF en medio mínimo con glucosa y dodecano (DD) como fuentes de carbono en el fermentador (glucosa al 5% (p/v), 2 g l⁻¹ de KH₂PO₄, 0,32 g l⁻¹ de K₂HPO₄ x 3 H₂O, 6 g l⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 1,4 g l⁻¹ de MgSO₄ x 7 H₂O, 1 g l⁻¹ de NaCl, 0,8 g l⁻¹ de Ca(NO₃)₂ x 4 H₂O, 1 mg l⁻¹ de H₃BO₃, 0,08 mg l⁻¹ de CuSO₄ x 5 H₂O, 0,2 mg l⁻¹ de KI, 0,8 mg l⁻¹ de MnSO₄ x 4 H₂O, 0,4 mg l⁻¹ de Na₂MoO₄ x 2 H₂O, 0,8 mg l⁻¹ de ZnSO₄ x 7 H₂O, 12 mg l⁻¹ de FeCl₃ x 6 H₂O, 0,6 mg l⁻¹ de hidrocloreuro de tiamina). La concentración de glucosa se ajustó cada 24 h a 5-10% (p/v) mediante realimentación regular (flechas). Después de 2 días, el pH se ajustó a 8,0 y se añadieron 15 g l⁻¹ de dodecano después de 2 días y 3 días. Se añadió glucosa cada 24 h para ajustar una concentración final de 5-10% (p/v).

Ejemplo 1: Prevención de la degradación de ácidos grasos mediante el bloqueo de la β-oxidación

Para la construcción de los casetes de delección para los genes POX, las respectivas regiones de promotor y terminador se amplificaron por PCR, utilizando los cebadores pXXX_fw/pXXX_rv y XXXt_fw/XXXt_rv (XXX representa el gen a eliminar). El ADN genómico de *Y. lipolytica* H222 sirvió en este caso como molde

Mediante el uso de cebadores colgantes, un sitio de restricción I-SceI se insertó en el extremo del promotor, así como al comienzo de la zona del terminador. Fragmentos del promotor y del terminador se fusionaron entre sí mediante PCR de solapamiento con los cebadores pXXX_fw y XXXt_rv. El fragmento de solapamiento se ligó a continuación

en el vector pJET1.2/blunt (Fermentas; SEQ ID NO 1). El plásmido resultante se cortó con I-SceI y el casete loxP-URA3-loxP, que se obtuvo a partir del plásmido pJMP113 (Fickers P, Le Dall MT, Gaillardin C, Thonart P y Nicaud JM (2003) New disruption cassettes for rapid gene disruption and marker rescue in the yeast *Yarrowia lipolytica*. J Microbiol Methods 55: 727-737.) se insertó utilizando la enzima de restricción I-SceI.

El respectivo casete de delección se obtuvo por PCR o restricción y se transformó en *Y. lipolytica* H222-S4, la cual se puede preparar a partir de *Y. lipolytica* H222 (Mauersberger, S., H. J. Wang, et al. (2001), J Bacteriol 183(17): 5102-5109), según Barth y Gaillardin (Barth G y Gaillardin C (1996) *Yarrowia lipolytica* Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Nueva York).

Antes de una transformación renovada, el marcador se recuperó con ayuda del sistema de recombinación Cre-lox (Fickers P, Le Dall MT, Gaillardin C, Thonart P y Nicaud JM (2003) New disruption cassettes for rapid gene disruption and marker rescue in the yeast *Yarrowia lipolytica*. J Microbiol Methods 55: 727-737.). La delección con éxito de un gen se confirmó mediante PCR utilizando los cebadores pXXX_fw y XXXt_rv, así como pXXX_fw y XXXt_rv2. XXXt_rv2 se une en la zona del gen que se ha de eliminar, pero fuera del casete de delección.

La cepa que portaba las delecciones de los genes *POX1*, *POX2*, *POX3*, *POX4*, *POX5* y *POX6* se denominó H222ΔP y forma la base para la construcción de cepas que se pueden utilizar para la producción biotecnológica de ω -hidroxiácidos grasos y ácidos dicarboxílicos.

Tabla 1: para la obtención y para la detección de casetes de delección de POX

Nombre	SEQ ID	Secuencia (5'→3')	RS
pPOX1_fw	SEQ ID NO 7	TCCAGAAGCGCTACAAAGAG	
pPOX1_rv	SEQ ID NO 8	<u>attaccctgttatcccta</u> TGAAGGTTGCAGTCGTCGATGTC	I-SceI
POX1t_fw	SEQ ID NO 9	<u>tagggataacagggtaaat</u> TGCGATCTCGATGAGTGATG	I-SceI
POX1t_rv	SEQ ID NO 10	GCCCAGAAGATTGGAATGAC	
pPOX2_fw	SEQ ID NO 11	atataccg cgg GATTCCGCCAAGTGAGACTG	Cfr42I
pPOX2_rv	SEQ ID NO 12	<u>attaccctgttatcccta</u> CGTCGAGGAAGTAGGTCATC	I-SceI
POX2t_fw	SEQ ID NO 13	<u>tagggataacagggtaaat</u> GCGAGCTTGATGAGGAATAG	I-SceI
POX2t_rv	SEQ ID NO 14	atataccg cgg CCTGACGCCAATTTGAAGAG	Cfr42I
pPOX3_fw	SEQ ID NO 15	atataccg cgg CTGGGCTGTTCGGTCGATAG	Cfr42I
pPOX3_rv	SEQ ID NO 16	<u>tagggataacagggtaaat</u> AGGACGCACAACGCCATCAC	I-SceI
POX3t_fw	SEQ ID NO 17	<u>attaccctgttatcccta</u> CGCTCCCATTGGAAACTA	I-SceI
POX3t_rv	SEQ ID NO 18	atataccg cgg TCTCTTCGCTGTGGTCTAGG	Cfr42I
pPOX4_fw	SEQ ID NO 19	atataccg cgg TCCACCGTTCTCCTTCATAC	Cfr42I
pPOX4_rv	SEQ ID NO 20	<u>tagggataacagggtaaat</u> ATGTCTCTAGGGTCGAAGTC	I-SceI
POX4t_fw	SEQ ID NO 21	<u>attaccctgttatcccta</u> TGGCAAGCCTCACTACTACG	I-SceI
POX4t_rv	SEQ ID NO 22	atataccg cgg TGCGGCGGAACCTACTGTATC	Cfr42I
pPOX5_fw	SEQ ID NO 23	atataccg cgg GGGATTCTCCGGGTTATTTG	Cfr42I
pPOX5_rv	SEQ ID NO 24	<u>tagggataacagggtaaat</u> ACGTCTCGGACCTTGAATTG	I-SceI
POX5t_fw	SEQ ID NO 25	<u>attaccctgttatcccta</u> CCTTCAACCTGTCCGACTTC	I-SceI
POX5t_rv	SEQ ID NO 26	atataccg cgg GAAGCGGTCTCGTTGTATG	Cfr42I
pPOX6_fw	SEQ ID NO 27	GTGTAGCAACTCGGATACAG	
pPOX6_rv	SEQ ID NO 28	<u>tagggataacagggtaaat</u> GGTCCATAAGCAGAGTGTTT	I-SceI
POX6t_fw	SEQ ID NO 29	<u>attaccctgttatcccta</u> ACCCTCGACCTCCTTATTAC	I-SceI
POX6t_rv	SEQ ID NO 30	CTCTTCTTGACTGGCATAGC	

Ejemplo 2: Prevención de la oxidación de los ω -hidroxiácidos grasos para dar el aldehído de ácido graso o bien para dar el ácido dicarboxílico en el marco de la ω -oxidación

Para la construcción de los casetes de delección para los genes alcohol (graso)-deshidrogenasa y -oxidasa se amplificó la región del promotor y del terminador respectiva mediante PCR utilizando los cebadores pXXX_fw/pXXX_rv y

XXXt_fw/XXXt_rv (XXX representa el gen a eliminar). El ADN genómico de *Y. lipolytica* H222 sirvió en este caso como molde

Para la construcción de los casetes de delección para los genes *ADH1-ADH6* y *FAO1*, se insertó un sitio de restricción *Bam*HI utilizando cebadores colgantes en el extremo del promotor, así como al comienzo de la región del terminador. Adicionalmente, se insertó un sitio de restricción *Hind*III al comienzo de la región del promotor y en el extremo de la región del terminador se insertó un sitio de restricción *Nde*I (*ADH1*: *Not*I, *FAO1*: *Eco*RI). Los fragmentos se ligaron en el vector pJET1.2/blunt (Fermentas; SEQ ID NO 1) o pUCBM21 (Boehringer Ingelheim; SEQ ID NO 2). Los plásmidos así obtenidos se linearizaron con *Bam*HI y se insertó el URA-blaster (casete TcR-URA3-TcR) que se obtuvo del plásmido pUC-Lys2-DK2 (SEQ ID NO 3) mediante restricción con *Bam*HI y *Bg*II.

Para la construcción del vector de delección *ADH7*, el gen completo (incluyendo la región del promotor y del terminador) se amplificó por medio de PCR, utilizando los cebadores pADH7_fw y ADH7t_rv. El fragmento obtenido se ligó en el vector pJET1.2/blunt (Fermentas; SEQ ID NO 1), el marco de lectura abierto del gen *ADH7* se retiró mediante restricción con *San*DI y *Nsi*I, y se insertó el URA-blaster, que se obtuvo del plásmido pUC-Lys2-DK2 mediante restricción con *San*DI y *Nsi*I.

El respectivo casete de delección se obtuvo por PCR o restricción y se transformó en *Y. lipolytica* H222-S4, la cual se puede preparar a partir de *Y. lipolytica* H222 (Mauersberger, S., H. J. Wang, et al. (2001), J Bacteriol 183(17): 5102-5109), según Barth y Gaillardin (Barth G y Gaillardin C (1996) *Yarrowia lipolytica* Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Nueva York).

Antes de una transformación renovada, el marcador se recuperó mediante selección con FOA (Boeke JD, LaCroute F y Fink GR (1984) Mol Gen Genet 197: 345-346). La delección con éxito de un gen se confirmó mediante PCR utilizando los cebadores pXXX_fw y XXXt_rv, así como pXXX_fw y XXXt_rv2. XXXt_rv2 se une en la zona del gen que se ha de eliminar, pero fuera del casete de delección.

La cepa que portaba las delecciones tanto de los genes *POX1*, *POX2*, *POX3*, *POX4*, *POX5* y *POX6* como *FADH*, *AHD1*, *AHD2*, *AHD3*, *AHD4*, *AHD5*, *AHD6* y *AHD7* se denominó H222ΔPΔA.

La cepa que portaba las delecciones tanto de los genes *POX1*, *POX2*, *POX3*, *POX4*, *POX5* y *POX6* como *FAO1* se denominó H222ΔPΔF.

Tabla 2: para la obtención y para la detección de los casetes de delección (*FADH* y *FAO*)

Nombre	SEQ ID	Secuencia (5'→3')	RS
<i>pFADH_fw</i>	SEQ ID NO	atataaagctTGC GGCTCGGCACGTGATCTG	<i>HindIII</i>
<i>pFADH_rv</i>	SEQ ID NO	atataggatccATCGTGCGTACGTCGCTAGTG	<i>BamHI</i>
<i>FADH1_fw</i>	SEQ ID NO	atataggatccCGACCGGCACGATCAATTGG	<i>BamHI</i>
<i>FADH1_rv</i>	SEQ ID NO	atatacatatcGGTGATCTCAGCCCGACCTC	<i>NdeI</i>
<i>FADH1_rv2</i>	SEQ ID NO	TCCCGAAACACAGAACTTCC	
<i>pADH1_fw</i>	SEQ ID NO	atataaagctTGGTGGACGTTCCGGCAGACAG	<i>HindIII</i>
<i>pADH1_rv</i>	SEQ ID NO	atataggatccCTCCAGGCATCTCCACACTC	<i>BamHI</i>
<i>ADH11_fw</i>	SEQ ID NO	atataggatccCATTACAGGCTTAGCAAGG	<i>BamHI</i>
<i>ADH11_rv</i>	SEQ ID NO	atataggatccGGAAATCACGCTTGATTCTG	<i>NotI</i>
<i>ADH11_rv2</i>	SEQ ID NO	TAGGCGCTGGTACAGAAGAG	
<i>pADH2_fw</i>	SEQ ID NO	atataaagctTGAGTACAGTAGGTGGTACTC	<i>HindIII</i>
<i>pADH2_rv</i>	SEQ ID NO	atataggatccAGTGGTGGTGGTGGTAG	<i>BamHI</i>
<i>ADH21_fw</i>	SEQ ID NO	atataggatccTTTACGTGCAACAGGAGGAG	<i>BamHI</i>
<i>ADH21_rv</i>	SEQ ID NO	atatacatatcGCCTGTCTTGAGTTCTTTGG	<i>NdeI</i>
<i>ADH21_rv2</i>	SEQ ID NO	AGGGTCGTAGATAACGAGTC	
<i>pADH3_fw</i>	SEQ ID NO	atataaagctTCACGTGGCTGCTGGGCCAACC	<i>HindIII</i>
<i>pADH3_rv</i>	SEQ ID NO	atataggatccCGCACGGTATCGGAGCATCG	<i>BamHI</i>
<i>ADH31_fw</i>	SEQ ID NO	atataggatccCGCGGCTATTGACGCTGAGG	<i>BamHI</i>
<i>ADH31_rv</i>	SEQ ID NO	atatacatatcCCCGTCAGCTCCATCGACGAGTG	<i>NdeI</i>
<i>ADH31_rv2</i>	SEQ ID NO	AGGTGTACTGTAGCCACCCTGAC	
<i>pADH4_fw</i>	SEQ ID NO	atataaagctTCCGGCCAGCCGCTGGCAACG	<i>HindIII</i>
<i>pADH4_rv</i>	SEQ ID NO	atataggatccACACGACAGTGCACCTGAC	<i>BamHI</i>
<i>ADH41_fw</i>	SEQ ID NO	atataggatccCAGCCATGAGCCAGGCATTG	<i>BamHI</i>
<i>ADH41_rv</i>	SEQ ID NO	atatacatatcGGCGCCAGCCACATTTGCCCTC	<i>NdeI</i>
<i>ADH41_rv2</i>	SEQ ID NO	AGCGATACAGCAGTTGACTC	
<i>pADH5_fw</i>	SEQ ID NO	TCAGCCGTCTACTTGTAGAG	
<i>pADH5_rv</i>	SEQ ID NO	atataggatccGTGGCTCGGATCTCCTGAC	<i>BamHI</i>
<i>ADH51_fw</i>	SEQ ID NO	atataggatccAGCCGGAGGTCAGATCAAGC	<i>BamHI</i>
<i>ADH51_rv</i>	SEQ ID NO	atatacatatcGCGCAATAGTTGCGCGGCCTG	<i>NdeI</i>
<i>ADH51_rv2</i>	SEQ ID NO	CTCGTGTGTGCTTTCTTTG	
<i>pADH6_fw</i>	SEQ ID NO	atataaagctTGCGCGACAACCATAGCGATGGC	<i>HindIII</i>
<i>pADH6_rv</i>	SEQ ID NO	atataggatccGATAAGAGGGCGCTCTGACC	<i>BamHI</i>
<i>ADH61_fw</i>	SEQ ID NO	atataggatccGGCGTGACATCGAGTTTGG	<i>BamHI</i>
<i>ADH61_rv</i>	SEQ ID NO	atatacatatcCTACGTCTCGCCGACAGAGG	<i>NdeI</i>
<i>ADH61_rv2</i>	SEQ ID NO	AGCGAGAGGTTATACGGAAG	
<i>pADH7_fw</i>	SEQ ID NO	CTCCTACAGCCTCTCAAGAC	
<i>ADH71_rv</i>	SEQ ID NO	GTCTACAAGACAGCCAGAG	
<i>pADH7_fw2</i>	SEQ ID NO	CCGCTTGAGAAGAGCAATAC	

<i>pFAO1_fw</i>	SEQ ID NO	atataaagctTCGCCACCTGTCCACGTCTCG	<i>HindIII</i>
<i>pFAO1_rv</i>	SEQ ID NO	atataggatccGCGAAGCGACGTGTGGTGAG	<i>BamHI</i>
<i>FAO11_fw</i>	SEQ ID NO	atataggatccGCTGAGCACGCGAGTACACC	<i>BamHI</i>
<i>FAO11_rv</i>	SEQ ID NO	atatagaattcGATCTGTCTGACAACTAAGG	<i>EcoRI</i>
<i>FAO11_rv2</i>	SEQ ID NO	CAGAAGTTACGACGCCAAGG	

5 Ejemplo 3: Cultivo comparativo de diferentes cepas de producción en el matraz de agitación

Para comprobar si las cepas de partida *Yarrowia lipolytica* H222ΔP, H222ΔPΔA y H222ΔPΔF generadas están capacitadas para producir grandes cantidades de ω-hidroxiácidos grasos y ácidos dicarboxílicos, éstas se cultivaron en medio mínimo con glicerol y diversos *n*-alcanos (dodecano, pentadecano, hexadecano) y ácidos grasos (ácido dodecanoico, ácido pentadecanoico, ácido hexadecanoico) (glicerol al 3% (v/v) + glicerol al 0,5% (v/v) después de 48 h, *n*-alcano al 1% (v/v) o ácido graso al 1% (v/v), 20 g l⁻¹ de CaCO₃, 17,3 g l⁻¹ de KH₂PO₄, 1,35 g l⁻¹ de K₂HPO₄ x 3 H₂O, 3 g l⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 0,7 g l⁻¹ de MgSO₄ x 7 H₂O, 0,5 g l⁻¹ de NaCl, 0,4 g l⁻¹ de Ca(NO₃)₂ x 4 H₂O, 0,5 mg l⁻¹ de H₃BO₃, 0,04 mg l⁻¹ de CuSO₄ x 5 H₂O, 0,1 mg l⁻¹ de KI, 0,4 mg l⁻¹ de MnSO₄ x 4 H₂O, 0,2 mg l⁻¹ de Na₂MoO₄ x 2 H₂O, 0,4 mg l⁻¹ de ZnSO₄ x 7 H₂O, 6 mg l⁻¹ de FeCl₃ x 6 H₂O, 0,3 mg l⁻¹ de hidrócloruro de tiamina). Las cantidades de ω-hidroxiácidos grasos formados (ω-hidroxiácido dodecanoico, ω-hidroxiácido pentadecanoico, ω-hidroxiácido hexadecanoico) y ácidos dicarboxílicos (ácido dodecanodioico, ácido pentadecanodioico, ácido hexadecanodioico) se determinaron mediante cromatografía de gases después de 96 h de cultivo (Fig. 2).

Y. lipolytica H222ΔP formó en este caso cantidades relativamente grandes de ácidos dicarboxílicos y, por consiguiente, puede utilizarse como una cepa de partida para la construcción de una cepa de producción correspondiente para ácidos dicarboxílicos.

Tanto *Y. lipolytica* H222ΔPΔA como H222ΔPΔF formaron cantidades incrementadas de ω-hidroxiácidos grasos y, por consiguiente, pueden utilizarse como cepas de partida para la construcción de correspondientes cepas de producción de ω-hidroxiácidos grasos. En este caso, se ha de preferir *Y. lipolytica* H222ΔPΔF frente a H222ΔPΔA.

- 5 Tanto los *n*-alcanos como los ácidos grasos pueden hacerse reaccionar por todas las cepas para dar ω-hidroxiácidos grasos o bien ácidos dicarboxílicos con la misma longitud de cadena.

Ejemplo 4: Uso de diferentes condiciones y medios de cultivo

- 10 Se cultivaron diferentes cepas (p. ej., *Yarrowia lipolytica* H222ΔP y H222ΔPΔF) en diferentes medios bajo diferentes condiciones, comprobándose que los medios y las condiciones utilizados son muy adecuados de manera diferente.

