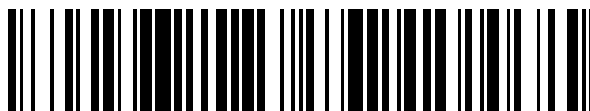


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 363**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/82** (2006.01)  
**C12P 7/64** (2006.01)  
**C12N 5/10** (2006.01)  
**C12N 15/53** (2006.01)  
**C12N 9/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05715463 .5**  
96 Fecha de presentación: **23.02.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1720988**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.11.2006**

54 Título: **MÉTODO PARA LA PREPARACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS OMEGA-3 INSATURADOS EN ORGANISMOS TRANSGÉNICOS.**

30 Prioridad:  
**27.02.2004 DE 102004009458**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**29.02.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**29.02.2012**

73 Titular/es:  
**BASF PLANT SCIENCE GMBH  
LUDWIGSHAFEN 67056, DE**

72 Inventor/es:  
**CIRPUS, Petra;  
BAUER, Jörg;  
ZANK, Thorsten y  
HEINZ, Ernst**

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 375 363 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

Método para la preparación de ácidos grasos omega-3 insaturados en organismos transgénicos

- 5 La presente divulgación se refiere a un método para producir ácidos grasos  $\omega$ -3 insaturados así como a un método para producir triglicéridos con un alto contenido de ácidos grasos insaturados, particularmente de ácidos grasos  $\omega$ -3 con más de tres enlaces dobles. La divulgación se refiere a la producción de un organismo transgénico, preferiblemente de una planta transgénica o de un microorganismo transgénico con contenido elevado de ácidos grasos  $\omega$ -3 insaturados, aceites o lípidos con enlaces dobles  $\omega$ -3 debido a la expresión de una desaturasa  $\omega$ -3 a partir de hongos de la familia Pythiaceae, como de la especie Phytophthora, por ejemplo del género y de la especie Phytophthora infestans.
- 10 La divulgación se refiere además a las secuencias de ácido nucleico, constructos de ácido nucleico, vectores y organismos que contienen al menos una secuencia de ácido nucleico según la invención, al menos un vector que contiene la secuencia de ácido nucleico y/o los constructos de ácido nucleico, así como organismos transgénicos que contienen las secuencias de ácido nucleico previamente mencionadas, constructos de ácido nucleico y/o vectores.
- 15 Ácidos grasos y triacilglicéridos tienen una gran cantidad de aplicaciones en la industria de productos alimenticios, en la alimentación de animales, la cosmetología y en el área farmacéutica. Dependiendo de si se trata de ácidos grasos saturados e insaturados o de triacilglicéridos con un contenido elevada de ácidos grasos saturados o insaturados, éstos son adecuados para las más diversas aplicaciones.
- 20 Ácidos grasos  $\omega$ -3 poliinsaturados de cadena larga, como el ácido eicosapentaenoico (= EPA, C20:5 <sup>$\Delta$ 5,8,11,14,17</sup>) o el ácido docosahexaenoico (= DHA, C22:6 <sup>$\Delta$ 4,7,10,13,16,19</sup>) son componentes importantes de la alimentación humana debido a sus diferentes roles en la salud que comprenden aspectos tales como el desarrollo del cerebro infantil, la funcionalidad de los ojos, la síntesis de hormonas y de otras sustancias de señal, así como la prevención de desórdenes cardio-vasculares, cáncer y diabetes. (Poulos, A Lipids 30:1-14, 1995; Horrocks, LA y Yeo YK Pharmacol Res 40: 211-225, 1999). Por esta razón existe la necesidad de producir ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga.