Las levaduras se cultivaron de manera comparativa en medio mínimo con glucosa (glucosa al 3% (p/v), ácido pentadecanoico al 1% (p/v), 17,3 g l⁻¹ de KH₂PO₄, 1,35 g l⁻¹ de K₂HPO₄ x 3 H₂O, 3 g l⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 0,7 g l⁻¹ de MgSO₄ x 7 H₂O, 0,5 g l⁻¹ de NaCl, 0,4 g l⁻¹ de Ca(NO₃)₂ x 4 H₂O, 0,5 mg l⁻¹ de H₃BO₃, 0,04 mg l⁻¹ de CuSO₄ x 5 H₂O, 0,1 mg l⁻¹ de KI, 0,4 mg l⁻¹ de MnSO₄ x 4 H₂O, 0,2 mg l⁻¹ de Na₂MoO₄ x 2 H₂O, 0,4 mg l⁻¹ de ZnSO₄ x 7 H₂O, 6 mg l⁻¹ de FeCl₃ x 6 H₂O, 0,3 mg l⁻¹ de hidrocloreto de tiamina) y glicerol (glicerol al 3% (v/v), ácido pentadecanoico al 1% (p/v), 17,3 g l⁻¹ de KH₂PO₄, 1,35 g l⁻¹ de K₂HPO₄ x 3 H₂O, 3 g l⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 0,7 g l⁻¹ de MgSO₄ x 7 H₂O, 0,5 g l⁻¹ de NaCl, 0,4 g l⁻¹ de Ca(NO₃)₂ x 4 H₂O, 0,5 mg l⁻¹ de H₃BO₃, 0,04 mg l⁻¹ de CuSO₄ x 5 H₂O, 0,1 mg l⁻¹ de KI, 0,4 mg l⁻¹ de MnSO₄ x 4 H₂O, 0,2 mg l⁻¹ de Na₂MoO₄ x 2 H₂O, 0,4 mg l⁻¹ de ZnSO₄ x 7 H₂O, 6 mg l⁻¹ de FeCl₃ x 6 H₂O, 0,3 mg l⁻¹ de hidrocloreto de tiamina) como fuente de carbono, realimentándose después de 48 h glucosa al 1% (p/v) o bien glicerol al 1% (v/v). Después de 96 h, todas las cepas investigadas (p. ej., *Y. lipolytica* H222ΔP, H222ΔPΔA y H222ΔPΔF), en el caso de crecimiento en medio mínimo con glucosa, forman cantidades de ω-hidroxiácido pentadecanoico o bien ácido pentadecanodioico mayores que cuando crecen en medio mínimo con glicerol.

25 Las levaduras se cultivaron adicionalmente en medio completo con glucosa y ácido pentadecanoico (extracto de levadura al 1% (p/v), peptona al 2% (p/v), glucosa al 2% (p/v) y ácido pentadecanoico al 1% (p/v) en Tween 80 al 1%), realimentándose glucosa al 1% (p/v) cuando éste se había consumido. Después de 4 días, se realimentó ácido pentadecanoico al 1% (p/v) en Tween 80 al 1%. Bajo estas condiciones casi no se formó ácido ω-hidroxipentadecanoico o bien ácido pentadecanodioico (en cada caso < 0,1 g l⁻¹).

35 Las levaduras se cultivaron en medio mínimo con glucosa y ácido pentadecanoico (glucosa al 3% (v/v), ácido pentadecanoico al 1% (p/v) en Tween 80 al 1%, 17,3 g l⁻¹ de KH₂PO₄, 1,35 g l⁻¹ de K₂HPO₄ x 3 H₂O, 3 g l⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 0,7 g l⁻¹ de MgSO₄ x 7 H₂O, 0,5 g l⁻¹ de NaCl, 0,4 g l⁻¹ de Ca(NO₃)₂ x 4 H₂O, 0,5 mg l⁻¹ de H₃BO₃, 0,04 mg l⁻¹ de CuSO₄ x 5 H₂O, 0,1 mg l⁻¹ de KI, 0,4 mg l⁻¹ de MnSO₄ x 4 H₂O, 0,2 mg l⁻¹ de Na₂MoO₄ x 2 H₂O, 0,4 mg l⁻¹ de ZnSO₄ x 7 H₂O, 6 mg l⁻¹ de FeCl₃ x 6 H₂O, 0,3 mg l⁻¹ de hidrocloreto de tiamina), realimentándose glucosa al 1% (p/v) cuando éste se había consumido. Después de 4 días, se realimentó ácido pentadecanoico al 1% (p/v) en Tween 80 al 1%. Bajo estas condiciones de cultivo, la cepa *Y. lipolytica* H222ΔPΔF formó alrededor de 0,7 g l⁻¹ de ω-hidroxiácido pentadecanoico y 2,4 g l⁻¹ de ácido pentadecanodioico después de 10 días.

40 Las levaduras se cultivaron en medio mínimo con glucosa y ácido pentadecanoico (glucosa al 3% (v/v), ácido pentadecanoico al 1% (p/v) en Tween 80 al 1%, 17,3 g l⁻¹ de KH₂PO₄, 1,35 g l⁻¹ de K₂HPO₄ x 3 H₂O, 3 g l⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 0,7 g l⁻¹ de MgSO₄ x 7 H₂O, 0,5 g l⁻¹ de NaCl, 0,4 g l⁻¹ de Ca(NO₃)₂ x 4 H₂O, 0,5 mg l⁻¹ de H₃BO₃, 0,04 mg l⁻¹ de CuSO₄ x 5 H₂O, 0,1 mg l⁻¹ de KI, 0,4 mg l⁻¹ de MnSO₄ x 4 H₂O, 0,2 mg l⁻¹ de Na₂MoO₄ x 2 H₂O, 0,4 mg l⁻¹ de ZnSO₄ x 7 H₂O, 6 mg l⁻¹ de FeCl₃ x 6 H₂O, 0,3 mg l⁻¹ de hidrocloreto de tiamina), realimentándose glucosa, de manera que su concentración en el medio se encontraba entre 1 y 3% (p/v). Después de 5 días, se realimentó ácido pentadecanoico al 1% (p/v) en Tween 80 al 1%. Bajo estas condiciones de cultivo, la cepa *Y. lipolytica* H222ΔPΔF formó alrededor de 3,9 g l⁻¹ de ω-hidroxiácido pentadecanoico y 1,3 g l⁻¹ de ácido pentadecanodioico después de 7 días.

50 En resumen, se puede comprobar que el medio mínimo es más adecuado para el cultivo que el medio completo. Además, la glucosa es más adecuada que el glicerol como fuente de carbono para el suministro de energía. Durante el transcurso del cultivo, la glucosa debería reponerse de tal manera que la glucosa no se consuma (es decir, su concentración no descienda a 0 g l⁻¹).

55 Ejemplo 5: Reducción de la formación de células grasas

Para la construcción de los casetes de delección para los genes *DGA1*, *PAH1* y *SCT1* se amplificó la región del promotor y del terminador respectiva mediante PCR utilizando los cebadores pXXX_fw/pXXX_rv y XXXt_fw/XXXt_rv (XXX representa el gen a eliminar). El ADN genómico de *Y. lipolytica* H222 sirvió en este caso como molde

60 Para la construcción de los casetes de delección para los genes *DGA1*, *PAH1* y *SCT1*, se insertó un sitio de restricción *Bam*HI utilizando cebadores colgantes en el extremo del promotor, así como al comienzo de la región del terminador. Adicionalmente, se insertó un sitio de restricción *Hind*III al comienzo de la región del promotor y en el extremo de la región del terminador se insertó un sitio de restricción *Eco*RI. Los fragmentos se ligaron en el vector pUCBM21 (Boehringer Ingelheim; SEQ ID NO 2) Los plásmidos así obtenidos se linearizaron con *Bam*HI y se insertó el URA-

blaster (casete TcR-URA3-TcR) que se obtuvo del plásmido pUC-Lys2-DK2 (SEQ ID NO 3) mediante restricción con *Bam*HI y *Bg*II.

El respectivo casete de delección se obtuvo por PCR o restricción y se transformó en *Y. lipolytica* H222-S4, la cual se puede preparar a partir de *Y. lipolytica* H222 (Mauersberger, S., H. J. Wang, et al. (2001), J Bacteriol 183(17): 5102-5109), según Barth y Gaillardin (Barth G y Gaillardin C (1996) *Yarrowia lipolytica* Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Nueva York).

Antes de una transformación renovada, el marcador se recuperó mediante selección con FOA (Boeke JD, LaCroute F y Fink GR (1984) Mol Gen Genet 197: 345-346).

La delección con éxito de un gen se confirmó mediante PCR utilizando los cebadores pXXX_fw y XXXt_rv, así como pXXX_fw y XXXt_rv2. XXXt_rv2 se une en la zona del gen que se ha de eliminar, pero fuera del casete de delección.

La cepa que portaba las delecciones tanto de los genes *POX1*, *POX2*, *POX3*, *POX4*, *POX5* y *POX6* como *DGA1* se denominó H222ΔPΔD.

La cepa que portaba las delecciones tanto de los genes *POX1*, *POX2*, *POX3*, *POX4*, *POX5* y *POX6* como *PAH1* se denominó H222ΔPΔH.

La cepa que portaba las delecciones tanto de los genes *POX1*, *POX2*, *POX3*, *POX4*, *POX5* y *POX6* como *SCT1* se denominó H222ΔPΔS.

La cepa que portaba las delecciones tanto de los genes *POX1*, *POX2*, *POX3*, *POX4*, *POX5* y *POX6* como *FAO1* y *DGA1* se denominó H222ΔPΔFΔD.

La cepa que portaba las delecciones tanto de los genes *POX1*, *POX2*, *POX3*, *POX4*, *POX5* y *POX6* como *FAO1* y *PAH1* se denominó H222ΔPΔFΔH.

La cepa que portaba las delecciones tanto de los genes *POX1*, *POX2*, *POX3*, *POX4*, *POX5* y *POX6* como *FAO1* y *SCT1* se denominó H222ΔPΔFΔS.

La cepa que portaba las delecciones tanto de los genes *POX1*, *POX2*, *POX3*, *POX4*, *POX5* y *POX6* como *FADH*, *ADH1*, *ADH2*, *ADH3*, *ADH4*, *ADH5*, *ADH6*, *ADH7*, *FAO1* y *DGA1* se denominó H222ΔPΔAΔFΔD.

La cepa que portaba las delecciones tanto de los genes *POX1*, *POX2*, *POX3*, *POX4*, *POX5* y *POX6* como *FADH*, *ADH1*, *ADH2*, *ADH3*, *ADH4*, *ADH5*, *ADH6*, *ADH7*, *FAO1* y *PAH1* se denominó H222ΔPΔAΔFΔH.

La cepa que portaba las delecciones tanto de los genes *POX1*, *POX2*, *POX3*, *POX4*, *POX5* y *POX6* como *FADH*, *ADH1*, *ADH2*, *ADH3*, *ADH4*, *ADH5*, *ADH6*, *ADH7*, *FAO1* y *SCT1* se denominó H222ΔPΔAΔFΔS.

Tabla 3: para la obtención y para la detección de los casetes de delección *DGA1*, *PAH1* y *SCT1*

Nombre	SEQ ID	Secuencia (5'→3')	RS
<i>pDGA1_fw</i>	SEQ ID NO 74	atataaagcttCCGTAATAAATGCCCCGTCTC	<i>Hind</i> III
<i>pDGA1_rv</i>	SEQ ID NO 75	atataggatccAGGTCGATTTGGCGCTGTG	<i>Bam</i> HI
<i>DGA1t_fw</i>	SEQ ID NO 76	atataggatccGGTTAGGCAAATAGCTAATG	<i>Bam</i> HI
<i>DGA1t_rv</i>	SEQ ID NO 77	atatagaattcGCCTGGAGCGAGTTTCTGAG	<i>Eco</i> RI
<i>DGA1t_rv2</i>	SEQ ID NO 78	TCGCAAGGGCCATAGAGGTG	
<i>pPAH1_fw</i>	SEQ ID NO 79	atataaagcttCCTTGCACATCTCCGATGAC	<i>Hind</i> III
<i>pPAH1_rv</i>	SEQ ID NO 80	atataggatccGGTGTTACGCCACCACGTTG	<i>Bam</i> HI
<i>PAH1t_fw</i>	SEQ ID NO 81	atataggatccGGGACCTGCGATACGAATGC	<i>Bam</i> HI
<i>PAH1t_rv</i>	SEQ ID NO 82	atatagaattcGCTTGCAGCAGCCGGTGTATC	<i>Eco</i> RI
<i>PAH1t_rv2</i>	SEQ ID NO 83	GGCGTTGTGGAGCTATCACC	
<i>pSCT1_fw</i>	SEQ ID NO 84	atataaagcttGCGTGCGGTGCGTGCGTATG	<i>Hind</i> III
<i>pSCT1_rv</i>	SEQ ID NO 85	atataggatccCAGCACACGAAATTATACG	<i>Bam</i> HI
<i>SCT1t_fw</i>	SEQ ID NO 86	atataggatccGTGCGCTTACATGTGGACCG	<i>Bam</i> HI
<i>SCT1t_rv</i>	SEQ ID NO 87	atatagaattcCAGGCAGCTTCTTGCCAATG	<i>Eco</i> RI
<i>SCT1t_rv2</i>	SEQ ID NO 88	GAGATAGGAGGTTCCCATAC	

Las cepas *Y. lipolytica* H222ΔPΔFΔD, H222ΔPΔFΔH y H222ΔPΔFΔS, así como su cepa de partida *Y. lipolytica* H222ΔPΔF se cultivaron en medio mínimo con glucosa y ácido pentadecanoico (glucosa al 3% (v/v), ácido pentadecanoico al 1% (p/v), 17,3 g l⁻¹ de KH₂PO₄, 1,35 g l⁻¹ de K₂HPO₄ x 3 H₂O, 3 g l⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 0,7 g l⁻¹ de MgSO₄ x 7 H₂O, 0,5 g l⁻¹ de NaCl, 0,4 g l⁻¹ de Ca(NO₃)₂ x 4 H₂O, 0,5 mg l⁻¹ de H₃BO₃, 0,04 mg l⁻¹ de CuSO₄ x 5 H₂O, 0,1 mg l⁻¹ de KI, 0,4 mg l⁻¹ de MnSO₄ x 4 H₂O, 0,2 mg l⁻¹ de Na₂MoO₄ x 2 H₂O, 0,4 mg l⁻¹ de ZnSO₄ x 7 H₂O, 6 mg l⁻¹ de FeCl₃ x 6 H₂O, 0,3 mg l⁻¹ de hidrócloruro de tiamina). Cada 24 h se ajustó la concentración de glucosa a 3% (p/v) y después de 3 días se realimentó ácido pentadecanoico al 1% (p/v). Las cantidades de ω-hidroxiácido pentadecanoico y ácido pentadecanodioico se determinaron por cromatografía de gases después de 8 días de cultivo. Las células se examinaron al microscopio, tiñéndose las células de grasa con rojo Nilo y, por consiguiente, son detectables con un microscopio de fluorescencia (Fig. 4).

En este caso, se puede reconocer que el tamaño de las células grasas se redujo claramente por las delecciones de *PAH1* y *SCT1* bajo las condiciones de cultivo mencionadas. Como ya se demostró, esto no se pudo comprobar para la delección de *DGA1* ya descrita (Thevenieau F (2006) Institut National Agronomique Paris-Grignon, tesis de doctorado; Athenstaedt K (2011) Biochim Biophys Acta 1811: 587-596).

La disponibilidad de cepas con células grasas reducidas constituye la base para el desarrollo de cepas para la producción eficiente de ω-hidroxiácidos grasos y ácidos dicarboxílicos, ya que la esterificación de los sustratos ofrecidos con glicerol y su almacenamiento en las células grasas reduce la tasa de conversión.

Ejemplo 6: Expresión incrementada de *FAO1* en *Yarrowia lipolytica* H222ΔP

Para la construcción de un vector para la sobre-expresión de *FAO1*, se obtuvo una parte del promotor constitutivo del gen alfa del factor de elongación de la traducción 1 (*TEF1*: *YALI0C09141g*) mediante PCR, utilizando los cebadores pTef_SpeI_fw3 y pTef_FAOo_ol_rv. Como molde servía en este caso el plásmido pINTB_HMG1 (SEQ ID NO 5).

Además, el gen *FAO1* (*YALI0B14014g*) se amplificó mediante PCR utilizando los cebadores pTef_FAOo_ol_fw y FAO1o_SphI_rv (molde: ADN genómico de *Y. lipolytica* H222).

Se insertó una región colgante mediante los cebadores pTef_FAOo_ol_rv y pTef_FAOo_ol_fw, con cuya ayuda se unieron ambos fragmentos de PCR mediante PCR de solapamiento utilizando los cebadores pTef_SpeI_fw3 y FAO1o_SphI_rv. El fragmento de solapamiento se ligó a continuación en el vector pJET1.2/blunt (Fermentas; SEQ ID NO 1), se separó por corte de éste utilizando las enzimas de restricción *SpeI* y *SphI* y finalmente se ligó en la cadena principal del plásmido pINTB_HMG1 cortado con *SpeI* und *SphI* (SEQ ID NO 5), resultando el plásmido pINTB-FAO1.

Además, se obtuvo una plataforma de integración mediante PCR utilizando los cebadores INT_AscI_fw_KpnI e INT_AscI_rv_KpnI, se cortó con KpnI y se ligó en la cadena principal obtenida por digestión de restricción con KpnI del vector pINTB-FAO1, resultando el plásmido pINTC-FAO1.

El plásmido pINTC-FAO1 finalmente se linearizó con *AscI* y se transformó en la cepa receptora de *Y. lipolytica* deseada.

La integración exitosa del gen *FAO1* fue confirmada por PCR, utilizando los cebadores INT_AscI_fw_out e INT_AscI_rv_out que se unen al ADN genómico fuera de la construcción integrada.

La cepa que portaba las delecciones tanto de los genes *POX1*, *POX2*, *POX3*, *POX4*, *POX5* y *POX6* como la copia adicional de *FAO1* bajo el control del promotor *TEF1*, se denominó H222ΔPoF y sirvió como cepa de partida para la construcción de cepas adicionales para la producción de ácidos dicarboxílicos.

Tabla 4: Cebadores para la sobre-expresión de *FAO1*

Nombre	SEQ ID	Secuencia (5'→3')	RS
pTef_SpeI_fw3	SEQ ID NO 89	CTACGCTTGTTCAGACTTTG	
pTef_FAOo_ol_rv	SEQ ID NO 90	gtgtgcttgcgtcagacatTTTGAA TGATTCTTATACTCAGAAGG	
pTef_FAOo_ol_fw	SEQ ID NO 91	ccttctgagtataagaatcattcaaa ATGTCTGACGACAAGCACAC	

Nombre	SEQ ID	Secuencia (5'→3')	RS
FAO1o_SphI_rv	SEQ ID NO 92	<u>gcatgc</u> TTAGATTCGAGGTCGGAGAT	<i>SphI</i>
INT_AscI_fw_KpnI	SEQ ID NO 93	<u>ggtagc</u> CACGCACGGATAGTTTATCCA	<i>KpnI</i>
INT_AscI_rv_KpnI	SEQ ID NO 94	<u>ggtagc</u> CCAAAGTCAACTAATGTCAAG TAAAG	<i>KpnI</i>
INT_AscI_fw_out	SEQ ID NO 95	CCTCCAACGTGACTTTC	
INT_AscI_rv_out	SEQ ID NO 96	AGAGACCTCCCACAAAG	

Ejemplo 7: Expresión incrementada de *CPR1* en *Yarrowia lipolytica* H222ΔP y H222ΔPΔAΔF

- 5 Para la construcción de un vector para la sobre-expresión de *FAO1*, se obtuvo una parte del promotor constitutivo del gen alfa del factor de elongación de la traducción 1 (*TEF1*: YAL10C09141g) mediante PCR, utilizando los cebadores pTef_SpeI_fw3 y pTEF_CPR1_ol_rv. Como molde servía en este caso el plásmido pINTB_HMG1 (SEQ ID NO 5).
- Además, el gen *CPR1* (YALI0D04422g) se amplificó mediante PCR utilizando los cebadores pTEF_CPR1_ol_fw y CPR1_SphI_rv (molde: ADN genómico de *Y. lipolytica* H222).
- Se insertó una región colgante mediante los cebadores pTEF_CPR1_ol_rv y pTEF_CPR1_ol_fw, con cuya ayuda se unieron ambos fragmentos de PCR mediante PCR de solapamiento utilizando los cebadores pTef_SpeI_fw3 y CPR1_SphI_rv. El fragmento de solapamiento se ligó a continuación en el vector pJET1.2/blunt (Fermentas; SEQ ID NO 1), se separó por corte de éste utilizando las enzimas de restricción *SpeI* y *SphI* y finalmente se ligó en la cadena principal del plásmido pINTB_HMG1 cortado con *SpeI* und *SphI* (SEQ ID NO 5), resultando el plásmido pINTB-CPR1.
- El plásmido resultante se linearizó finalmente con *NotI* y se transformó en las cepas receptoras de *Y. lipolytica* deseadas.
- La integración exitosa del gen *CPR1* se confirmó por PCR, utilizando los cebadores INTB_out_fw e INTB_out_rv que se unen al ADN genómico fuera de la construcción integrada.
- La cepa que portaba las delecciones tanto de los genes *POX1*, *POX2*, *POX3*, *POX4*, *POX5* y *POX6* como la copia adicional de *CPR1* bajo el control del promotor TEF 1, se denominó H222ΔPoC y sirvió como cepa de partida para la construcción de cepas adicionales para la producción de ácidos dicarboxílicos.
- La cepa que portaba las delecciones tanto de los genes *POX1*, *POX2*, *POX3*, *POX4*, *POX5*, *POX6*, *FADH*, *ADH1*, *ADH2*, *ADH3*, *ADH4*, *ADH5*, *ADH6*, *ADH7*, *FAO1* como la copia adicional de *CPR1* bajo el control del promotor *TEF1* se denominó H222ΔPΔAΔFoC.

Tabla 5: Cebadores para la sobre-expresión de *CPR1*

Nombre	SEQ ID	Secuencia (5'→3')	RS
pTef_SpeI_fw3	SEQ ID NO 89	CTACGCTTGTTTCAGACTTTG	
pTEF_CPR1_ol_rv	SEQ ID NO 97	AGAGAGTCGAGTAGAGCCATTTT GAATGATTCTTATACTCAGAAGG	
pTEF_CPR1_ol_fw	SEQ ID NO 98	CCTTCTGAGTATAAGAATCATTC AAAATGGCTCTACTCGACTCTCT	
CPR1_SphI_rv	SEQ ID NO 99		<i>SphI</i>

Nombre	SEQ ID	Secuencia (5'→3')	RS
		atatagcatgcCTACCACACATC TTCCTGGTAGAC	
INTB_out_fw	SEQ ID NO	CTCAAGATACGGCATTGG	
INTB_out_rv	SEQ ID NO	TCCTTGGCTAGACGAATG	

Ejemplo 8: Cultivo comparativo de diferentes cepas de producción en el fermentador

- 5 Para verificar en qué medida afectan las diferentes modificaciones genéticas a la producción de ω -hidroxiácidos grasos y/o ácidos dicarboxílicos, se cultivaron en el fermentador las cepas *Yarrowia lipolytica* H222 Δ P, H222 Δ P Δ A, H222 Δ P Δ F, H222 Δ P Δ A Δ F, H222 Δ PoF, H222 Δ PoC, H222 Δ P Δ D, H222 Δ P Δ H, H222 Δ P Δ S, H222 Δ P Δ A Δ FoC, H222 Δ P Δ A Δ F Δ D, H222 Δ P Δ A Δ F Δ H y H222 Δ P Δ A Δ F Δ S, cuya construcción se describió en los Ejemplos 1, 2, 5, 6 y 7. Como medio de cultivo servía en este caso medio mínimo con (glucosa al 5% (p/v), 1 g l⁻¹ de KH₂PO₄, 0,16 g l⁻¹ de K₂HPO₄ x 3 H₂O, 3 g l⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 0,7 g l⁻¹ de MgSO₄ x 7 H₂O, 0,5 g l⁻¹ de NaCl, 0,4 g l⁻¹ de Ca(NO₃)₂ x 4 H₂O, 0,5 mg l⁻¹ de H₃BO₃, 0,04 mg l⁻¹ de CuSO₄ x 5 H₂O, 0,1 mg l⁻¹ de KI, 0,4 mg l⁻¹ de MnSO₄ x 4 H₂O, 0,2 mg l⁻¹ de Na₂MoO₄ x 2 H₂O, 0,4 mg l⁻¹ de ZnSO₄ x 7 H₂O, 6 mg l⁻¹ de FeCl₃ x 6 H₂O, 0,3 mg l⁻¹ de hidrocloreto de tiamina). El cultivo tuvo lugar en el fermentador a 28 °C. La saturación de oxígeno se ajustó al 55%. Las células se inocularon con una DO₆₀₀ de 1 y se incubaron durante 24 h a pH 5,5 (titulación automatizado de HCl y NaOH). Luego se añadieron 15 g l⁻¹ de DD y el pH se ajustó a 8,0. Se añadió glucosa cada 24 h para ajustar una concentración final de 5% (p/v).

Y. lipolytica H222 Δ P formó en este caso cantidades relativamente grandes de ácidos dicarboxílicos y, por consiguiente, puede utilizarse como una cepa de partida para la construcción de una cepa de producción correspondiente para ácidos dicarboxílicos (Fig. 5A).

Tanto *Y. lipolytica* H222 Δ P Δ A como H222 Δ P Δ F formaron cantidades incrementadas de ω -hidroxiácidos grasos y, por consiguiente, pueden utilizarse como cepas de partida para la construcción de correspondientes cepas de producción de ω -hidroxiácidos grasos. En este caso, se ha de preferir *Y. lipolytica* H222 Δ P Δ F frente a H222 Δ P Δ A (Fig. 5A).

Y. lipolytica H222 Δ P Δ A Δ F formó solo pequeñas cantidades de ácidos dicarboxílicos y, por consiguiente, es la cepa de partida preferida para la construcción de cepas de producción de ω -hidroxiácidos grasos (Fig. 5A).

La sobre-expresión de *FAO1* y *CPR1* en la cepa *Y. lipolytica* H222 Δ P (cepas resultantes: *Y. lipolytica* H222 Δ PoF y H222 Δ PoC) condujeron en cada caso a una producción incrementada de ácidos dicarboxílicos (Fig. 5B).

La delección de *DGA1* en la cepa *Y. lipolytica* H222 Δ P (cepa resultante: *Y. lipolytica* H222 Δ P Δ D) condujo a una producción incrementada de ácidos dicarboxílicos, mientras que las delecciones de *PAH1* y *SCT1* (cepas resultantes: *Y. lipolytica* H222 Δ P Δ H y H222 Δ P Δ S) no aumentaron significativamente la producción de ácidos dicarboxílicos (Fig. 5B).

La sobre-expresión de *CPR1* en la cepa *Y. lipolytica* H222 Δ P Δ A Δ F (cepa resultante: *Y. lipolytica* H222 Δ P Δ A Δ FoC) condujo a una producción incrementada de ácidos dicarboxílicos, pero no de ω -hidroxiácidos grasos (Fig. 5C).

Las delecciones de *DGA1*, *PAH1* y *SCT1* en la cepa *Y. lipolytica* H222 Δ P Δ A Δ F (cepas resultantes: *Y. lipolytica* H222 Δ P Δ A Δ F Δ D, H222 Δ P Δ A Δ F Δ H y H222 Δ P Δ A Δ F Δ S) no condujeron a una producción incrementada de ω -hidroxiácidos grasos (Fig. 5B).

Ejemplo 9: Ensayo enzimático para la determinación de la actividad de la alcohol (graso)-deshidrogenasa y -oxidasa

Se determinaron las actividades enzimáticas de las alcohol (graso)-deshidrogenasas y -oxidasa en lisados celulares de las cepas de *Yarrowia lipolytica* H222 Δ P, H222 Δ P Δ A, H222 Δ P Δ F, H222 Δ P Δ A Δ F y H222 Δ PoF. Las células se cultivaron tal como se describe en el Ejemplo 8 y se recolectaron y se disgregaron después de tres días.

Las actividades de la enzima de la alcohol (graso)-deshidrogenasa y -oxidasa se llevaron a cabo según lo descrito por Matatiele (2005) (Matatiele PR (2005) tesis de doctorado, Universidad del Estado Libre, República de Sudáfrica).

El ensayo de alcohol (graso)-deshidrogenasa (Tris-HCl 50 mM pH 8,5, dodecan-1-ol 1,3 mM en DMSO, NAD⁺ 2 mM, NAP⁺ 2 mM, extracto celular al 1,5% (v/v)) se midió con un espectrofotómetro de registro a 30 °C y $\lambda = 340$ nm y se calculó la actividad enzimática con ayuda del aumento de extinción determinado ($\epsilon_{\text{NAD(P)H}} = 6,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

El ensayo de alcohol (graso)-deshidrogenasa (glicina-NaOH 50 mM pH 9,0, dodecan-1-ol 0,35 mM en DMSO, peroxidasa al 0,013% (p/v) (150 U/mg), ABTS al 0,044% (p/v), azida sódica 6 mM, extracto celular al 1-5% (v/v)) se midió con un espectrofotómetro de registro a $\lambda = 405$ nm y se calculó la actividad enzimática con ayuda del aumento de extinción determinado ($\epsilon_{\text{ABTS}_{\text{ox}}} = 18,4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Sorprendentemente, no se comprobó una diferencia clara en la alcohol (graso)-deshidrogenasa entre las cepas (Fig. 6A). Esto podría explicarse por la actividad de alcohol-deshidrogenasa residual. También es posible que la reacción medida de dodecan-1-ol también sea catalizada por el citocromo P450 y en última instancia se determine la actividad de las aldehído-deshidrogenasas.

Como era de esperar, la actividad de la alcohol (graso)-oxidasa solo se pudo detectar en las cepas *Y. lipolytica* H222 Δ P y H222 Δ P Δ A y no en las cepas de delección de *FAO1*- *Y. lipolytica* H222 Δ P Δ F y H222 Δ P Δ A Δ F (Fig. 6B). La actividad de la alcohol (graso)-oxidasa medida se incrementó más de diez veces por la sobre-expresión de *FAO1* (cepa: *Y. lipolytica* H222 Δ PoF).

Ejemplo 9: Cultivo de *Y. lipolytica* H222 Δ P Δ F en el fermentador

Para verificar si las cepas de producción están en condiciones de producir grandes cantidades de ácidos dicarboxílicos y/u ω -hidroxiácidos grasos y de acumularlos en el medio de cultivo, se cultivó la cepa *Y. lipolytica* H222 Δ P Δ F en el fermentador durante 7 días. Como medio de cultivo servía en este caso medio mínimo con glucosa y una cantidad incrementada de sales minerales, oligoelementos y vitaminas (glucosa al 5% (v/v), 2 g l⁻¹ de KH₂PO₄, 0,32 g l⁻¹ de K₂HPO₄ x 3 H₂O, 6 g l⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 1,4 g l⁻¹ de MgSO₄ x 7 H₂O, 1 g l⁻¹ de NaCl, 0,8 g l⁻¹ de Ca(NO₃)₂ x 4 H₂O, 1 mg l⁻¹ de H₃BO₃, 0,08 mg l⁻¹ de CuSO₄ x 5 H₂O, 0,2 mg l⁻¹ de KI, 0,8 mg l⁻¹ de MnSO₄ x 4 H₂O, 0,4 mg l⁻¹ de Na₂MoO₄ x 2 H₂O, 0,8 mg l⁻¹ de ZnSO₄ x 7 H₂O, 12 mg l⁻¹ de FeCl₃ x 6 H₂O, 0,6 mg l⁻¹ de hidrocloreto de tiamina). El cultivo tuvo lugar en el fermentador a 28 °C. La saturación de oxígeno se ajustó al 55%. Las células se inocularon con una DO₆₀₀ de 1 y se incubaron durante 2 días a pH 5,5 (titulación automatizado de HCl y NaOH). Después de 2 días, el pH se ajustó a 8,0 y se añadieron 15 g l⁻¹ de dodecano después de 2 días y 3 días. Se añadió glucosa cada 24 h para ajustar una concentración final de 5- 10% (p/v).

Después de 6 días de cultivo (es decir, después de 4 días en la fase de producción), *Y. lipolytica* H222 Δ P Δ F formó 29,5 g l⁻¹ de ω -hidroxiácido dodecanoico y 3,5 g l⁻¹ de ácido dodecanodioico (Fig. 7).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Technische Universität Dresden
 <120> Cepas de levadura y procedimiento para la producción de omega-hidroxiácidos grasos y ácidos dicarboxílicos
 <130> 00017P0263DEWO
 <140> DE 10 2013 022 175.7
 <141> 12-12-2013
 <160> 101
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 2974
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> pJET1.2/blunt (vector de clonación en extremo romo)
 <400> 1

ES 2 886 026 T3

atcttgctga	aaaactcgag	ccatccggaa	gatctggcgg	ccgctctccc	tatagtgagt	60
cgtattacgc	cggatggata	tgggtgttcag	gcacaagtgt	taaagcagtt	gattttattc	120
actatgatga	aaaaaacaat	gaatggaacc	tgctccaagt	taaaaataga	gataataccg	180
aaaactcatc	gagtagtaag	attagagata	atacaacaat	aaaaaaatgg	tttagaactt	240
actcacagcg	tgatgctact	aattgggaca	attttccaga	tgaagtatca	tctaagaatt	300
taaatgaaga	agacttcaga	gcttttgtta	aaaattattt	ggcaaaaata	atataattcg	360
gctgcagggg	cggcctcgtg	atagcctat	ttttataggt	taatgtcatg	ataataatgg	420
tttcttagac	gtcaggtggc	acttttcggg	gaaatgtgcg	cgggaaccct	atttgtttat	480
ttttctaaat	acattcaaat	atgtatccgc	tcatgagaca	ataaccctga	taaatgcttc	540
aataatattg	aaaaaggaag	agtatgagta	ttcaacattt	ccgtgtcgcc	cttattccct	600
tttttgcggc	attttgcctt	cctgtttttg	ctcaccacga	aacgctggtg	aaagtaaaag	660
atgctgaaga	tcagttgggt	gcacgagtgg	gttacatcga	actggatctc	aacagcggta	720
agatccttga	gagttttcgc	cccgaagaac	gttttccaat	gatgagcact	tttaaagttc	780
tgctatgtgg	cgcggtatta	tcccgtattg	acgccgggca	agagcaactc	ggtcgccgca	840
tacactattc	tcagaatgac	ttggttgagt	actcaccagt	cacagaaaag	catcttacgg	900
atggcatgac	agtaagagaa	ttatgcagtg	ctgccataac	catgagtgat	aacactgcgg	960
ccaacttact	tctgacaacg	atcggaggac	cgaaggagct	aaccgctttt	ttgcacaaca	1020
tgggggatca	tgtaactcgc	cttgatcgtt	gggaaccgga	gctgaatgaa	gccataccaa	1080
acgacgagcg	tgacaccacg	atgcctgtag	caatggcaac	aacgttgcg	aaactattaa	1140

ES 2 886 026 T3

```

ctggcgaaact acttactcta gcttcccggc aacaattaat agactggatg gaggcggata 1200
aagttgcagg accacttctg cgctcggccc ttccggctgg ctggtttatt gctgataaat 1260
ctggagccgg tgagcgtggg tctcgcggta tcattgcagc actggggcca gatggtaagc 1320
cctcccgtat cgtagttatc tacacgacgg ggagtcaggc aactatggat gaacgaaata 1380
gacagatcgc tgagataggt gcctcactga ttaagcattg gtaactgtca gaccaagttt 1440
actcatatat acttttagatt gatttaaaac ttcattttta atttaaaag atctaggtga 1500
agatcctttt tgataatctc atgacaaaaa tcccttaacg tgagttttcg ttccactgag 1560
cgtcagaccc cgtagaaaag atcaaaggat cttcttgaga tccttttttt ctgcgcgtaa 1620
tctgctgctt gcaaacaaaa aaaccaccgc taccagcggg ggtttggttg ccggatcaag 1680
agctaccaac tctttttccg aaggttaactg gcttcagcag agcgcagata ccaaatactg 1740
tccttctagt gtagccgtag ttaggccacc acttcaagaa ctctgtagca ccgcctacat 1800
acctcgctct gctaactctg ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag tcgtgtctta 1860
ccgggttgga ctcaagacga tagttaccgg ataaggcgca gcggtcgggc tgaacggggg 1920
gttcgtgcac acagcccagc ttggagcgaa cgacctacac cgaactgaga tacctacagc 1980
gtgagctatg agaaagcgcc acgcttcccg aaggagagaa ggcgagacag tatccggtaa 2040
gcggcagggg cggaacagga gagcgacga gggagcttcc agggggaaac gcctggtatc 2100
tttatagtcc tgtcgggttt cgccacctct gacttgagcg tcgatttttg tgatgctcgt 2160
cagggggggc gagcctatgg aaaaacgcca gcaacgcggc ctttttacgg ttcctggcct 2220
tttgctggcc ttttgctcac atgttcttct ctgcgttata ccctgattct gtggataaacc 2280
gtattaccgc ctttgagtga gctgataacc ctgcgccag ccgaacgacc gagcgacagc 2340
agtcagttag cgaggaagcg gaagagcgcc caatacgcaa accgcctctc cccgcgcggt 2400
ggccgattca ttaatgcagc tggcacgaca ggtttcccga ctggaaagca attggcagtg 2460
agcgcaacgc aattaatgtg agttagctca ctcataggc accccaggct ttacacttta 2520
tgcttcgggc tcgtataatg tgtggaatta tgagcggata ataatttcac acaggaggtt 2580
taaaacttta acatgtcaaa agagacgtct tttgttaaga atgctgagga acttgcaaag 2640
caaaaaatgg atgctattaa ccctgaactt tcttcaaaat ttaaattttt aataaaattc 2700
ctgtctcagt ttctgaagc ttgctctaaa cctcgttcaa aaaaaatgca gaataaagtt 2760
ggtcaagagg aacatattga atatttagct cgtagttttc atgagagtcg attgccaaga 2820
aaaccacgc cacctacaac ggttcctgat gaggtggtta gcatagttct taatataagt 2880
tttaataata agcctgaaaa tcttgagaga ataaaagaag aacatcgatt ttccatggca 2940
gctgagaata ttgtaggaga tcttctagaa agat 2974
<210> 2
<211> 2725
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> pUCBM21 (vector de clonación)
<400> 2