- 25 Debido a la composición usual hoy día de la alimentación humana, es importante una adición a la alimentación de ácidos grasos  $\omega$ -3 poliinsaturados que provienen preferiblemente de aceites de pez. De esta manera, por ejemplo, se adicionan ácidos grasos poliinsaturados como DHA o EPA a los alimentos para bebé con el fin de elevar el valor nutritivo. Al ácido graso insaturado DHA se atribuye en tal caso un efecto positivo sobre el desarrollo y mantenimiento de funciones cerebrales.
- 30 En lo sucesivo, se designan ácidos grasos poliinsaturados como PUFA, PUFAs, LCPUFA o LCPUFAs (poly unsaturated fatty acids, PUFA, ácidos grasos poliinsaturados; long chain poly unsaturated fatty acids, LCPUFA, ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga).
- 35 Los diversos ácidos grasos y triglicéridos se obtienen principalmente a partir de microorganismos como Mortierella o Schizochytrium o de vegetales que producen aceite como soja, colza, algas tales como Cryptocodinium o Phaeodactylum y otros, en cuyo caso se producen por lo regular en forma de sus triacilglicéridos (= triglicéridos = triglicérols). Sin embargo, también pueden producirse de animales como, por ejemplo, peces. Los ácidos grasos libres se producen ventajosamente por saponificación. Ácidos grasos poliinsaturados de cadena muy larga, como DHA, EPA, ácido araquidónico (= ARA, C20:4 <sup>$\Delta$ 5,8,11,14</sup>), ácido dihomo- $\gamma$ -linolénico (C20:3 <sup>$\Delta$ 8,11,14</sup>) o ácido docosapentaenoico (DPA, C22:5 <sup>$\Delta$ 7,10,13,18,18</sup>) no se sintetizan en vegetales como, por ejemplo, plantas oleaginosas
- 40 como colza, soja, girasol, cártamo. Las fuentes naturales para estos ácidos grasos son peces como arenque, salmón, sardina, gallineta nórdica, anguila, carpa, trucha, rodabulla, caballa, lucio o atún o son algas.
- 45 Según el propósito de aplicación se prefieren aceites con ácidos grasos saturados o insaturados. De esta manera, en la alimentación humana se prefieren, por ejemplo, lípidos con ácidos grasos insaturados, especialmente ácidos grasos poliinsaturados. A los ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ -3 se atribuye un efecto positivo para el nivel de colesterol en la sangre y de esta manera para la posibilidad de prevenir una enfermedad cardíaca. Adicionando estos ácidos grasos  $\omega$ -3 a los alimentos puede reducirse ostensible el riesgo de una enfermedad cardíaca, de una apoplejía o de hipertensión. También los procesos inflamatorios, especialmente inflamatorios crónicos en el marco de las enfermedades inmunológicas, como artritis reumatoide pueden verse afectados positivamente por los ácidos grasos  $\omega$ -3. Por esto se adicionan a los alimentos, especialmente a los alimentos dietéticos o encuentran aplicación
- 50 en medicamentos. Los ácidos grasos  $\omega$ -6, como el ácido araquidónico, tienen en el caso de estas patologías reumáticas más bien un efecto negativo sobre estas enfermedades debido a la composición usual de nuestros alimentos.