```

ES 2 886 026 T3

gcgcccataa	cgcaaaccgc	ctctccccgc	gcgttgccgc	attcattaat	gcagctggca	60
cgacaggttt	cccgaactga	aagcgggcag	tgagcgcaac	gcaattaatg	tgagttagct	120
cactcattag	gcaccccagg	ctttacactt	tatgcttccg	gctcgtatgt	tgtgtggaat	180
tgtgagcggg	taacaatttc	acacaggaaa	cagctatgac	catgattacg	ccaagcttcc	240
atgggatatc	gcctgcctgc	agagctctag	agtcgacggg	cccgggtaccg	cggccgcaact	300
taagttacgc	gtggatcccc	gggaattcac	tggccgtcgt	tttacaacgt	cgtgactggg	360
aaaaccctgg	cgttacccaa	cttaatcgcc	ttgcagcaca	tccccctttc	gccagctggc	420
gtaatagcga	agaggcccg	accgatcgcc	cttcccaaca	gttgcgcgagc	ctgaatggcg	480
aatggcgccct	gatgcgggat	tttctcctta	cgcatctgtg	cggatatttca	caccgcataat	540
ggtgcactct	cagtacaatc	tgctctgatg	ccgcatagtt	aagccagccc	cgacacccgc	600
caacacccgc	tgacgcgccc	tgacgggctt	gtctgctccc	ggcatccgct	tacagacaag	660
ctgtgaccgt	ctccggggagc	tgcatgtgtc	agaggttttc	accgtcatca	ccgaaacgcg	720
cgagacgaaa	gggcctcgtg	atacgcctat	ttttataggt	taatgtcatg	ataataatgg	780
tttcttagac	gtcaggtggc	acttttcggg	gaaatgtgcg	cggaaaccct	atttgtttat	840
ttttctaaat	acattcaaata	atgtatccgc	tcatgagaca	ataaccctga	taaatgcttc	900
aataatattg	aaaaaggaag	agtatgagta	ttcaacattt	ccgtgtcgcc	cttattccct	960
tttttgccgc	attttgcctt	cctgtttttg	ctcaccacga	aacgctgggtg	aaagtaaaag	1020
atgctgaaga	tcagttgggt	gcacgagtgg	gttacatcga	actggatctc	aacagcggta	1080
agatccttga	gagttttcgc	ccgaagaac	gttttccaat	gatgagcact	tttaaagtcc	1140
tgctatgtgg	cgcgggtatta	tcccgtattg	acgccgggca	agagcaactc	ggtcgccgca	1200
tacactattc	tcagaatgac	ttggttgagt	actcaccagt	cacagaaaag	catcttacgg	1260
atggcatgac	agtaagagaa	ttatgcagtg	ctgccataac	catgagtgat	aacactgcgg	1320
ccaacttact	tctgacaacg	atcggaggac	cgaaggagct	aaccgctttt	ttgcacaaca	1380
tgggggatca	tgtaactcgc	cttgatcggt	gggaaccgga	gctgaatgaa	gccataccaa	1440
acgacgagcg	tgacaccacg	atgcctgtag	caatggcaac	aacgttgccg	aaactattaa	1500
ctggcgaact	acttactcta	gcttcccggc	aacaattaat	agactggatg	gaggcggata	1560
aagttgcagg	accacttctg	cgctcggccc	ttccggctgg	ctggtttatt	gctgataaat	1620

ES 2 886 026 T3

ctggagcccg tgagcgtggg tctcgcggtg tcattgcagc actggggcca gatggttaagc 1680
cctcccgtat cgtagttatc tacacgacgg ggagtcaggc aactatggat gaacgaaata 1740
gacagatcgc tgagataggt gcctcactga ttaagcattg gtaactgtca gaccaagttt 1800
actcatatat acttttagatt gattttaaac ttcattttta attttaaagg atctaggtga 1860
agatcctttt tgataatctc atgacaaaaa tcccttaacg tgagttttcg ttccactgag 1920
cgtcagaccc cgtagaaaag atcaaaggat cttcttgaga tccttttttt ctgcgcgtaa 1980
tctgctgctt gcaaacaaaa aaaccaccgc taccagcggg ggtttggttg ccggatcaag 2040
agctaccaac tctttttccg aaggttaactg gcttcagcag agcgcagata ccaaatactg 2100
tccttctagt gtgaccgtag ttaggccacc acttcaagaa ctctgtagca ccgcctacat 2160
acctcgtctc gctaatacctg ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag tcgtgtctta 2220
ccgggttggg ctcaagacga tagttaccgg ataaggcgca gcggtcgggc tgaacggggg 2280
gttcgtgcac acagcccagc ttggagcgaa cgacctacac cgaactgaga tacctacagc 2340
gtgagctatg agaaagcgcc acgcttcccg aaggggagaaa ggccggacagg tatccggtaa 2400
gcggcagggg cggaacagga gagcgcacga gggagcttcc aggggggaaac gcctggtatc 2460
tttatagtcc tgtcgggttt cgccacctct gacttgagcg tcgatttttg tgatgctcgt 2520
cagggggggc gagcctatgg aaaaacgcca gcaacgcggc ctttttacgg ttcctggcct 2580
tttgctggcc ttttgctcac atgttctttc ctgcgttatc ccctgattct gtggataacc 2640
gtattaccgc ctttgagtga gctgataccg ctgcgccgag ccgaacgacc gagcgacgag 2700
agtcagtga cgaggaagcg gaaga 2725

<210> 3

<211> 9203

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> pUC-Lys2-DK2 (fuente de URA blaster)

<220>

<221> CDS

10 <222> (5937)..(6797)

<400> 3

catgcgatat cccatggaag cttggcgtaa tcatgggtcat agctgtttcc tgtgtgaaat 60
tggtatccgc tcacaattcc acacaacata cgagccggaa gcataaagtg taaagcctgg 120
ggtgcctaata gaggagcta actcacatta attgcgttgc gctcactgcc cgctttccag 180
tcgggaaacc tgcctgacca gctgcattaa tgaatcggcc aacgcgcggg gagagcggt 240
ttgcgtattg ggcgctcttc cgcttcctcg ctactgact cgctgcgctc ggtcgttcgg 300

ES 2 886 026 T3

ctgcggcgag cggtatcagc tcaactcaaag gcggtataac ggttatccac agaatacagg	360
gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggcagcaaaa aggcagagaa ccgtaaaaag	420
gccgcgttgc tggcggtttt ccataggctc gcgccccctg acgagcatca caaaaatcga	480
cgctcaagtc agaggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataaccaggc gtttccccct	540
ggaagctccc tcgtgcgctc tcctgttccg accctgccgc ttaccggata cctgtccgcc	600
tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac gctgtaggta tctcagttcg	660
gtgtaggctg ttgcgtccaa gctgggctgt gtgcacgaac ccccggttca gcccgaccgc	720
tgcgccctat ccggtaaacta tcgtcttgag tccaaccggg taagacacga cttatcgcca	780
ctggcagcag ccactggtaa caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag	840
ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagga cagtatttgg tatctgcgct	900
ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg caaacaacc	960
accgctggta gcggtggtt ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaagga	1020
tctcaagaag atcctttgat ctttctacg ggtctgacg ctcaagtggaa cgaaaactca	1080
cgttaaggga ttttggcat gagattatca aaaaggatct tcacctagat ctttttaaat	1140
taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc tgacagttac	1200
caatgcttaa tcagtgggc acctatctca gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt	1260
gcctgactcc ccgtcgtgta gataactacg atacgggagg gcttaccatc tggccccagt	1320
gctgcaatga taccgcgaga ccacgctca cgggctccag atttatcagc aataaaccag	1380
ccagccggaa gggccgagcg cagaagtggc cctgcaactt tatccgcctc catccagtct	1440
attaattggt gccgggaagc tagagtaagt agttcgccag ttaatagttt gcgcaacgtt	1500
gttgccattg ctacaggcat cgtggtgtca cgctcgtcgt ttggtatggc ttcattcagc	1560
tccggttccc aacgatcaag gcgagttaca tgatcccca tgttgtgcaa aaaagcggtt	1620
agctccttcg gtccctccgat cgttgtcaga agtaagttgg ccgcagtgtt atcactcatg	1680
gttatggcag cactgcataa ttctcttact gtcatgccat ccgtaagatg cttttctgtg	1740
actgtgagtc actcaaccaa gtcattctga gaatagtgtg tcgggcgacc gatttgctct	1800
tgcccgcgct caatacggga taataccgcg ccacatagca gaactttaaa agtgctcatc	1860
attggaaaac gttcttcggg gcgaaaactc tcaaggatct taccgctgtt gagatccagt	1920
tcgatgtaac ccactcgtgc acccaactga tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt	1980
tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaaa gccgcaaaaa agggaataag gccgacacgg	2040
aaatgttgaa tactcatact cttccttttt caatattatt gaagcattta tcagggttat	2100
tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg	2160
cgcacatttc ccgaaaagt gccacctgac gtctaagaaa ccattattat catgacatta	2220

ES 2 886 026 T3

acctataaaa atagggcgtat cacgaggccc tttcgtctcg cgcgtttcgg tgatgacggt	2280
gaaaacctct gacacatgca gctcccgag acggtcacag cttgtctgta agcggatgcc	2340
gggagcagac aagcccgta gggcgcgtca gcgggtgttg gcgggtgtcg gggctggctt	2400
aactatgcgg catcagagca gattgtactg agagtgcacc atatgcggtg tgaaataccg	2460
cacagatgcg taaggagaaa ataccgcatc aggcgccaac gccgagaagg agtggaacga	2520
gctcttcgcc aagtacggtg aggagtatcc caaggagcac tctgagatca tccgacgatt	2580
caagcgagag ctgcccgagg gatgggagaa ggctctgcct acctacacc cgcgcgacaa	2640
tgccgttgct tctogaaaagc tgtccgagat tgtcctcacc aagatccacg aggtcctccc	2700
cgagcttggt ggtggttccg ccgatctgac cggtcctaac ctgacccgat ggaaggacgc	2760
tgttgatttc cagcctcctg tccccacct tgggtgactac tccggccgat atatccgata	2820
cggtgttcga gagcacggca tgggcgctat catgaacggt atgaacgctt acggaggtat	2880
catccccctac ggaggctactt tccttaactt cgtctcctac gccgctgggtg ccgtccgact	2940
gtctgccctg tctggccacc acgttatctg ggttgctacc catgactcca ttggtctggg	3000
tgaggatggc cctaccctac agccattga gactgtcgcc tggctccgag ccacccccaa	3060
cctctctgtg tggcgacctg ccgacggtaa cgagacctcc gctgcttact acaaggccat	3120
caccaactac cactccct ctgtcctgtc tctgaccga cagaacctgc ctcagcttga	3180
gggctcttc atcgagaagg cctccaaggg tggttaccag ctcatctccg aggacaaggg	3240
tgacatctac cttgtgtcca ctggttctga ggttgccatc tgtgttgctg ccgccaaagt	3300
cctcaaggag aagaagggtg tctactgccg tgtcatctct ctgcccgact ggttcacctt	3360
cgagcagcag tctctcgagt accgaaagtc tgttttcccc gatggcatcc ccatgctttc	3420
cgtcgaggtc tactccgact ttggctggtc tcgatactct caccagcagt ttggtctgga	3480
ccgattcggg gcttctgctc cctccagca ggtctacgat gcctttgagt tcaatgccga	3540
gggtgtcgcc aagcgagctg aggccaccat taactactac aagggccaga ctgtcaagtc	3600
tcctattcag cgagccttcg accccattga cgtcaacacc cgaccggcc acggtgtcta	3660
agtgggttgc ccgtctgata taagtattga tatagagtat atttaaattg aaccccatga	3720
gtttgtagaa ccttgctgta caactggcat gtatgtgatg tctactgatg ttgtattgcc	3780
gtatgtaact attacgagtt ctggggatga gattcccatg cttccacttg ctcacagca	3840
aacgctatca aatttacgct caatttttga gcactggcta caatacaaac catctcaaac	3900
gaaaaatgct gtaattattg cgacacctca catttagtca tatatatcat aattaattaa	3960
atcatacaaa aatagtctgc tcacagacaa gcaataatca ccattacacg gtaacaaata	4020
acaaaatggc aatgcttcgc atcgcttat ggtcaaggca ctccctacgg cactgcttac	4080

ES 2 886 026 T3

ttgttaccac cacgtccacc gacactcttc agcttatcaa gggctctgctc agacagctcc	4140
accttcggca aagcaagctc aaccttggac tggggggcat ccaggaagcc gacagccacc	4200
aggtaagcca ggtagatacc cattedgagcc tcgtcaacgc ccttaccagc ggacaaatcg	4260
actccggtcc actcagcgtc tcgagagaga gcagatcgag cattggagtc atccagctcg	4320
ggggccttgg tagactgggg aaggctcatcg agcacaaagt gtagcagagg atacagggca	4380
gagtcctgcg agtcctcaac aacaaacttc tccagagcca gacgccaggt gacgtagtcc	4440
tcgacagaaa ctttgtaacc gtacttcttg agggctctgca ggaattcgtt gaaccgtgtt	4500
cgaggctggg aagtcacatg ggcgacaacc acgccggaag gctgcttggg ccagaaagag	4560
gcggcagtaa caaccgagc cacgtgatcg acgggcacca tgttgaccga gttgtggatg	4620
ttgggaatct caccagctg gatgcatccc ttgatcattc gaaccaggaa atcgtccgtg	4680
ttggtggctc cggctcttga gtctccgaca acgtaaccag gtcgaaatgat ggttccgggtg	4740
agtccccggg ctccggcctc tcggatcacg tgctctgcga cccacttga ctgtccgtag	4800
ccgttgccga gaccacaga agaaccatg agatcgctcg actcggaac gccagccttg	4860
ccctcctcca ccagatcggc agacagcttg ttgaagtgtc cgggtgctgac ggcagagggtg	4920
gaggacacaa agttgaagat ctactgggct gcttcctaata gcaggagtcg cataaggag	4980
agcgtcgacc gatgcccttg agagccttca acccagtcag ctccctccgg tgggcgcggg	5040
gcatgactat cgtcgccgca cttatgactg tcttctttat catgcaactc gtaggacagg	5100
tgccggcagc gctctgggtc attttcggcg aggaccgctt tcgctggagc gcgacgatga	5160
tcggcctgtc gcttgccgta ttccggaatct tgcacgccct cgtcaagcc ttcgtcactg	5220
gtcccgccac caaacgtttc ggcgagaagc aggccattat cgcgggcatg gcggccgacg	5280
cgtctgggcta cgtcttctg cgttccgca cgcgaggctg gatggccttc cccattatga	5340
ttcttctcgc ttccggcggc atcgggatgc ccgcgttgca ggccatgctg tccaggcagg	5400
tagatgacga ccatcaggga cagcttcaag gatcgctcgc ggctcttacc agcctaactt	5460
cgatcactgg accgctgac gtcacggcga tttatgccgc ctccggcagc acatggaacg	5520
ggttggcatg gattgtaggc gccgccctat accttgtctg cctcctgtct gactcgtcat	5580
tgccgccttt ggagtacgac tccaactatg agtgtgcttg gatcactttg acgatacatt	5640
cttcgttga ggctgtgggt ctgacagctg cgttttcggc gcggttgcc gacaacaata	5700
tcagctgcaa cgtcattgct ggctttcatc atgatcacat ttttgtcggc aaaggcgacg	5760
cccagagagc cattgacgtt ctttctaatt tggaccgata gccgtatagt ccagtctatc	5820
tataagttca actaactcgt aactattacc ataacatata cttcactgcc ccagataagg	5880
ttccgataaa aagttctgca gactaaattt atttcagtct cctcttcacc accaaa atg	5939

Met
1

ES 2 886 026 T3

ccc tcc tac gaa gct cga gct aac gtc cac aag tcc gcc ttt gcc gct Pro Ser Tyr Glu Ala Arg Ala Asn Val His Lys Ser Ala Phe Ala Ala 5 10 15	5987
cga gtg ctc aag ctc gtg gca gcc aag aaa acc aac ctg tgt gct tct Arg Val Leu Lys Leu Val Ala Ala Lys Lys Thr Asn Leu Cys Ala Ser 20 25 30	6035
ctg gat gtt acc acc acc aag gag ctc att gag ctt gcc gat aag gtc Leu Asp Val Thr Thr Thr Lys Glu Leu Ile Glu Leu Ala Asp Lys Val 35 40 45	6083
gga cct tat gtg tgc atg atc aag acc cat atc gac atc att gac gac Gly Pro Tyr Val Cys Met Ile Lys Thr His Ile Asp Ile Ile Asp Asp 50 55 60 65	6131
ttc acc tac gcc ggc act gtg ctc ccc ctc aag gaa ctt gct ctt aag Phe Thr Tyr Ala Gly Thr Val Leu Pro Leu Lys Glu Leu Ala Leu Lys 70 75 80	6179
cac ggt ttc ttc ctg ttc gag gac aga aag ttc gca gat att ggc aac His Gly Phe Phe Leu Phe Glu Asp Arg Lys Phe Ala Asp Ile Gly Asn 85 90 95	6227
act gtc aag cac cag tac aag aac ggt gtc tac cga atc gcc gag tgg Thr Val Lys His Gln Tyr Lys Asn Gly Val Tyr Arg Ile Ala Glu Trp 100 105 110	6275
tcc gat atc acc aac gcc cac ggt gta ccc gga acc gga atc att gct Ser Asp Ile Thr Asn Ala His Gly Val Pro Gly Thr Gly Ile Ile Ala 115 120 125	6323
ggc ctg cga gct ggt gcc gag gaa act gtc tct gaa cag aag aag gag Gly Leu Arg Ala Gly Ala Glu Thr Val Ser Glu Gln Lys Lys Glu 130 135 140 145	6371
gac gtc tct gac tac gag aac tcc cag tac aag gag ttc ctg gtc ccc Asp Val Ser Asp Tyr Glu Asn Ser Gln Tyr Lys Glu Phe Leu Val Pro 150 155 160	6419
tct ccc aac gag aag ctg gcc aga ggt ctg ctc atg ctg gcc gag ctg Ser Pro Asn Glu Lys Leu Ala Arg Gly Leu Leu Met Leu Ala Glu Leu 165 170 175	6467
tct tgc aag ggc tct ctg gcc act ggc gag tac tcc aag cag acc att Ser Cys Lys Gly Ser Leu Ala Thr Gly Glu Tyr Ser Lys Gln Thr Ile 180 185 190	6515
gag ctt gcc cga tcc gac ccc gag ttt gtg gtt ggc ttc att gcc cag Glu Leu Ala Arg Ser Asp Pro Glu Phe Val Val Gly Phe Ile Ala Gln 195 200 205	6563
aac cga cct aag ggc gac tct gag gac tgg ctt att ctg acc ccc ggg Asn Arg Pro Lys Gly Asp Ser Glu Asp Trp Leu Ile Leu Thr Pro Gly 210 215 220 225	6611
gtg ggt ctt gac gac aag gga gac gct ctc gga cag cag tac cga act Val Gly Leu Asp Asp Lys Gly Asp Ala Leu Gly Gln Gln Tyr Arg Thr 230 235 240	6659
gtt gag gat gtc atg tct acc gga acg gat atc ata att gtc ggc cga Val Glu Asp Val Met Ser Thr Gly Thr Asp Ile Ile Ile Val Gly Arg	6707

ES 2 886 026 T3

245	250	255	
ggt ctg tac ggc cag aac cga gat cct att gag gag gcc aag cga tac Gly Leu Tyr Gly Gln Asn Arg Asp Pro Ile Glu Glu Ala Lys Arg Tyr 260 265 270			6755
cag aag gct ggc tgg gag gct tac cag aag att aac tgt tag Gln Lys Ala Gly Trp Glu Ala Tyr Gln Lys Ile Asn Cys 275 280 285			6797
aggtagact atggatatgt catttaactg tgtatataga gagcgtgcaa gtatggagcg			6857
cttggtcagc ttgtatgatg gtcagacgac ctgtctgata gagtatgtat gatactgcac			6917
aacctgtgta tccgcatgat ctgtccaatg gggcatgttg ttgtgtttct cgatacggag			6977
atgctgggta caagtagcta atacgattga actacttata cttatatgag gcttgaagaa			7037
agctgacttg tgtatgactt atttctcaact acatccccag tcacaataacc accagaattc			7097
tactgggctg cttcctaatag caggagtcgc ataagggaga gcgtcgaccg atgcccttga			7157
gagccttcaa cccagtcagc tccttccggg gggcgcgggg catgactatc gtcgccgcac			7217
ttatgactgt cttctttatc atgcaactcg taggacaggt gccggcagcg ctctgggtca			7277
ttttcggcga ggaccgcttt cgctggagcg cgacgatgat cggcctgtcg cttgcggtat			7337
tcggaatctt gcacgccctc gctcaagcct tcgtcactgg tcccgccacc aaacgtttcg			7397
gcgagaagca ggccattatc gccggcatgg cggccgacgc gctgggctac gtcttgctgg			7457
cgttcgcgac gcgaggtggt atggccttcc ccattatgat tcttctcgct tccggcggca			7517
tcgggatgcc cgcgttgacg gccatgctgt ccaggcaggt agatgacgac catcagggac			7577
agcttcaagc atcgctcgcg gctcttacca gcctaacttc gatcactgga ccgctgatcg			7637
tcacggcgat ttatgccgcc tcggcgagca catggaacgg gttggcatgg attgtaggcg			7697
ccgccctata ccttgctcgc ctggatctcc agttctgtac agccgatccc ggggaccctt			7757
gtagaactct ctccaggcct cacccttggt gaccttctcg tcctcctgga tccgagacac			7817
acgtcctcgt cgcgcgagag acggtagacg agaatggcgt agagagccag agctgcagag			7877
aaatcagtag cgcctgctac accgctgttc ttggcaatct gatcgagctc ggccacggtc			7937
ttggagctaa gagcctccgt caattgtgct tcgactacac tgccttcagc ggggcggacg			7997
aaatcgaacg ggaggactga gagtggtggg ttggtaaggg cggttgccca ttgtgttact			8057
gtattagtac ggtacatagg gccgaaggtc agagcggacc taataaatag ctgacacaga			8117
ataagtaccc tttctttgtc caggatcatga gtctcggtat cactcttaa aagagtcctg			8177
ccgttgctca tgagtatagt atagcagaca acatagtatt catactgcga tgacggcggg			8237
aattggaggc tacagaactc gaagcggggg catatagaca atcgcatthg ccaacgagtg			8297
tctgattaag gcttctccgt gtgactgctc attgtgtcaa tgctatactg tagtcatagc			8357
tacattgaca gaaagacaac gacagacagt gataaagtaa ccagatcctc aatcaaaaga			8417

gcccgaatga tccattttctc atatcgcata ccatccactc tgtttggtgcc gcatcctcca 8477
 caacgatttg ctcatggcac tgttctgggc agatcagaca tcggtagaca caatccagat 8537
 gacagttcac agacgattga tctcaatttt aagcctgacc aagcgatctc acgaacgatt 8597
 ccttcaattt cccatggata ctcacacgac attgtcggta gttttttttt tttgtagaga 8657
 caagttttca aacagatgtc aaaaccgaaa gttgcaagct ttcgatttgg aaggttatat 8717
 cgagacaggt gcaactgagtc atactgcagt ggagtgcagc tgatgggggg tgatcaaaga 8777
 aaatggtcac gtgattttac tgacctatag atattatcac tgcaaataca gatgacataa 8837
 taaatcatac cagcagctcc gcaccccaac tataccctaa ccctacagtc ttctgaaaaa 8897
 cctgatctgt gaacacagac cccaacccgg acaaggcttg aaccgctact cgtacagtac 8957
 atctccaagg tgggttgatg tgcagagcga tgtcattaat gacaggctgt ggttggtgt 9017
 ggtatcaaat gataaagtga taaaatttg agacacgggt acagattatg agcaacaagg 9077
 aggaatcagg gagatgaatg ggagtaagtt gtggtctcaa tgagtgaac agttgacttt 9137
 tatacagact aatcatagct tcttgagtc tcattattat gggctctgta acacattcta 9197
 ttgaag 9203

<210> 4

<211> 286

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 4

Met Pro Ser Tyr Glu Ala Arg Ala Asn Val His Lys Ser Ala Phe Ala
 1 5 10 15

Ala Arg Val Leu Lys Leu Val Ala Ala Lys Lys Thr Asn Leu Cys Ala
 20 25 30

Ser Leu Asp Val Thr Thr Thr Lys Glu Leu Ile Glu Leu Ala Asp Lys
 35 40 45

Val Gly Pro Tyr Val Cys Met Ile Lys Thr His Ile Asp Ile Ile Asp
 50 55 60

Asp Phe Thr Tyr Ala Gly Thr Val Leu Pro Leu Lys Glu Leu Ala Leu
 65 70 75 80

Lys His Gly Phe Phe Leu Phe Glu Asp Arg Lys Phe Ala Asp Ile Gly
 85 90 95

5

10

ES 2 886 026 T3

Asn Thr Val Lys His Gln Tyr Lys Asn Gly Val Tyr Arg Ile Ala Glu
 100 105 110
 Trp Ser Asp Ile Thr Asn Ala His Gly Val Pro Gly Thr Gly Ile Ile
 115 120 125
 Ala Gly Leu Arg Ala Gly Ala Glu Glu Thr Val Ser Glu Gln Lys Lys
 130 135 140
 Glu Asp Val Ser Asp Tyr Glu Asn Ser Gln Tyr Lys Glu Phe Leu Val
 145 150 155 160
 Pro Ser Pro Asn Glu Lys Leu Ala Arg Gly Leu Leu Met Leu Ala Glu
 165 170 175
 Leu Ser Cys Lys Gly Ser Leu Ala Thr Gly Glu Tyr Ser Lys Gln Thr
 180 185 190
 Ile Glu Leu Ala Arg Ser Asp Pro Glu Phe Val Val Gly Phe Ile Ala
 195 200 205
 Gln Asn Arg Pro Lys Gly Asp Ser Glu Asp Trp Leu Ile Leu Thr Pro
 210 215 220
 Gly Val Gly Leu Asp Asp Lys Gly Asp Ala Leu Gly Gln Gln Tyr Arg
 225 230 235 240
 Thr Val Glu Asp Val Met Ser Thr Gly Thr Asp Ile Ile Ile Val Gly
 245 250 255
 Arg Gly Leu Tyr Gly Gln Asn Arg Asp Pro Ile Glu Glu Ala Lys Arg
 260 265 270
 Tyr Gln Lys Ala Gly Trp Glu Ala Tyr Gln Lys Ile Asn Cys
 275 280 285

<210> 5

<211> 10839

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> pINTB-HMG1 (vector de clonación)

<220>

<221> CDS

<222> (207)..(3206)

<223> gen 3-metil-glutaril-CoA reductasa (HMG1)

ES 2 886 026 T3

```

<400> 5
ctagtttctt tgtctggcca tccgggtaac ccatgccgga cgcaaaatag actactgaaa      60

atTTTTtttgc tttgtggttg ggacttttagc caagggtata aaagaccacc gtccccgaat      120

tacctttcct cttcttttct ctctctcctt gtcaactcac acccgaaatc gttaagcatt      180

tccttctgag tataagaatc attcaa atg cta caa gca gct att gga aag att      233
                        Met Leu Gln Ala Ala Ile Gly Lys Ile
                        1                      5

gtg gga ttt gcg gtc aac cga ccc atc cac aca gtt gtc ctg acg tcc      281
Val Gly Phe Ala Val Asn Arg Pro Ile His Thr Val Val Leu Thr Ser
10                      15                      20                      25

atc gtg gcg tca acc gca tac ctc gcc atc ctc gac att gcc atc ccg      329
Ile Val Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Ala Ile Leu Asp Ile Ala Ile Pro
                      30                      35                      40

ggg ttc gag ggc aca caa ccc atc tca tac tac cac cct gca gca aaa      377
Gly Phe Glu Gly Thr Gln Pro Ile Ser Tyr Tyr His Pro Ala Ala Lys
                      45                      50                      55

tct tac gac aac cct gct gat tgg acc cac att gca gag gcc gac atc      425
Ser Tyr Asp Asn Pro Ala Asp Trp Thr His Ile Ala Glu Ala Asp Ile
                      60                      65                      70

cct tca gac gcc tac cga ctt gca ttt gcc cag atc cgt gtc agt gat      473
Pro Ser Asp Ala Tyr Arg Leu Ala Phe Ala Gln Ile Arg Val Ser Asp
                      75                      80                      85

gtt cag ggc gga gag gcc ccc acc atc cct ggc gcc gtg gcc gtg tct      521
Val Gln Gly Gly Glu Ala Pro Thr Ile Pro Gly Ala Val Ala Val Ser
90                      95                      100                      105

gat ctc gac cac aga atc gtc atg gac tac aaa cag tgg gcc ccc tgg      569
Asp Leu Asp His Arg Ile Val Met Asp Tyr Lys Gln Trp Ala Pro Trp
                      110                      115                      120

acc gcc agc aac gag cag atc gcc tcg gag aac cac atc tgg aag cac      617
Thr Ala Ser Asn Glu Gln Ile Ala Ser Glu Asn His Ile Trp Lys His
                      125                      130                      135

tcc ttc aag gac cac gtg gcc ttc agc tgg atc aag tgg ttc cga tgg      665
Ser Phe Lys Asp His Val Ala Phe Ser Trp Ile Lys Trp Phe Arg Trp
                      140                      145                      150

gcc tac ctg cgt ttg tcc act ctc atc cag ggg gca gac aac ttc gac      713
Ala Tyr Leu Arg Leu Ser Thr Leu Ile Gln Gly Ala Asp Asn Phe Asp
                      155                      160                      165

att gcc gtg gtc gcc ctt ggc tat ctt gcc atg cac tac acc ttc ttc      761
Ile Ala Val Val Ala Leu Gly Tyr Leu Ala Met His Tyr Thr Phe Phe
170                      175                      180                      185

agt ctc ttc cga tcc atg cga aag gtt ggc tcg cac ttt tgg ctt gcc      809
Ser Leu Phe Arg Ser Met Arg Lys Val Gly Ser His Phe Trp Leu Ala
                      190                      195                      200

tcc atg gct ctg gtc tct tcc acc ttc gct ttc ctg ctt gcg gtg gtg      857
Ser Met Ala Leu Val Ser Ser Thr Phe Ala Phe Leu Leu Ala Val Val
                      205                      210                      215

```

ES 2 886 026 T3

gct tcc tct agc ctg ggt tac cga cct agc atg atc acc atg tcc gag Ala Ser Ser Ser Leu Gly Tyr Arg Pro Ser Met Ile Thr Met Ser Glu 220 225 230	905
ggc ctg ccc ttc ctc gtg gtc gcc att ggc ttt gac cga aag gtc aac Gly Leu Pro Phe Leu Val Val Ala Ile Gly Phe Asp Arg Lys Val Asn 235 240 245	953
ctg gct agc gag gtg ctc aca tcc aag agc agc cag ctc gct ccc atg Leu Ala Ser Glu Val Leu Thr Ser Lys Ser Ser Gln Leu Ala Pro Met 250 255 260 265	1001
gtg cag gtg atc aca aag atc gcc tcc aag gcg ctg ttt gag tac agc Val Gln Val Ile Thr Lys Ile Ala Ser Lys Ala Leu Phe Glu Tyr Ser 270 275 280	1049
ctt gag gtg gcc gcc ctg ttt gct ggc gcc tat acc gga gtt cct cga Leu Glu Val Ala Ala Leu Phe Ala Gly Ala Tyr Thr Gly Val Pro Arg 285 290 295	1097
ctg tcc cag ttt tgc ttc tta tct gct tgg atc ctc atc ttc gac tac Leu Ser Gln Phe Cys Phe Leu Ser Ala Trp Ile Leu Ile Phe Asp Tyr 300 305 310	1145
atg ttt ttg ctg acc ttc tac tct gct gtc ctt gct atc aag ttt gag Met Phe Leu Leu Thr Phe Tyr Ser Ala Val Leu Ala Ile Lys Phe Glu 315 320 325	1193
atc aat cac att aag cga aac cga atg atc cag gat gct ctc aag gag Ile Asn His Ile Lys Arg Asn Arg Met Ile Gln Asp Ala Leu Lys Glu 330 335 340 345	1241
gat ggt gta tct gct gct gtt gcc gag aag gta gcc gac tct tct ccc Asp Gly Val Ser Ala Ala Val Ala Glu Lys Val Ala Asp Ser Ser Pro 350 355 360	1289
gac gcc aag ctc gac cga aag tcc gac gtt tct ctt ttt gga gcc tct Asp Ala Lys Leu Asp Arg Lys Ser Asp Val Ser Leu Phe Gly Ala Ser 365 370 375	1337
ggc gcc att gcg gtg ttc aag atc ttc atg gtc ctt ggg ttc ctt ggt Gly Ala Ile Ala Val Phe Lys Ile Phe Met Val Leu Gly Phe Leu Gly 380 385 390	1385
ctc aac ctc atc aac ctg act gcc atc cct cac ctt ggc aag gcg gcc Leu Asn Leu Ile Asn Leu Thr Ala Ile Pro His Leu Gly Lys Ala Ala 395 400 405	1433
gcc gct gcc cag tct gtg act ccc atc acc ctc tcc ccc gag ctt ctc Ala Ala Ala Gln Ser Val Thr Pro Ile Thr Leu Ser Pro Glu Leu Leu 410 415 420 425	1481
cat gcc atc ccc gcc tct gtg ccc gtt gtt gtc acc ttt gtg ccc agc His Ala Ile Pro Ala Ser Val Pro Val Val Val Thr Phe Val Pro Ser 430 435 440	1529
gtt gtg tac gag cac tcc cag ctc att ctg cag ctg gag gac gcc ctc Val Val Tyr Glu His Ser Gln Leu Ile Leu Gln Leu Glu Asp Ala Leu 445 450 455	1577
act acc ttc ctg gct gcc tgc tcc aaa act att ggt gac ccc gtc atc Thr Thr Phe Leu Ala Ala Cys Ser Lys Thr Ile Gly Asp Pro Val Ile 460 465 470	1625

ES 2 886 026 T3

tcc aag tac atc ttc ctg tgc ctg atg gtc tcc acc gcc ctg aac gtc Ser Lys Tyr Ile Phe Leu Cys Leu Met Val Ser Thr Ala Leu Asn Val 475 480 485	1673
tac ctg ttt gga gcc acc cga gaa gtt gtg cga acc cag tct gtg aag Tyr Leu Phe Gly Ala Thr Arg Glu Val Val Arg Thr Gln Ser Val Lys 490 495 500 505	1721
gtg gtt gag aag cac gtt cct atc gtc att gag aag ccc agc gag aag Val Val Glu Lys His Val Pro Ile Val Ile Glu Lys Pro Ser Glu Lys 510 515 520	1769
gag gag gac acc tct tct gaa gac tcc att gag ctg act gtc gga aag Glu Glu Asp Thr Ser Ser Glu Asp Ser Ile Glu Leu Thr Val Gly Lys 525 530 535	1817
cag ccc aag ccc gtg acc gag acc cgt tct ctg gac gac cta gag gct Gln Pro Lys Pro Val Thr Glu Thr Arg Ser Leu Asp Asp Leu Glu Ala 540 545 550	1865
atc atg aag gca ggt aag acc aag ctt ctg gag gac cac gag gtt gtc Ile Met Lys Ala Gly Lys Thr Lys Leu Leu Glu Asp His Glu Val Val 555 560 565	1913
aag ctc tct ctc gag ggc aag ctt cct ttg tat gct ctt gag aag cag Lys Leu Ser Leu Glu Gly Lys Leu Pro Leu Tyr Ala Leu Glu Lys Gln 570 575 580 585	1961
ctt ggt gac aac acc cga gct gtt ggc atc cga cga tct atc atc tcc Leu Gly Asp Asn Thr Arg Ala Val Gly Ile Arg Arg Ser Ile Ile Ser 590 595 600	2009
cag cag tct aat acc aag act tta gag acc tca aag ctt cct tac ctg Gln Gln Ser Asn Thr Lys Thr Leu Glu Thr Ser Lys Leu Pro Tyr Leu 605 610 615	2057
cac tac gac tac gac cgt gtt ttt gga gcc tgt tgc gag aac gtt att His Tyr Asp Tyr Arg Val Phe Gly Ala Cys Cys Glu Asn Val Ile 620 625 630	2105
ggt tac atg cct ctc ccc gtt ggt gtt gct ggc ccc atg aac att gat Gly Tyr Met Pro Leu Pro Val Gly Val Ala Gly Pro Met Asn Ile Asp 635 640 645	2153
ggc aag aac tac cac att cct atg gcc acc act gag ggt tgt ctt gtt Gly Lys Asn Tyr His Ile Pro Met Ala Thr Thr Glu Gly Cys Leu Val 650 655 660 665	2201
gcc tca acc atg cga ggt tgc aag gcc atc aac gcc ggt ggc ggt gtt Ala Ser Thr Met Arg Gly Cys Lys Ala Ile Asn Ala Gly Gly Gly Val 670 675 680	2249
acc act gtg ctt act cag gac ggt atg aca cga ggt cct tgt gtt tcc Thr Thr Val Leu Thr Gln Asp Gly Met Thr Arg Gly Pro Cys Val Ser 685 690 695	2297
ttc ccc tct ctc aag cgg gct gga gcc gct aag atc tgg ctt gat tcc Phe Pro Ser Leu Lys Arg Ala Gly Ala Ala Lys Ile Trp Leu Asp Ser 700 705 710	2345
gag gag ggt ctc aag tcc atg cga aag gcc ttc aac tcc acc tct cga Glu Glu Gly Leu Lys Ser Met Arg Lys Ala Phe Asn Ser Thr Ser Arg	2393

ES 2 886 026 T3

715	720	725	
ttt gct cgt ctc cag tct ctt cac tct acc ctt gct ggt aac ctg ctg Phe Ala Arg Leu Gln Ser Leu His Ser Thr Leu Ala Gly Asn Leu Leu 730 735 740 745			2441
ttt att cga ttc cga acc acc act ggt gat gcc atg ggc atg aac atg Phe Ile Arg Phe Arg Thr Thr Thr Gly Asp Ala Met Gly Met Asn Met 750 755 760			2489
atc tcc aag ggc gtc gaa cac tct ctg gcc gtc atg gtc aag gag tac Ile Ser Lys Pro Gly Val Glu His Ser Leu Ala Val Met Val Lys Glu Tyr 765 770 775			2537
ggc ttc cct gat atg gac att gtg tct gtc tcg ggt aac tac tgc act Gly Phe Pro Asp Met Asp Ile Val Ser Val Ser Gly Asn Tyr Cys Thr 780 785 790			2585
gac aag aag ccc gca gcg atc aac tgg atc gaa ggc cga ggc aag agt Asp Lys Lys Pro Ala Ala Ile Asn Trp Ile Glu Gly Arg Gly Lys Ser 795 800 805			2633
gtt gtt gcc gaa gcc acc atc cct gct cac att gtc aag tct gtt ctc Val Val Ala Glu Ala Thr Ile Pro Ala His Ile Val Lys Ser Val Leu 810 815 820 825			2681
aaa agt gag gtt gac gct ctt gtt gag ctc aac atc agc aag aat ctg Lys Ser Glu Val Asp Ala Leu Val Glu Leu Asn Ile Ser Lys Asn Leu 830 835 840			2729
atc ggt agt gcc atg gct ggc tct gtg gga ggt ttc aat gca cac gcc Ile Gly Ser Met Ala Gly Ser Val Gly Gly Phe Asn Ala His Ala 845 850 855			2777
gca aac ctg gtg acc gcc atc tac ctt gcc act ggc cag gat cct gct Ala Asn Leu Val Thr Ala Ile Tyr Leu Ala Thr Gly Gln Asp Pro Ala 860 865 870			2825
cag aat gtc gag tct tcc aac tgc atc acg ctg atg agc aac gtc gac Gln Asn Val Glu Ser Ser Asn Cys Ile Thr Leu Met Ser Asn Val Asp 875 880 885			2873
ggt aac ctg ctc atc tcc gtt tcc atg cct tct atc gag gtc ggt acc Gly Asn Leu Leu Ile Ser Val Ser Met Pro Ser Ile Glu Val Gly Thr 890 895 900 905			2921
att ggt gga ggt act att ttg gag ccc cag ggg gct atg ctg gag atg Ile Gly Gly Gly Thr Ile Leu Glu Pro Gln Gly Ala Met Leu Glu Met 910 915 920			2969
ctt ggc gtg cga ggt cct cac atc gag acc ccc ggt gcc aac gcc caa Leu Gly Val Arg Gly Pro His Ile Glu Thr Pro Gly Ala Asn Ala Gln 925 930 935			3017
cag ctt gct cgc atc att gct tct gga gtt ctt gca gcg gag ctt tcg Gln Leu Ala Arg Ile Ile Ala Ser Gly Val Leu Ala Ala Glu Leu Ser 940 945 950			3065
ctg tgt tct gct ctt gct gcc ggc cat ctt gtg caa agt cat atg acc Leu Cys Ser Ala Leu Ala Ala Gly His Leu Val Gln Ser His Met Thr 955 960 965			3113
cac aac cgg tcc cag gct cct act ccg gcc aag cag tct cag gcc gat			3161