Los ácidos grasos  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6 son precursores de hormonas de tejido, de las llamadas eicosanoides como de las prostaglandinas, las cuales se derivan del ácido dihomo- $\gamma$ -linolénico, del ácido araquidónico y del ácido

eicosapentaenoico, de los tromoxanos y leucotrienos que se derivan del ácido araquidónico y del ácido eicosapentaenoico. Los eicosanoides (llamados serie PG<sub>2</sub>), que se forman a partir de ácidos grasos ω-6, por lo regular promueven reacciones inflamatorias, mientras que los eicosanoides (llamados serie PG<sub>3</sub>) de los ácidos grasos ω-3 tienen un pequeño efecto promotor de inflamación, o ninguno. Por esto a los alimentos con un alto contenido de ácido graso ω-3 se atribuye un efecto positivo sobre la salud humana.

Debido a sus propiedades positivas no han faltado intentos en el pasado de poner a disposición genes que intervienen en la síntesis de ácidos grasos o de triglicéridos para la producción de aceites en diferentes organismos con contenido modificado de ácidos grasos insaturados. De esta manera, en WO 91/13972 y en su equivalente estadounidense se describe una desaturasa Δ<sup>-9</sup>. En WO 93/11245 se reivindica una desaturasa Δ<sup>-15</sup>, en WO 94/11516 se reivindica una desaturasa Δ<sup>-12</sup>. Otras desaturasas se describen, por ejemplo, en EP-A-0 550 162, WO 94/18337, WO 97/30582, WO 97/21340, WO 95/18222, EP-A-0 794 250, Stuckey et al., J. Biol. Chem., 265. 1990: 20144-20149, Wada et al., Nature 347, 1990: 200-203 o Huang et al., Lipids 34, 1999: 649-659. Sin embargo, la caracterización bioquímica de las diferentes desaturasas hasta ahora se ha efectuado de manera insuficiente puesto que las enzimas como proteínas enlazadas a la membrana solo pueden aislarse y caracterizarse muy difícilmente (McKeon et al., Methods in Enzymol. 71, 1981: 12141-12147, Wang et al., Plant Physiol. Biochem., 26, 1988: 777-792). Por lo regular, la caracterización de las membranas enlazadas con la membrana se efectúa introduciéndolas a un organismo adecuado cuya actividad enzimática se investiga después por medio de análisis de materiales de partida y de productos. Las desaturasas Δ<sup>-6</sup> se describen en WO 93/06712, US 5,614,393, US 5,614,393, WO 96/21022, WO 00121557 y WO 99/27111 y la aplicación para la producción en organismos transgénicos también se describe en WO 98/46763 WO 98/46764, WO 98/46765. En tal caso, la expresión de diversas desaturasas y la formación de ácidos grasos poliinsaturados también se describen y se reivindican en WO 99/64616 o WO 98/46776. Respecto de la efectividad de la expresión de las desaturasas y de su efecto en la formación de ácidos grasos poliinsaturados ha de anotarse que mediante expresión de una desaturasa individual como se ha descrito hasta ahora solo se han logrado contenidos bajos de ácidos grasos insaturados / lípidos como, por ejemplo, ácido γ-linolénico y ácido estearidónico. Además, por lo regular se obtienen mezclas de ácidos grasos ω-3 y ω-6.

Microorganismos particularmente adecuados para la producción de PUFAs son microorganismos como microalgas, tales como *Phaeodactylum tricornutum*, especies de *Porphyridium*, especies de *Thraustochytrien*, especies de *Schizochytrien* o especie de *Crypthecodinium*, ciliados como *Stilonychia* o *Colpidium*, hongos como *Mortierella*, *Entomophthora* o *Mucor* y/o musgos tales como *Physcomitrella*, *Ceratodon* y *Marchantia* (R. Vazhappilly & F. Chen (1998) *Botanica Marina* 41: 553-558; K. Totani & K Oba (1987) *Lipids* 22: 1060-1062; M. Akimoto et al. (1998) *Appl. Biochemistry and Biotechnology* 73: 269-278). Mediante selección de cepas se ha desarrollado una cantidad de cepas mutantes de los microorganismos correspondientes, los cuales producen una serie de compuestos valiosos, incluidos PUFAs. La mutación y selección de cepas con producción mejorada de una molécula determinada, como los ácidos grasos poliinsaturados, es sin embargo un proceso difícil que quita mucho tiempo. Por esto se prefieren métodos de ingeniería genética como los descritos arriba, siempre que sea posible. Sin embargo, con ayuda de los microorganismos previamente mencionados solo pueden producirse cantidades limitadas de los ácidos grasos poliinsaturados deseado como DPA, EPA o ARA. En tal caso, por lo regular, según el microorganismo usado, se producen mezclas de ácido graso de, por ejemplo, EPA, DPA y ARA. Para la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados como el ácido araquidónico, ácido eicosapentaenoico y ácido docosahexaenoico se discuten diversas vías de síntesis (Fig. 1). De esta manera, la producción de EPA o DHA se efectúa en numerosas bacterias marinas como *Vibrio* sp. o *Shewanella* sp. según la vía de poliuretido (Yu, R. et al. *Lipids* 35:1061-1064, 2000; Takeyama, H. et al. *Microbiology* 143:2725-2731,1197)).

Una estrategia alternativa es la actividad cambiante de las desaturasas y elongasas (Zank, T.K et al. *Plant Journal* 31:255-268, 2002; Sakuradani, E. et al. *Gene* 238:445-453, 1999). Una modificación de la vía descrita a través de la desaturasa Δ<sup>6</sup>, elongasa Δ<sup>6</sup>, desaturasa Δ<sup>5</sup>, elongasa Δ<sup>5</sup>, desaturasa Δ<sup>4</sup> es la vía de síntesis de Sprecher (Sprecher 2000, *Biochim. Biophys. Acta* 1486:219-231) en mamíferos. En lugar de la desaturación Δ<sup>4</sup> se efectúa aquí un paso más de elongación hasta C<sub>24</sub>, otra desaturación de Δ<sup>6</sup> y finalmente una β-oxidación en la longitud de cadena C<sub>22</sub>. Sin embargo, para la producción en plantas y en microorganismos la llamada vía de Sprecher no es adecuada (véase Figura 1) puesto que no se conocen los mecanismos de regulación.