ES 2 886 026 T3

His	Asn	Arg	Ser	Gln	Ala	Pro	Thr	Pro	Ala	Lys	Gln	Ser	Gln	Ala	Asp	
970					975					980					985	
ctg	cag	cgt	cta	caa	aac	ggt	tcg	aat	att	tgc	ata	cgg	tca	tag		3206
Leu	Gln	Arg	Leu	Gln	Asn	Gly	Ser	Asn	Ile	Cys	Ile	Arg	Ser			
				990					995							
gcatgcaagc	tttaagcagt	ttgttttagca	aaatatat	ttt	aacgagtttg	atagaggcgc										3266
tggactacat	cattactgaa	tcacgcgtac	atgtctcagc	tcaaattgta	tcacggtttc											3326
ttttagtagcaa	tggaggggga	gagttgacaa	ggcattagag	aagagagcga	gaggagaaga											3386
caagtggata	gacgactgca	atcatatgat	ctgcacaaac	tgcgatgttt	tcctgtcaga											3446
tcatgttctt	ttgctcatag	ttaagctatc	gtgactttac	ggatccagga	ggacgagaag											3506
gtcaacaagg	gtgaggcctg	gagagagttc	tacaagggtc	cccgggatcg	gctgtacaga											3566
actggagatc	caggcagaca	aggtataggg	cggcgccctac	aatccatgcc	aacccgttcc											3626
atgtgctcgc	cgagggcgga	taaatcgccg	tgacgatcag	cggtccagtg	atcgaagtta											3686
ggctggtaag	agccgcgagc	gacccctgaa	gctgtccctg	atggctcgtca	tctacctgcc											3746
tggacagcat	ggcctgcaac	gcgggcatcc	cgatgccgcc	ggaagcgaga	agaatcataa											3806
tggggaaggc	catccagcct	cgcgtcgcga	acgccagcaa	gacgtagccc	agcgcgtcgg											3866
ccgccatgcc	ggcgataatg	gcctgcttct	cgccgaaacg	tttgggtggcg	ggaccagtga											3926
cgaaggcttg	agcgagggcg	tgcaagattc	cgaataccgc	aagcgacagg	ccgatcatcg											3986
tcgcgctcca	gcgaaagcgg	tcctcgccga	aaatgaccca	gagcgctgcc	ggcacctgtc											4046
ctacgagttg	catgataaag	aagacagtca	taagtgcggc	gacgatagtc	atgccccgcg											4106
cccaccggaa	ggagctgact	gggttgaagg	ctctcaaggg	catcggtcga	cgctctccct											4166
tatgcgactc	ctgcattagg	aagcagccca	gtagaattct	ggtggtattg	tgactgggga											4226
tgtagttgag	aataagtcac	acacaagtca	gctttcttca	agcctcatat	aagtataagt											4286
agttcaatcg	tattagctac	ttgtacccag	catctccgta	tcgagaaaca	caacaacatg											4346
ccccattgga	cagatcatgc	ggatacacag	gttgtgcagt	atcatacata	ctcgatcaga											4406
caggtcgtct	gaccatcata	caagctgaac	aagcgctcca	tacttgcaag	ctctctatat											4466
acacagttaa	atgacatata	catagtctaa	cctctaacag	ttaatcttct	ggtaagcctc											4526
ccagccagcc	ttctggatat	gcttggcctc	ctcaatagga	tctcggttct	ggccgtacag											4586
acctcggccg	acaattatga	tatccgttcc	ggtagacatg	acatcctcaa	cagttcggta											4646
ctgctgtccg	agagcgtctc	ccttgctcgtc	aagacccacc	ccgggggtca	gaataagcca											4706
gtcctcagag	tcgcccttag	gtcggttctg	ggcaatgaag	ccaaccacaa	actcggggtc											4766
ggatcgggca	agctcaatgg	tctgcttgga	gtactcgcca	gtggccagag	agcccttgca											4826
agacagctcg	gccagcatga	gcagacctct	ggccagcttc	tcgttgggag	aggggaccag											4886

ES 2 886 026 T3

gaactccttg tactgggagt tctcgtagtc agagacgtcc tccttcttct gttcagagac	4946
agtttcctcg gcaccagctc gcaggccagc aatgattccg gttccgggta caccgtgggc	5006
gttggtgata tccgaccact cggcgattcg gtagacaccg ttcttgtact ggtgcttgac	5066
agtgttgcca atatctgcga actttctgtc ctogaacagg aagaaaccgt gcttaagagc	5126
aagttccttg agggggagca cagtgcgggc gtaggtgaag tcgtcaatga tgtcgatatg	5186
ggtcttgatc atgcacacat aaggcccgac cttatccgca agctcaatga gctccttggt	5246
ggtggttaaca tccagagaag cacacaggtt ggttttcttg gctgccacga gcttgagcac	5306
tcgagcggca aaggcggact tgtggacgtt agctcgagct tcgtaggagg gcattttggt	5366
ggtgaagagg agactgaaat aaatttagtc tgcagaactt tttatcggaa ccttatctgg	5426
ggcagtgaag tatatgttat ggtaatagtt acgagttagt tgaacttata gatagactgg	5486
actatacggc tatcgggtcca aattagaaa aacgtcaatg gctctctggg cgtcgccttt	5546
gccgacaaaa atgtgatcat gatgaaagcc agcaatgacg ttgcagctga tattgttgtc	5606
ggccaaccgc gccgaaaacg cagctgtcag acccacagcc tccaacgaag aatgtatcgt	5666
caaagtgatc caagcacact catagttgga ttcgtactcc aaaggcggca atgacgagtc	5726
agacaggagg cagacaaggt ataggcgggc gcctacaatc catgccaaac cgttccatgt	5786
gctcgcggag gcggcataaa tcgccgtgac gatcagcggg ccagtgatcg aagttaggct	5846
ggtaagagcc gcgagcgatc cttgaagctg tccttgatgg tcgtcatcta cctgcctgga	5906
cagcatggcc tgcaacgcgg gcatcccgat gccgccgga gcgagaagaa tcataatggg	5966
gaaggccatc cagcctcgcg tcgcgaacgc cagcaagacg tagcccagcg cgtcggccgc	6026
catgcggcg ataatggcct gcttctcgcc gaaacgtttg gtggcgggac cagtgcgaa	6086
ggcttgagcg agggcggtgca agattccgaa taccgcaagc gacaggccga tcatcgtcgc	6146
gctccagcga aagcggctct cgccgaaaat gaccagagc gctgccggca cctgtcctac	6206
gagttgcatg ataaagaaga cagtcataag tgcggcgacg atagtcatgc cccgcgcccc	6266
ccggaaggag ctgactgggt tgaaggctct caagggcacg ggtcgacgct ctcccttatg	6326
cgactcctgc attaggaagc agcccagtag atccccggga attcactggc cgtcgtttta	6386
caacgtcgtg actgggaaaa ccctggcggt acccaactta atcgccttgc agcacatccc	6446
cctttcgcca gctggcgtaa tagcgaagag gcccgacccg atcgcccttc ccaacagttg	6506
cgcagcctga atggcgaatg gcgcctgatg cggatatttc tccttacgca tctgtgcggt	6566
atttcacacc gcataatggtg cactctcagt acaatctgct ctgatgccgc atagttaagc	6626
cagccccgac acccgccaac acccgctgac gcgccctgac gggcttgtct gctcccggca	6686
tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag gttttcacgc	6746
tcatcaccga aacgcgcgag acgaaagggc ctogtgatac gcctattttt ataggttaat	6806

ES 2 886 026 T3

gtcatgataa	taatggtttc	ttagacgtca	ggtggcactt	ttcggggaaa	tgtgcgcgga	6866
acccctattt	gtttattttt	ctaaatacat	tcaaatatgt	atccgctcat	gagacaataa	6926
ccctgataaa	tgcttcaata	atattgaaaa	aggaagagta	tgagtattca	acatttccgt	6986
gtcgccctta	ttcccttttt	tgcggcattt	tgccttcctg	tttttgctca	cccagaaacg	7046
ctggtgaaag	taaaagatgc	tgaagatcag	ttgggtgcac	gagtgggtta	catcgaactg	7106
gatctcaaca	gcggtaaagt	ccttgagagt	tttcgccccg	aagaacgttt	tccaatgatg	7166
agcactttta	aagttctgct	atgtggcgcg	gtattatccc	gtattgacgc	cgggcaagag	7226
caactcggtc	gccgcataca	ctattctcag	aatgacttgg	ttgagtactc	accagtcaca	7286
gaaaagcatc	ttacggatgg	catgacagta	agagaattat	gcagtgctgc	cataaccatg	7346
agtgataaca	ctcgggccaa	cttacttctg	acaacgatcg	gaggaccgaa	ggagctaacc	7406
gcttttttgc	acaacatggg	ggatcatgta	actcgccttg	atcgttggga	accggagctg	7466
aatgaagcca	taccaaacga	cgagcgtgac	accacgatgc	ctgtagcaat	ggcaacaacg	7526
ttgcgcaaac	tattaactgg	cgaactactt	actctagctt	cccggcaaca	attaatagac	7586
tggatggagg	cggataaagt	tgcaggacca	cttctgcgct	cggcccttcc	ggctggctgg	7646
tttattgctg	ataaatctgg	agcccgtag	cgtgggtctc	gcggtatcat	tgcagcactg	7706
gggccagatg	gtaagccctc	ccgtatcgta	gttatctaca	cgacggggag	tcaggcaact	7766
atggatgaac	gaaatagaca	gatcgctgag	ataggtgcct	cactgattaa	gcattggtaa	7826
ctgtcagacc	aagtttactc	atatatactt	tagattgatt	taaaacttca	tttttaattt	7886
aaaaggatct	aggtgaagat	cctttttgat	aatctcatga	ccaaaatccc	ttaacgtgag	7946
ttttcgttcc	actgagcgtc	agaccccgta	gaaaagatca	aaggatcttc	ttgagatcct	8006
ttttttctgc	gcgtaatctg	ctgcttgcaa	acaaaaaaac	caccgctacc	agcggtggtt	8066
tgtttgccgg	atcaagagct	accaactctt	tttccgaagg	taactggctt	cagcagagcg	8126
cagataccaa	atactgtcct	tctagtgtag	ccgtagttag	gccaccactt	caagaactct	8186
gtagcacccg	ctacatacct	cgctctgcta	atcctgttac	cagtggctgc	tgccagtggc	8246
gataagtcgt	gtcttaccgg	gttggactca	agacgatagt	taccggataa	ggcgcagcgg	8306
tcgggctgaa	cgggggggtc	gtgcacacag	cccagcttgg	agcgaacgac	ctacaccgaa	8366
ctgagatacc	tacagcgtga	gctatgagaa	agcgccacgc	ttcccgaagg	gagaaaggcg	8426
gacaggtatc	cggtaagcgg	cagggtcgga	acaggagagc	gcacgaggga	gcttccaggg	8486
ggaaacgcct	ggtatcttta	tagtcctgtc	gggtttcgcc	acctctgact	tgagcgtcga	8546
tttttgatgat	gctcgtcagg	ggggcgagac	ctatggaaaa	acgccagcaa	cgcggccttt	8606
ttacggttcc	tggccttttg	ctggcctttt	gctcacatgt	tctttcctgc	gttatccctt	8666

ES 2 886 026 T3

gattctgtgg	ataaccgtat	taccgccttt	gagtgagctg	ataccgctcg	ccgcagccga	8726
acgaccgagc	gcagcgagtc	agtgagcgag	gaagcggaag	agcgcccaat	acgcaaaccg	8786
cctctccccg	cgcgttggcc	gattcattaa	tgcagctggc	acgacaggtt	tcccgaactg	8846
aaagcgggca	gtgagcgcaa	cgcaattaat	gtgagttagc	tcactcatta	ggcaccaccg	8906
gctttacact	ttatgcttcc	ggctcgtatg	ttgtgtggaa	ttgtgagcgg	ataacaattt	8966
cacacaggaa	acagctatga	ccatgattac	gccaaagctt	catgggatct	ctagagtcga	9026
cgggccccgt	acccccacag	ttctcactca	gatcatggag	actctaacct	tgagacatca	9086
attatcagct	ctcgaggata	atgttagtgc	agttccagga	ctcattgtgc	aactgtcacc	9146
acggcatttt	gggtctgttc	ttttgaagta	cagaaatata	ctcattgttg	gtatactttg	9206
ggactttttc	ttgttacaga	agaataaaaa	aacctcgact	gatgtactaa	ttacatggtt	9266
aacatcccca	aggtcaaagt	acagatattg	taccgacttc	tgaaatttgt	gggatccaca	9326
cacggacctc	tgcatgata	caatatcatg	gttccatggt	ctcttgaata	acaccactca	9386
ataataaaca	ccagctcttt	caatccaact	tagctttctt	ccacttgaac	ataggccatc	9446
cccccttctt	tctattttac	ataaatagca	agatccttac	ccctacatgt	ctcataacac	9506
aatctcaact	tgacttccca	taagaagttc	actaccctaa	ggactctggc	agtatttact	9566
gctctcgtgg	cggccgcacc	tgctcctgca	cctaagttcg	tcaaaatcgg	ttttactcag	9626
agaatcaaca	accctaccaa	ctgtacatac	tgctaaccct	gattccttga	ataaccccaa	9686
taaggctcct	gctgaccctt	ctgccgttct	aggaaaccag	cttggttgagt	acgctgtgaa	9746
catcactctt	ggtatacccg	gtcagccctt	ctcagttcag	attgacacag	gctcgtctga	9806
cttgtgggtg	aagagtgcag	gctcctccgg	tgcattcaac	aagaaggctt	cttctacttt	9866
tcaggaggac	gttcccaacg	gctttgcaat	tgcccacgga	gacaaaacct	ctgccattgg	9926
agattgggtc	aaagatacca	tcaatatcgg	tggtgttagt	attgaccagt	atagtattga	9986
ccagtatgag	ttcgccatgg	ctactcagac	aaatactgac	ccggtttttg	gtatcgggta	10046
cccagagcaac	gaggcgtctt	atgggtaccc	attccccaca	gtaaccatct	atattgcaaa	10106
acaatacgac	tgcaattggg	gattgttgct	cgtatcgcac	ccgtaccgtg	ccaccgtaac	10166
accccccaga	caccaatcac	tacgaccgat	ccaactccac	gtttctgcta	cccagtctgc	10226
tggccggcct	ggctttgcgt	ttcgctccca	cactacaccg	taataccacg	tcactctcat	10286
tgcaggttac	cctgcccgtg	gtcgctcgat	ccacctcctc	cttctctcgt	gtgtgcagca	10346
aagaggcaga	gatggagccc	gtatggtgag	ccgtagagtg	gagcgagggg	cgatcttaca	10406
acggctgtcg	gcggatataa	acggtatatt	cacaattgca	ccccagccag	accgatagcc	10466
ggtcgcaatc	cgccacccac	aaccgtctac	ctcccacaga	accccgtcac	ttccaccctt	10526
ttccaccaga	tcatatgtcc	caacttgcca	aattaaaacc	gtgcgaattt	tcaaaataaa	10586
ctttggcaaa	gaggctgcaa	aggaggggct	ggtgagggcg	tctggaagtc	gaccagagac	10646
cgggttggcg	gcgcatttgt	gtccccaaaa	acagcccaaa	ttgcccgaat	tgaccccaaa	10706
ttgaccacgt	agcggggcca	accccggcga	gagccccctt	ctcccacat	atcaaacctc	10766
ccccggttcc	cacacttgcc	gttaagggcg	taggggtactg	cagtctggaa	tctacgcttg	10826
ttcagacttt	gta					10839

<210> 6

5

<211> 999

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Construcción Sintética

<400> 6

Met Leu Gln Ala Ala Ile Gly Lys Ile Val Gly Phe Ala Val Asn Arg
 1 5 10 15

Pro Ile His Thr Val Val Leu Thr Ser Ile Val Ala Ser Thr Ala Tyr
 20 25 30

Leu Ala Ile Leu Asp Ile Ala Ile Pro Gly Phe Glu Gly Thr Gln Pro
 35 40 45

Ile Ser Tyr Tyr His Pro Ala Ala Lys Ser Tyr Asp Asn Pro Ala Asp
 50 55 60

Trp Thr His Ile Ala Glu Ala Asp Ile Pro Ser Asp Ala Tyr Arg Leu
 65 70 75 80

Ala Phe Ala Gln Ile Arg Val Ser Asp Val Gln Gly Gly Glu Ala Pro
 85 90 95

Thr Ile Pro Gly Ala Val Ala Val Ser Asp Leu Asp His Arg Ile Val
 100 105 110

Met Asp Tyr Lys Gln Trp Ala Pro Trp Thr Ala Ser Asn Glu Gln Ile
 115 120 125

Ala Ser Glu Asn His Ile Trp Lys His Ser Phe Lys Asp His Val Ala
 130 135 140

Phe Ser Trp Ile Lys Trp Phe Arg Trp Ala Tyr Leu Arg Leu Ser Thr
 145 150 155 160

Leu Ile Gln Gly Ala Asp Asn Phe Asp Ile Ala Val Val Ala Leu Gly

ES 2 886 026 T3

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

ES 2 886 026 T3

Pro Ile Thr Leu Ser Pro Glu Leu Leu His Ala Ile Pro Ala Ser Val
 420 425 430

Pro Val Val Val Thr Phe Val Pro Ser Val Val Tyr Glu His Ser Gln
 435 440 445

Leu Ile Leu Gln Leu Glu Asp Ala Leu Thr Thr Phe Leu Ala Ala Cys
 450 455 460

Ser Lys Thr Ile Gly Asp Pro Val Ile Ser Lys Tyr Ile Phe Leu Cys
 465 470 475 480

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

Glu Val Val Arg Thr Gln Ser Val Lys Val Val Glu Lys His Val Pro
 500 505 510

Ile Val Ile Glu Lys Pro Ser Glu Lys Glu Glu Asp Thr Ser Ser Glu
 515 520 525

Asp Ser Ile Glu Leu Thr Val Gly Lys Gln Pro Lys Pro Val Thr Glu
 530 535 540

Thr Arg Ser Leu Asp Asp Leu Glu Ala Ile Met Lys Ala Gly Lys Thr
 545 550 555 560

Lys Leu Leu Glu Asp His Glu Val Val Lys Leu Ser Leu Glu Gly Lys
 565 570 575

Leu Pro Leu Tyr Ala Leu Glu Lys Gln Leu Gly Asp Asn Thr Arg Ala
 580 585 590

Val Gly Ile Arg Arg Ser Ile Ile Ser Gln Gln Ser Asn Thr Lys Thr
 595 600 605

Leu Glu Thr Ser Lys Leu Pro Tyr Leu His Tyr Asp Tyr Asp Arg Val
 610 615 620

Phe Gly Ala Cys Cys Glu Asn Val Ile Gly Tyr Met Pro Leu Pro Val
 625 630 635 640

Gly Val Ala Gly Pro Met Asn Ile Asp Gly Lys Asn Tyr His Ile Pro
 645 650 655

Met Ala Thr Thr Glu Gly Cys Leu Val Ala Ser Thr Met Arg Gly Cys
 660 665 670

ES 2 886 026 T3

Lys Ala Ile Asn Ala Gly Gly Gly Val Thr Thr Val Leu Thr Gln Asp
 675 680 685
 Gly Met Thr Arg Gly Pro Cys Val Ser Phe Pro Ser Leu Lys Arg Ala
 690 695 700
 Gly Ala Ala Lys Ile Trp Leu Asp Ser Glu Glu Gly Leu Lys Ser Met
 705 710 715 720
 Arg Lys Ala Phe Asn Ser Thr Ser Arg Phe Ala Arg Leu Gln Ser Leu
 725 730 735
 His Ser Thr Leu Ala Gly Asn Leu Leu Phe Ile Arg Phe Arg Thr Thr
 740 745 750
 Thr Gly Asp Ala Met Gly Met Asn Met Ile Ser Lys Gly Val Glu His
 755 760 765
 Ser Leu Ala Val Met Val Lys Glu Tyr Gly Phe Pro Asp Met Asp Ile
 770 775 780
 Val Ser Val Ser Gly Asn Tyr Cys Thr Asp Lys Lys Pro Ala Ala Ile
 785 790 795 800
 Asn Trp Ile Glu Gly Arg Gly Lys Ser Val Val Ala Glu Ala Thr Ile
 805 810 815
 Pro Ala His Ile Val Lys Ser Val Leu Lys Ser Glu Val Asp Ala Leu
 820 825 830
 Val Glu Leu Asn Ile Ser Lys Asn Leu Ile Gly Ser Ala Met Ala Gly
 835 840 845
 Ser Val Gly Gly Phe Asn Ala His Ala Ala Asn Leu Val Thr Ala Ile
 850 855 860
 Tyr Leu Ala Thr Gly Gln Asp Pro Ala Gln Asn Val Glu Ser Ser Asn
 865 870 875 880
 Cys Ile Thr Leu Met Ser Asn Val Asp Gly Asn Leu Leu Ile Ser Val
 885 890 895
 Ser Met Pro Ser Ile Glu Val Gly Thr Ile Gly Gly Gly Thr Ile Leu
 900 905 910
 Glu Pro Gln Gly Ala Met Leu Glu Met Leu Gly Val Arg Gly Pro His
 915 920 925

ES 2 886 026 T3

Ile Glu Thr Pro Gly Ala Asn Ala Gln Gln Leu Ala Arg Ile Ile Ala
930 935 940

Ser Gly Val Leu Ala Ala Glu Leu Ser Leu Cys Ser Ala Leu Ala Ala
945 950 955 960

Gly His Leu Val Gln Ser His Met Thr His Asn Arg Ser Gln Ala Pro
965 970 975

Thr Pro Ala Lys Gln Ser Gln Ala Asp Leu Gln Arg Leu Gln Asn Gly
980 985 990

Ser Asn Ile Cys Ile Arg Ser
995

<210> 7

<211> 20

<212> ADN

5 <213> Yarrowia lipolytica

<400> 7

tccagaagcg ctacaaagag 20

<210> 8

<211> 38

10 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cebador

<400> 8

15 attaccctgt tatccctatg aaggttgcag tcgtatgc 38

<210> 9

<211> 38

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> cebador

<400> 9

tagggataac agggtaattg cgatctcgat gagtgatg 38

<210> 10

25 <211> 20

<212> ADN

<213> Yarrowia lipolytica

<400> 10

gcccagaaga ttggaatgac 20

30 <210> 11

<211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> cebador

<400> 11

atataccgcg ggattccgcc aagtgagact g 31

<210> 12

<211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 5 <223> cebador
 <400> 12
 attacctgt tatccctacg tcgaggaagt aggtcatc 38
 <210> 13
 <211> 38
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 13
 15 tagggataac agggtaatgc gagcttgatg aggaatag 38
 <210> 14
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> cebador
 <400> 14
 atataccgcg gcctgacgcc aatttgaaga g 31
 <210> 15
 25 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 30 <400> 15
 atataccgcg gctgggctgt tcggtcgata g 31
 <210> 16
 <211> 38
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 16
 tagggataac agggtaatag gacgcacaac gccatcac 38
 40 <210> 17
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> cebador
 <400> 17
 attacctgt tatccctacg ctcccattgg aaacta 36
 <210> 18
 <211> 31

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 5 <400> 18
 atataccgcg gtctcttcgc tgtggtctag g 31
 <210> 19
 <211> 31
 <212> ADN
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 19
 atataccgcg gtccaccggt ctccttcata c 31
 15 <210> 20
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> cebador
 <400> 20
 tagggataac agggtaatat gtctctaggg tcgaagtc 38
 <210> 21
 <211> 38
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 21
 30 attaccctgt tatccctatg gcaagcctca ctactacg 38
 <210> 22
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> cebador
 <400> 22
 atataccgcg gtgcggcgga actactgtat c 31
 <210> 23
 40 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 45 <400> 23
 atataccgcg ggggattctc cgggttattt g 31
 <210> 24
 <211> 38
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 24
 5 tagggataac agggtataac gtctcggacc ttgaattg 38
 <210> 25
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> cebador
 <400> 25
 attaccctgt tatccctacc ttcaacctgt ccgacttc 38
 <210> 26
 15 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 20 <400> 26
 atataccgcg ggaagcggtc ctggtgtat g 31
 <210> 27
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> Yarrowia lipolytica
 <400> 27
 gtgtagcaac tcggatacag 20
 <210> 28
 <211> 38
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 28
 35 tagggataac agggtaatgg tccataagca gagtggtc 38
 <210> 29
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> cebador
 <400> 29
 attaccctgt tatccctaac cctcgacctc cttattac 38
 <210> 30
 45 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Yarrowia lipolytica
 <400> 30
 ctcttcttga ctggcatagc 20
 50 <210> 31

<211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 5 <223> cebador
 <400> 31
 atataaagct tgcggctcgg cacgtgatct g 31
 <210> 32
 <211> 32
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 32
 15 atataggatc catcgtgcgt acgtcgctag tg 32
 <210> 33
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> cebador
 <400> 33
 atataggatc ccgaccggca cgatcaattg g 31
 <210> 34
 25 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 30 <400> 34
 atatacatat gggtgcatct cagcccgacc tc 32
 <210> 35
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Yarrowia lipolytica
 <400> 35
 tcccgaaaca cagaacttcc 20
 <210> 36
 <211> 32
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 36
 45 atataaagct tggcggacgt tccggcagac ag 32
 <210> 37
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> cebador
 <400> 37
 5 atataggatc cctcccaggc atctccacac tc 32
 <210> 38
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> cebador
 <400> 38
 atataggatc ccacttacag gcttagcaag g 31
 <210> 39
 <211> 32
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 39
 20 atatagcggc cgcggaaatc acgcttgatt cg 32
 <210> 40
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Yarrowia lipolytica
 25 <400> 40
 taggcgctgg tacagaagag 20
 <210> 41
 <211> 31
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 41
 35 atataaagct tgagtacagt aggtggtact c 31
 <210> 42
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> cebador
 <400> 42
 atataggatc cagtgggtgt ggtgggtgta g 31
 <210> 43
 <211> 31
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 43
 50 atataggatc ctttacgtgc aacaggagga g 31

<210> 44
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> cebador
 <400> 44
 atatacatat ggcctgtctt gaggctcttg g 31
 <210> 45
 10 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Yarrowia lipolytica
 <400> 45
 agggctgtag ataacgagtc 20
 15 <210> 46
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <223> cebador
 <400> 46
 atataaagct tcacgtggct gctgggcca cc 32
 <210> 47
 <211> 31
 25 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 47
 30 atataggatc ccgcacggta tcggagcatc g 31
 <210> 48
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> cebador
 <400> 48
 atataggatc ccgcggctat tgacgctgag g 31
 <210> 49
 40 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 45 <400> 49
 atatacatat gcccgtcagc tccatcgacg agtg 34
 <210> 50
 <211> 23
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 50
 5 aggtgtactg tagccaccct gac 23
 <210> 51
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> cebador
 <400> 51
 atataaagct tccggccagc cgctggcaac g 31
 <210> 52
 15 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 20 <400> 52
 atataggatc cacacgacag ctgcacctga c 31
 <210> 53
 <211> 31
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 53
 atataggatc ccagccatga gccaggcatt g 31
 30 <210> 54
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 35 <223> cebador
 <400> 54
 atatacatat gggcgccagc cacattgcc ctc 33
 <210> 55
 <211> 20
 40 <212> ADN
 <213> Yarrowia lipolytica
 <400> 55
 agcgatacag cagttgactc 20
 <210> 56
 45 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Yarrowia lipolytica
 <400> 56
 tcagccgtct actttagag 20
 50 <210> 57

<211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 5 <223> cebador
 <400> 57
 atataggatc cgtggctcgg atactcctga c 31
 <210> 58
 <211> 31
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 58
 15 atataggatc cagccggagg tcagatcaag c 31
 <210> 59
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> cebador
 <400> 59
 atatacatat ggcgcaatag ttcgccggcc tg 32
 <210> 60
 25 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Yarrowia lipolytica
 <400> 60
 ctcgtgttgt gcctttcttg 20
 30 <210> 61
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 35 <223> cebador
 <400> 61
 atataaagct tgcgcgacaa cccatagcga tggc 34
 <210> 62
 <211> 31
 40 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 62
 45 atataggatc cgataagagg gcgctctgac c 31
 <210> 63
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> cebador
 <400> 63
 5 atataggatc cggcgtgaca tcgagtttgg 30
 <210> 64
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 10 <223> cebador
 <400> 64
 atatacatat gctacgtctc gccgcagagg g 31
 <210> 65
 <211> 20
 15 <212> ADN
 <213> Yarrowia lipolytica
 <400> 65
 agcgagaggt tatacgaag 20
 <210> 66
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Yarrowia lipolytica
 <400> 66
 ctctacagc ctctcaagac 20
 25 <210> 67
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Yarrowia lipolytica
 <400> 67
 30 gtctacaaga cagcccagag 20
 <210> 68
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Yarrowia lipolytica
 35 <400> 68
 ccgcttgaga agagcaatac 20
 <210> 69
 <211> 31
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 69
 45 atataaagct tcgccacctg tccacgtctc g 31
 <210> 70
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 50 <223> cebador

<400> 70
 atataggatc cgcgaagcga cgtgtggtga g 31
 <210> 71
 <211> 31
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 71
 10 atataggatc cgctgagcac gcgagtacac c 31
 <210> 72
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> cebador
 <400> 72
 atatagaatt cgatctgtcg tacaactaag g 31
 <210> 73
 20 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Yarrowia lipolytica
 <400> 73
 25 cagaagttac gacccaagg 20
 <210> 74
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> cebador
 <400> 74
 atataaagct tccgtaataa atgcccgctc c 31
 <210> 75
 <211> 31
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 75
 40 atataggatc caggtcgatt tcggcgctgt g 31
 <210> 76
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> cebador
 <400> 76
 atataggatc cggtaggca aatagctaata g 31
 <210> 77
 50 <211> 31

<212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 5 <400> 77
 atatagaatt cgcttgagc gagtttctga g 31
 <210> 78
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> Yarrowia lipolytica
 <400> 78
 tcgcaagggc catagaggtg 20
 <210> 79
 <211> 31
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 79
 20 atataaagct tccttgaca tctccgatga c 31
 <210> 80
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> cebador
 <400> 80
 atataggatc cgggtttacg ccaccacgtt g 31
 <210> 81
 30 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 35 <400> 81
 atataggatc cgggacctgc gatacgaatg c 31
 <210> 82
 <211> 31
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 82
 45 atatagaatt cgcttgcgca gccggtgat c 31
 <210> 83
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Yarrowia lipolytica
 <400> 83

5 ggcgttggtg agctatcacc 20
 <210> 84
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 84
 10 atataaagct tgcgtgcggt gcgtgcgtat g 31
 <210> 85
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <223> cebador
 <400> 85
 atataggatc ccagcaccac gaaattatac g 31
 <210> 86
 <211> 31
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 86
 25 atataggatc cgtgcgctta catgtggacc g 31
 <210> 87
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <223> cebador
 <400> 87
 atatagaatt ccaggcagct tcttgccaat g 31
 <210> 88
 35 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Yarrowia lipolytica
 <400> 88
 gagataggag gttccatac 20
 40 <210> 89
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Yarrowia lipolytica
 <400> 89
 45 ctacgcttgt tcagacttg 20
 <210> 90
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 50 <220>

<223> cebador
 <400> 90
 gtgtgcttgt cgtcagacat ttggaatgat tcttatactc agaagg 46
 <210> 91
 5 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 10 <400> 91
 ccttctgagt ataagaatca ttcaaatgt ctgacgacaa gcacac 46
 <210> 92
 <211> 26
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 92
 gcatgcttag attcgaggtc ggagat 26
 20 <210> 93
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 25 <223> cebador
 <400> 93
 ggtaccacgc acggatagtt tatcca 26
 <210> 94
 <211> 31
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 94
 35 ggtacccaaa gtcaactaat gtcaagtaaa g 31
 <210> 95
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Yarrowia lipolytica
 40 <400> 95
 cctccaacgt gactttc 17
 <210> 96
 <211> 17
 <212> ADN
 45 <213> Yarrowia lipolytica
 <400> 96
 agagacctcc cacaag 17
 <210> 97
 <211> 46
 50 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> cebador
 <400> 97
 5 agagagtcga gtagagccat ttggaatgat tcttatactc agaagg 46
 <210> 98
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> cebador
 <400> 98
 ccttctgagt ataagaatca ttcaaatgg ctctactcga ctctct 46
 <210> 99
 15 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Yarrowia lipolytica
 <400> 99
 atatagcatg cctaccacac atcttctctgg tagac 35
 20 <210> 100
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Yarrowia lipolytica
 <400> 100
 25 ctcaagatac ggcattgg 18
 <210> 101
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Yarrowia lipolytica
 30 <400> 101
 tccttggcta gacgaatg 18
 1
 35

REIVINDICACIONES

1. Una cepa de levadura de la especie *Yarrowia lipolytica*, que presenta una reducción en la actividad de Fao1p, codificada por el gen *FAO1*: *YAL/OB14014g*, en donde la cepa de levadura presenta también una reducción de las actividades de los genes de acil-CoA-oxidasas *POX1*, *POX2*, *POX3*, *POX4*, *POX5* y *POX6*, en donde las actividades de las proteínas Fao1p, *POX1*, *POX2*, *POX3*, *POX4*, *POX5* y *POX6* se reducen mediante
 - (i) delección parcial o completa de los genes codificantes para Fao1p, *POX1*, *POX2*, *POX3*, *POX4*, *POX5* y *POX6* o
 - (ii) expresión de genes no funcionales para Fao1p, *POX1*, *POX2*, *POX3*, *POX4*, *POX5* y *POX6* o
 - (iii) inhibición o reducción de la actividad de los genes expresados para Fao1p, *POX1*, *POX2*, *POX3*, *POX4*, *POX5* y *POX6* por inserción, sustitución o mutación puntual en el gen que codifica la proteína.
2. Cepa de levadura según la reivindicación 1, **caracterizada por que** los genes para Fao1p *POX1*, *POX2*, *POX3*, *POX4*, *POX5* y *POX6* han sido suprimidos.
3. Cepa de levadura según una de las reivindicaciones 1 o 2, **caracterizada por que** los genes para las alcohol graso-deshidrogenasas *FADH*, *ADH1*, *ADH2*, *ADH3*, *ADH4*, *ADH5*, *ADH6* y/o *ADH7* han sido suprimidos.
4. Cepa de levadura según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizada por que** están incrementadas adicionalmente las actividades de los distintos o de todos los productos génicos del citocromo P450 *ALK1*, *ALK2*, *ALK3*, *ALK4*, *ALK5*, *ALK6*, *ALK7*, *ALK8*, *ALK9*, *ALK10*, *ALK11* y/o *ALK12* por célula, en donde la actividad incrementada de las proteínas tiene lugar a través de
 - (i) incorporación del gen del producto génico del citocromo P450 en múltiples, preferiblemente de 8 a 12 copias, en el genoma del organismo o
 - (ii) intercambio del promotor natural del gen del producto génico del citocromo P450 por un promotor más fuerte que el natural, preferiblemente un promotor que posea al menos el 50% de la actividad del promotor del gen alfa del factor de elongación de la traducción 1 *TEF1*, lo más preferiblemente un promotor que posea al menos la actividad del promotor *TEF1*.
5. Cepa de levadura según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizada por que** están incrementada adicionalmente la actividad de la NADPH-citocromo P450-reductasa *CPR1*, en donde la actividad incrementada de la NADPH-citocromo P450-reductasa tiene lugar a través de
 - (i) incorporación del gen de la NADPH-citocromo P450-reductasa *CPR1* en múltiples, preferiblemente de 8 a 12 copias, en el genoma del organismo o
 - (ii) intercambio del promotor natural del gen de la NADPH-citocromo P450-reductasa *CPR1* por un promotor más fuerte que el natural, preferiblemente un promotor que posea al menos el 50% de la actividad del promotor del gen alfa del factor de elongación de la traducción 1 *TEF1*, lo más preferiblemente un promotor que posea al menos la actividad del promotor *TEF1*.
6. Cepa de levadura según una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizada por que** están incrementada adicionalmente la actividad de la ácido fosfatídico-defosfohidrolasa *PAH1*, en donde la actividad de la ácido fosfatídico-defosfohidrolasa *PAH1* se reduce a través de
 - (i) la inhibición o reducción de la expresión de los genes codificantes de la ácido fosfatídico-defosfohidrolasa *PAH1* o
 - (ii) la delección parcial o completa de los genes codificantes de la ácido fosfatídico-defosfohidrolasa *PAH1* o
 - (iii) la expresión de genes no funcionales de la ácido fosfatídico-defosfohidrolasa *PAH1* o
 - (iv) la inhibición o reducción de la actividad de los genes expresados de la ácido fosfatídico-defosfohidrolasa *PAH1*.
7. Cepa de levadura según una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizada por que** está reducida adicionalmente la actividad de la glicerol-3-fosfato-aciltransferasa *SCT1*, en donde la actividad de la glicerol-3-fosfato-aciltransferasa *SCT1* se reduce a través de
 - (i) la inhibición o reducción de la expresión de los genes codificantes de la glicerol-3-fosfato-aciltransferasa *SCT1* o
 - (ii) la delección parcial o completa de los genes codificantes de la ácido glicerol-3-fosfato-aciltransferasa *SCT1* o
 - (iii) la expresión de genes no funcionales de la glicerol-3-fosfato-aciltransferasa *SCT1* o

(iv) la inhibición o reducción de la expresión de los genes codificantes de la glicerol-3-fosfato-aciltransferasa SCT1.

8. Procedimiento para la producción biocatalítica de ω -hidroxiácidos grasos a partir de un sustrato hidrófobo, que comprende las siguientes etapas:

a) proporcionar células de levadura de al menos una cepa de levadura de la especie *Y. lipolytica*, según una de las reivindicaciones 1 a 7

en un medio de cultivo adecuado,

b) poner en contacto las células de levadura con el sustrato hidrófobo, en donde el sustrato hidrófobo se hace reaccionar con al menos una de las enzimas de las células de levadura seleccionadas del grupo

(i) productos génicos del citocromo P450,

(ii) NADPH-citocromo P450-reductasa,

(iii) aldehído graso-deshidrogenasas

para dar el producto de reacción ω -hidroxiácido graso,

c) aislamiento del ω -hidroxiácido graso.

9. Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado por que la reacción para dar el producto de reacción ω -hidroxiácido graso tiene lugar adicionalmente con alcohol graso-oxidasas remanentes, alcohol graso-deshidrogenasas.

10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 8 o 9, **caracterizado por que** el sustrato hidrófobo se elige del grupo de los *n*-alcanos de estructura general: $\text{H}_3\text{C}-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$, de los alquenos de la estructura general $\text{H}_3\text{C}-(\text{C}_n\text{H}_{2n-2})-\text{CH}_3$, $\text{H}_3\text{C}-(\text{C}_n\text{H}_{2n-4})-\text{CH}_3$ o $\text{H}_3\text{C}-(\text{C}_n\text{H}_{2n-6})-\text{CH}_3$, ácidos grasos de la estructura general: $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$, $\text{HOOC}-(\text{C}_n\text{H}_{2n-2})-\text{CH}_3$, $\text{HOOC}-(\text{C}_n\text{H}_{2n-4})-\text{CH}_3$ o $\text{HOOC}-(\text{C}_n\text{H}_{2n-6})-\text{CH}_3$, y ésteres alquílicos de ácidos grasos de la estructura general: $\text{ROOC}-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$, con *n* en el intervalo de 6 a 18.