Los ácidos grasos poliinsaturados pueden dividirse en dos grandes clases, en ácidos grasos ω-6 o ácidos grasos ω-3, que tienen actividades metabólicas y funcionales diferentes (Fig. 1).

Como producto de partida para la vía metabólica funge el ácido graso ácido linoléico ω-6 (18:2<sup>Δ9,12</sup>), mientras que la vía de ω-3 pasa por el ácido linolénico (18:3<sup>Δ9,12,15</sup>). En este caso se forma ácido linolénico por la actividad de una desaturasa ω-3 (Tocher et al. 1998, *Prog. Lipid Res.* 37, 73-117 ; Domergue et al. 2002, *Eur. J. Biochem.* 269, 4105-4113).

Los mamíferos, y con ellos tampoco el ser humano, no disponen de una actividad desaturasa correspondiente (desaturasa Δ<sup>-12</sup> y ω-3) y deben asimilar estos ácidos grasos (ácidos grasos esenciales) mediante la alimentación. Mediante la secuencia de reacciones de desaturasa y elongasa se sintetizan entonces a partir de estos precursores los ácidos grasos poliinsaturados fisiológicamente importantes: ácido araquidónico (= ARA, 20:4<sup>Δ5,5,11,14</sup>), un ácido

graso  $\omega$ -6 y los dos ácidos grasos  $\omega$ -3 ácido eicosapentaenoico (= EPA, 20:5<sup>Δ5,8,11,14,17</sup>) y ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6<sup>Δ4,7,10,13,17,19</sup>). La aplicación de ácidos grasos  $\omega$ -3 muestra en tal caso el efecto terapéutico como se describe arriba en el caso del tratamiento de enfermedades cardiovasculares (Shimikawa 2001, World Rev. Nutr. Diet. 88, 100-108), inflamaciones (Calder 2002, Proc. Nutr. Soc. 61, 345-358) y artritis (Cleland und James 2000, J. Rheumatol. 27, 2305-2307).

Desde un punto de vista de la fisiología nutricional es importante, por lo tanto, que en la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados se logre un desplazamiento entre la vía de síntesis  $\omega$ -6 y la vía de síntesis de  $\omega$ -3 (véase Figura 1), para que se produzcan más ácidos grasos  $\omega$ -3. En la literatura se han descrito las actividades enzimáticas de diferentes desaturasas  $\omega$ -3, los cuales desaturan ácidos grasos de C<sub>16:2</sub>, C<sub>22:4</sub> o C<sub>22:5</sub> (véase Figura 1). Sin embargo, ninguna de las desaturasas descritas convierte bioquímicamente un amplio espectro de la vía de síntesis de  $\omega$ -6 en los ácidos grasos correspondientes de la vía de síntesis de  $\omega$ -3.

Por lo tanto, también existe una gran demanda de una desaturasa  $\omega$ -3 que sea adecuada para la producción de ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ -3. Todas las desaturasas  $\omega$ -3 vegetales y cianobacterianas conocidas desaturan ácidos grasos de C<sub>18</sub> con ácido linoléico como sustrato, pero no desaturan ácidos grasos de C<sub>20</sub> o C<sub>22</sub>.

Del hongo *Saprolegnia diclina* se conoce una desaturasa  $\omega$ -3 (Pereira et al. 2003. Biochem. J. 2003 Dez, Manuskript BJ20031319), que puede desaturar ácidos grasos poliinsaturados de C<sub>20</sub>. Sin embargo es desventajoso que estas desaturasa  $\omega$ -3 no pueda desaturar PUFAs de C<sub>18</sub> o C<sub>22</sub>, tales como los importantes ácidos grasos de C<sub>16:2</sub>, C<sub>22:4</sub> o C<sub>22:5</sub> de la vía de síntesis de  $\omega$ -6. Otra desventaja de esta enzima es que no puede desaturar ácidos grasos que están enlazados a los fosfolípidos. Se convierten solo los ésteres de ácido graso – CoA.

WO03/064596 describe una desaturasa delta-17 de *Saprolegnia diclina* con especificidad de sustrato para ácidos grasos de C<sub>20</sub>. Los ácidos grasos de C<sub>22</sub> se desaturan solo a baja escala.

En la US2002/0170090 así como en la publicación científica Kang et al. (PNAS 2001, 98, 4050-4054) se divulga la fat1-desaturasa a partir de *C. elegans*. Esta establece, además de ácidos grasos de C<sub>20</sub> y C<sub>22</sub> particularmente ácidos grasos de C<sub>18</sub>  $\mu$ m.