11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 8 a 10 precedentes, **caracterizado por que** adicionalmente al sustrato hidrófobo, se utiliza glucosa como fuente de carbono.

12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 8 a 10 precedentes, **caracterizado por que** el sustrato hidrófobo es un *n*-alcano, un alqueno o un ácido graso con *n* en el intervalo de 8 a 18.

13. Kit para la producción biocatalítica de ácidos dicarboxílicos u ω -hidroxiácidos grasos que contiene:

- al menos un tipo de células de levadura de la cepa de levadura de la especie *Yarrowia lipolytica* según una de las reivindicaciones 1 a 7 en un componente acuoso y/o

- al menos un tipo de células de levadura criopreservadas de la cepa de levadura de la especie *Yarrowia lipolytica* según una de las reivindicaciones 1 a 7.

14. Uso de una cepa de levadura según una de las reivindicaciones 1 a 7, un procedimiento según una de las reivindicaciones 8 a 12 o un kit según la reivindicación 13 para la producción microbiana de ω -hidroxiácidos grasos según la estructura general: $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_n-\text{OH}$, $\text{HOOC}-(\text{C}_n\text{H}_{2n-2})-\text{CH}_2\text{OH}$, $\text{HOOC}-(\text{C}_n\text{H}_{2n-4})-\text{CH}_2\text{OH}$ o $\text{HOOC}-(\text{C}_n\text{H}_{2n-6})-\text{CH}_2\text{OH}$, con *n* en el intervalo de 6 a 18, a partir de un sustrato hidrófobo.

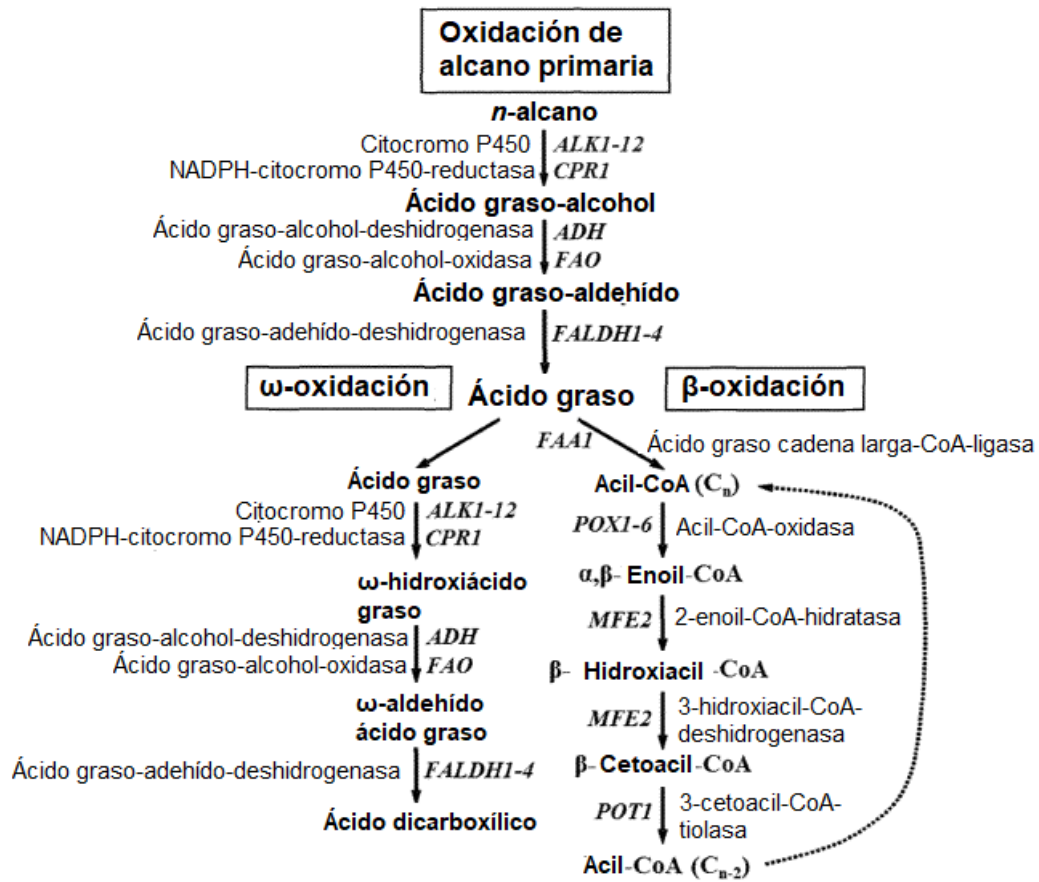


Fig. 1

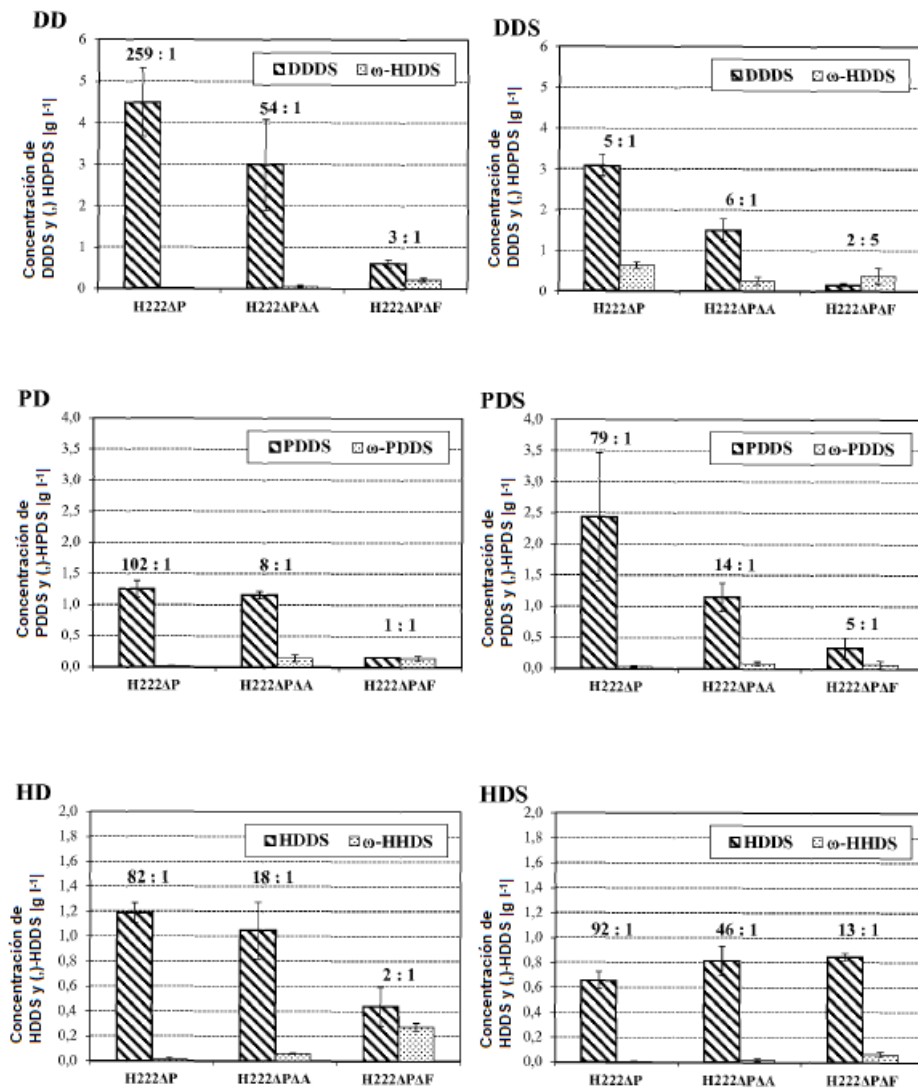


Fig. 2

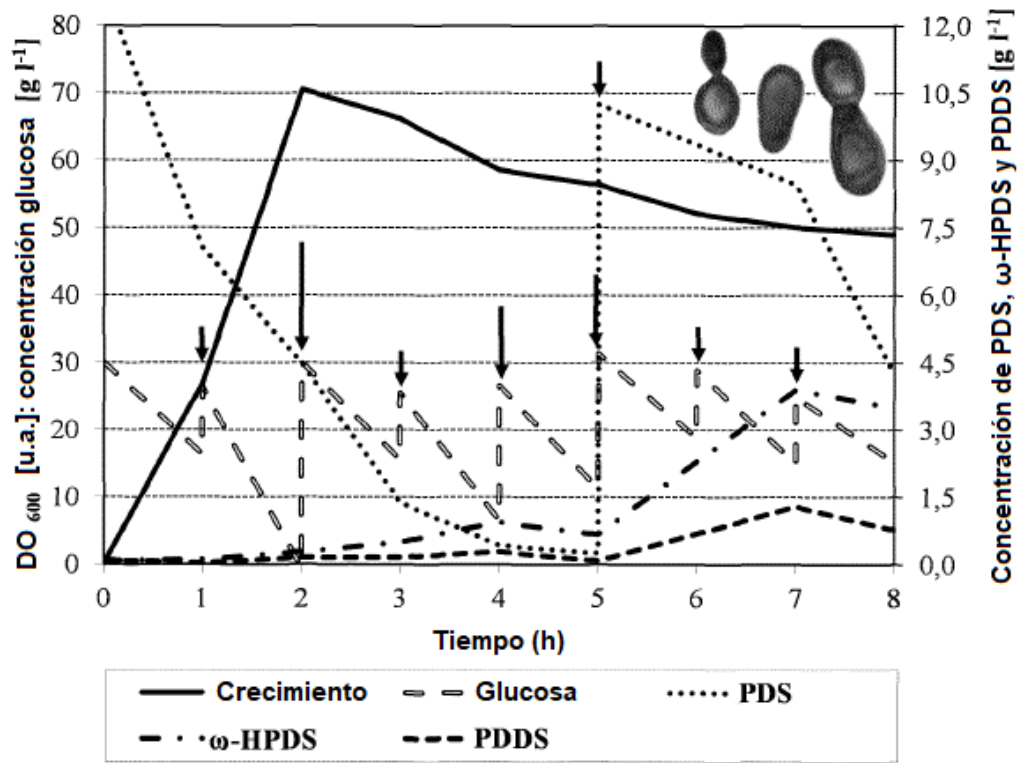


Fig. 3

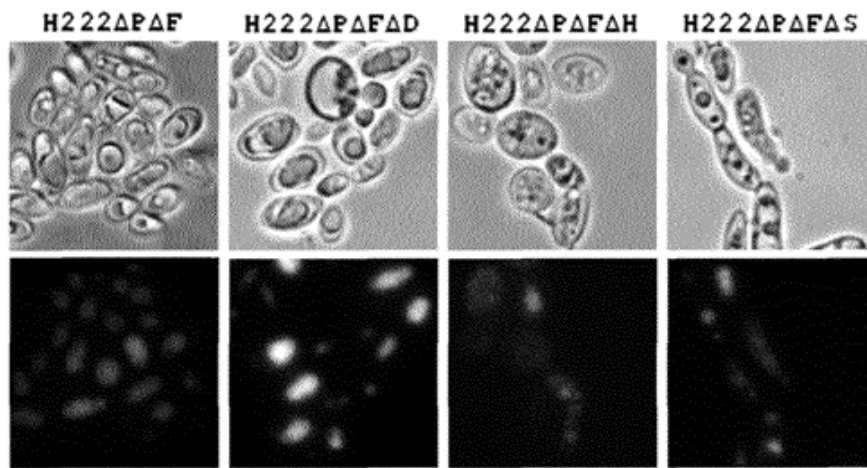
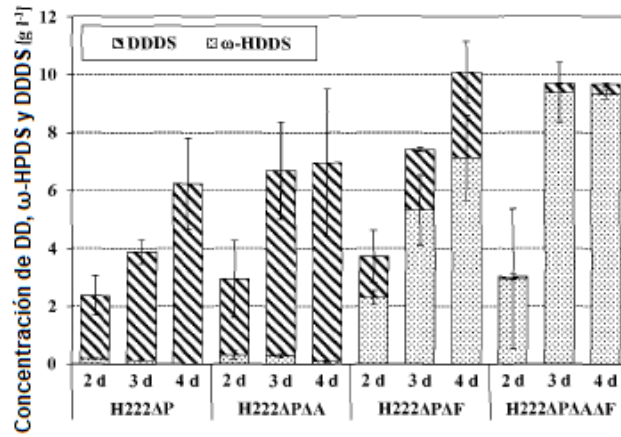
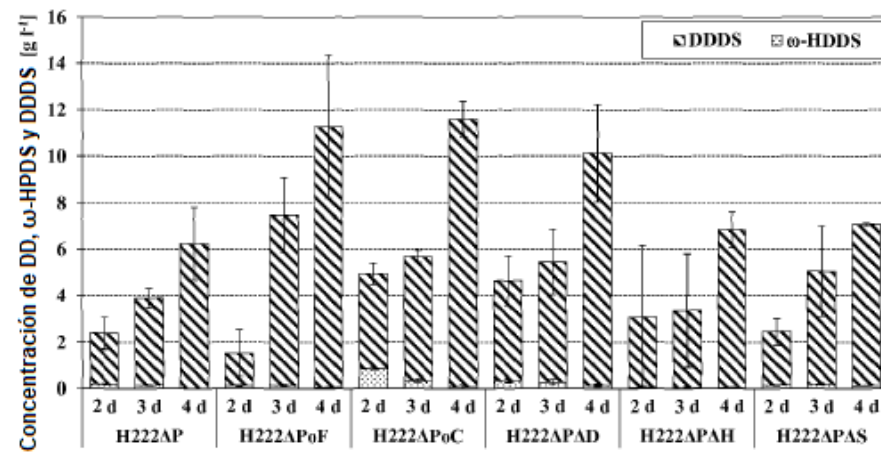


Fig. 4

A



B



C

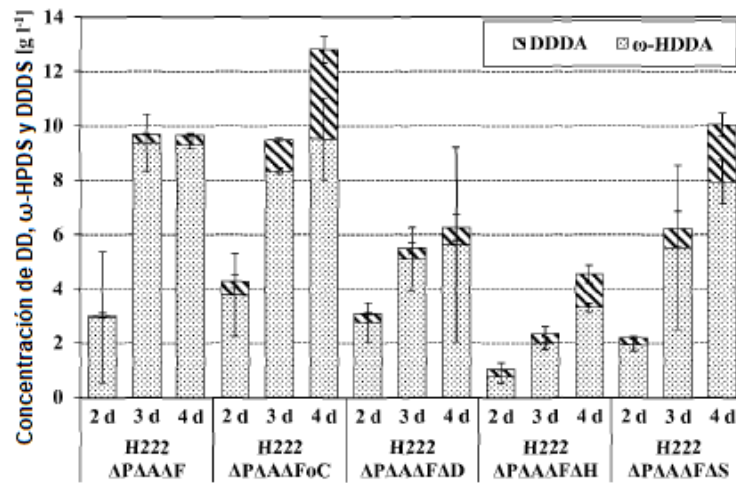


Fig. 5

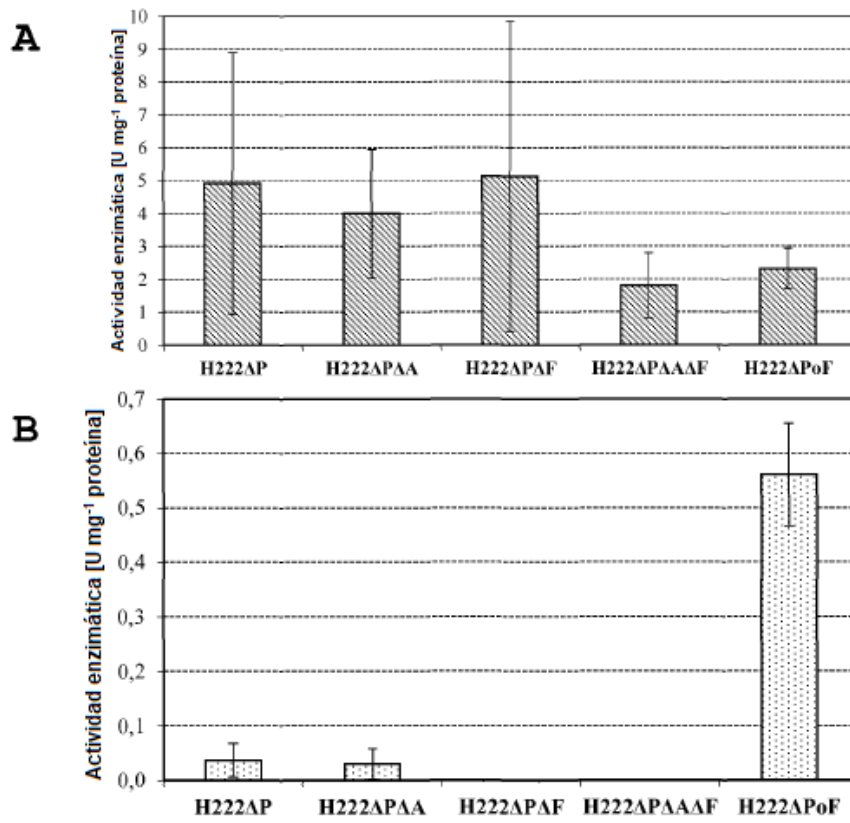


Fig. 6

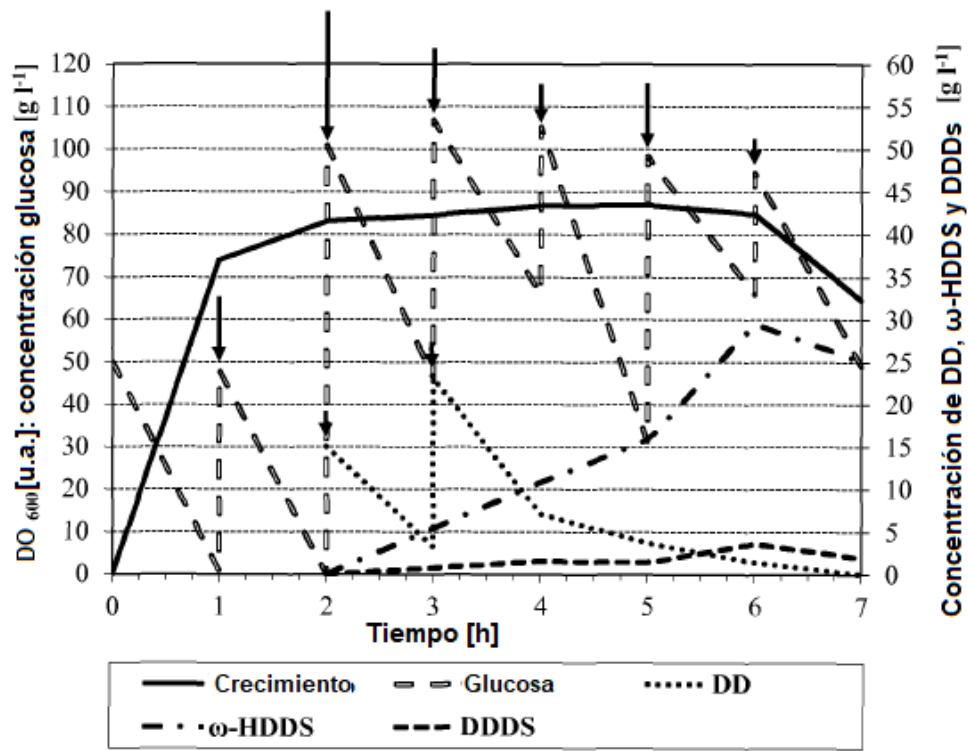


Fig. 7