La inscripción en el banco de datos EMBL, número de acceso BE777235 (véase también Kamoun et al., Fungal Genetics and Biology (1999), 28, 2, 94-106) divulga un clon EST de *Phytophthora infestans*. Sin embargo, en la publicación no hay indicación sobre la función del polipéptido correspondiente.

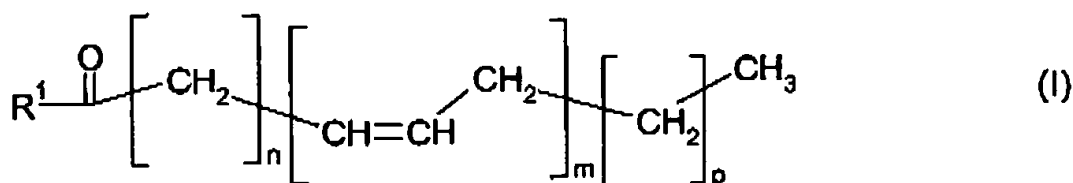
La inscripción del banco de datos BIOSIS (Chalova et al. Biokhimiya (1987), 52, 9.1445 a 1453) divulga que la *Phytophthora infestans* produce PUFAs en condiciones naturales. Sin embargo, no divulga cuáles enzimas intervienen en la producción de PUFAs.

Para hacer posible un enriquecimiento del alimento humano y de la comida para animales con estos ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ -3 existe por lo tanto una gran demanda de un proceso sencillo, económico, para producir estos ácidos grasos poliinsaturados especialmente sistemas eucariotas.

Por lo tanto, existía el objetivo de poner a disposición más genes o enzimas que fueran adecuados para la síntesis de LCPUFAs e hicieran posible un desplazamiento de la vía de síntesis de  $\omega$ -6 hacia la vía de síntesis de  $\omega$ -3, especialmente de genes que tuvieran una actividad desaturasa de  $\omega$ -3, para la producción de ácidos grasos poliinsaturados. Además existía el objetivo de desarrollar un método para producir ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ -3 en un organismo, ventajosamente en un organismo eucariota, preferible en una planta o en un microorganismo.

El objetivo se logró mediante el objeto de las reivindicaciones 1 a 17.

La invención se refiere a un método para la preparación de los compuestos de la fórmula general I

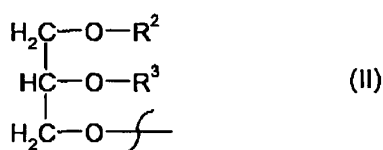


en organismos transgénicos con un contenido de al menos 1 % en peso de estos compuestos respecto del contenido total de lípidos del contenido transgénico, caracterizado porque comprende los siguientes pasos de proceso:

5 a) introducir un vector de expresión recombinante al organismo, el cual comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para una desaturasa  $\omega$ -3 que tiene una actividad de desaturasa  $\omega$ -3 frente a los ácidos grasos de  $C_{18}$ ,  $C_{20}$ , y  $C_{22}$ , en cuyo caso preferiblemente se desaturan ácidos grasos de  $C_{20}$ , y en cuyo caso aproximadamente de 1,5 a 3 % de los ácidos de  $C_{18}$  presentes en la fuente de ácidos grasos se convierten en los correspondientes ácidos grasos  $\omega$ -3

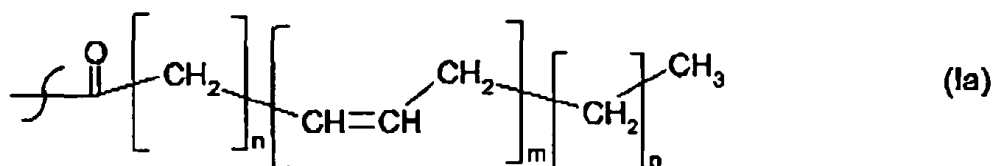
10 b) cultivar el organismo en condiciones que hacen posible la producción de los compuestos de la fórmula general I, en cuyo caso las variables y los sustituyentes en la fórmula I tienen el siguiente significado:

$R^1$  = hidroxilo, coenzima A (tioéster), liso-fosfatidilcolina, liso-fosfatidiletanolamina, liso-fosfatidilglicerol, liso-difosfatidilglicerol, liso-fosfatidilserina, liso-fosfatidilinositol, esfingobase, o un residuo de la fórmula general II



15  $R^2$  = hidrógeno, liso-fosfatidilcolina, liso-fosfatidiletanolamina, liso-fosfatidilglicerol, liso-difosfatidilglicerol, liso-fosfatidilserina, liso-fosfatidilinositol o alquilcarbonilo de  $C_2$ - $C_{24}$  saturado o insaturado,

$R^3$  = hidrógeno, alquilcarbonilo de  $C_2$ - $C_{24}$ , saturado o insaturado, o  $R^2$  o  $R^3$  significan independientemente entre sí un residuo de la fórmula general Ia:



$n = 2, 3, 4, 5, 6, 7$  o  $9$ ,  $m = 2, 3, 4, 5$  o  $6$ ,  $p = 0$  o  $3$ .

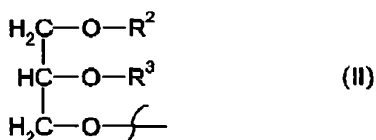
20 En cuyo caso la secuencia de ácido nucleico se selecciona del grupo:

i. de una secuencia de ácido nucleico con la secuencia representada en SEQ ID NO: 1.

ii. de secuencias de ácido nucleico que pueden derivarse de la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 2 como resultado del código genético degenerado, o

25 iii. Derivados de la secuencia de ácido nucleico representado en SEQ ID NO: 1, la cual codifica para polipéptidos con al menos 70 % de identidad por toda la región de secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 2, los cuales tienen una actividad de desaturasa  $\omega$ -3 frente a los ácidos grasos de  $C_{18}$ ,  $C_{20}$  y  $C_{22}$ , en cuyo caso se desaturan preferiblemente ácidos grasos de  $C_{20}$ , y en cuyo caso aproximadamente 1,5 a 3 % de los ácidos grasos de  $C_{18}$  presentes en la fuente de ácidos grasos se convierten en los correspondientes ácidos grasos  $\omega$ -3.

30  $R^1$  significa en la fórmula general 1 hidroxilo, coenzima A (tioéster), liso-fosfatidilcolina, liso-fosfatidiletanolamina, liso-fosfatidilglicerol, liso-difosfatidilglicerol, liso-fosfatidilserina, liso-fosfatidilinositol, esfingobase, o un residuo de la fórmula general II



Los residuos de R<sup>1</sup> mencionados arriba siempre están enlazados en forma de sus tioésteres a los compuestos de la fórmula general I.

R<sup>2</sup> significa en la fórmula general II hidrógeno, liso-fosfatidilcolina, liso-fosfatidiletanolamina, liso-fosfatidilglicerol, liso-difosfatidilglicerol, liso-fosfatidilserina, liso-fosfatidilinositol o alquilcarbonilo de C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub> saturado o insaturado.

5 Como residuos alquilo pueden mencionarse cadenas de alquilcarbonilo, saturado o insaturado, sustituido o no sustituido de C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub>, tales como etilcarbonilo, n-propilcarbonilo, n-butilcarbonilo, n-pentilcarbonilo, n-hexilcarbonilo, n-heptilcarbonilo, n-octilcarbonilo, n-nonilcarbonilo, n-decilcarbonilo, n-undecilcarbonilo, n-dodecilcarbonilo, n-tridecilcarbonilo, n-tetradecilcarbonilo, n-pentadecilcarbonilo, n-hexadecilcarbonilo, n-heptadecilcarbonilo, n-octadecilcarbonilo, n-nonadecilcarbonilo, n-eicosilcarbonilo, n-docosanilcarbonilo o n-tetracosanilcarbonilo, que  
10 contienen uno o más enlaces dobles. Se prefieren residuos de alquilcarbonilo de C<sub>10</sub> – C<sub>22</sub>, saturados o insaturados tales como n-decilcarbonilo, n-undecilcarbonilo, n-dodecilcarbonilo, n-tridecilcarbonilo, n-tetradecilcarbonilo, n-pentadecilcarbonilo, n-hexadecilcarbonilo, n-heptadecilcarbonilo, n-octadecilcarbonilo, n-nonadecilcarbonilo, n-eicosilcarbonilo, n-docosanilcarbonilo, n-tetracosanilcarbonilo, que contienen uno o varios enlaces dobles. Particularmente se prefieren residuos de alquilcarbonilo de C<sub>10</sub>-C<sub>22</sub> saturados y/o insaturados, tales como  
15 alquilcarbonilo de C<sub>10</sub>, alquilcarbonilo de C<sub>11</sub>, alquilcarbonilo de C<sub>12</sub>, alquilcarbonilo de C<sub>13</sub>, alquilcarbonilo de C<sub>14</sub>, alquilcarbonilo de C<sub>16</sub>, alquilcarbonilo de C<sub>18</sub>, alquilcarbonilo de C<sub>20</sub> o residuos de alquilcarbonilo de C<sub>22</sub>, que contienen uno o varios enlaces dobles. Muy particularmente se prefieren residuos de alquilcarbonilo de C<sub>16</sub> – C<sub>22</sub>, saturados o insaturados como residuos de alquilcarbonilo de C<sub>16</sub>, alquilcarbonilo de C<sub>18</sub>, alquilcarbonilo de C<sub>20</sub> o alquilcarbonilo de C<sub>22</sub>, los cuales contienen uno o varios enlaces dobles. Estos residuos ventajosos pueden contener  
20 dos, tres, cuatro, cinco o seis enlaces dobles. Los residuos particularmente ventajosos con 18, 20 o 22 átomos de carbono en la cadena de ácido graso contienen hasta seis enlaces dobles, ventajosamente dos, tres, cuatro o cinco enlaces dobles, particularmente preferible dos, tres o cuatro enlaces dobles. Todos los residuos mencionados se derivan de los correspondientes ácidos grasos.

En la fórmula general II, R<sup>3</sup> significa hidrógeno, alquilcarbonilo saturado o insaturado de C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub>.

25 Como residuos de alquilo pueden mencionarse cadenas de alquilcarbonilo de C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>, sustituido o no sustituido, saturado o insaturado como etilcarbonilo, n-propilcarbonilo, n-butilcarbonilo, n-pentilcarbonilo, n-hexilcarbonilo, n-heptilcarbonilo, n-octilcarbonilo, n-nonilcarbonilo, n-decilcarbonilo, n-undecilcarbonilo, n-dodecilcarbonilo, n-tridecilcarbonilo, n-tetradecilcarbonilo, n-pentadecilcarbonilo, n-hexadecilcarbonilo, n-heptadecilcarbonilo, n-octadecilcarbonilo, n-nonadecilcarbonilo, n-eicosilcarbonilo, n-docosanilcarbonilo o n-tetracosanilcarbonilo, que  
30 contienen uno o varios enlaces dobles. Se prefieren residuos de alquilcarbonilo, saturados o insaturados, de C<sub>10</sub>-C<sub>22</sub> como n-decilcarbonilo, n-undecilcarbonilo, n-dodecilcarbonilo, n-tridecilcarbonilo, n-tetradecilcarbonilo, n-pentadecilcarbonilo, n-hexadecilcarbonilo, n-heptadecilcarbonilo, n-octadecilcarbonilo, n-nonadecilcarbonilo, n-eicosilcarbonilo, n-docosanilcarbonilo o n-tetracosanilcarbonilo, que contienen uno o varios enlaces dobles. Particularmente se prefieren residuos de alquilcarbonilo saturados y/o insaturados de C<sub>10</sub>-C<sub>22</sub> como residuos de alquilcarbonilo de C<sub>10</sub>, alquilcarbonilo de C<sub>11</sub>, alquilcarbonilo de C<sub>12</sub>, alquilcarbonilo de C<sub>15</sub>, alquilcarbonilo de C<sub>14</sub>, alquilcarbonilo de C<sub>16</sub>, alquilcarbonilo de C<sub>18</sub>, alquilcarbonilo de C<sub>20</sub> o alquilcarbonilo de C<sub>22</sub>, que contienen uno o  
35 varios enlaces dobles. Muy particularmente se prefieren residuos de alquilcarbonilo saturados o insaturados de C<sub>16</sub>-C<sub>22</sub> como residuos de alquilcarbonilo de C<sub>16</sub>, alquilcarbonilo de C<sub>18</sub>, alquilcarbonilo de C<sub>20</sub> o alquilcarbonilo de C<sub>22</sub>, que contienen uno o varios enlaces dobles. Estos residuos ventajosos pueden contener dos, tres, cuatro, cinco o  
40 seis enlaces dobles. Los residuos particularmente ventajosos con 18, 20 o 22 átomos de carbono en la cadena de ácido graso contienen hasta seis enlaces dobles, ventajosamente dos, tres, cuatro o cinco enlaces dobles, particularmente preferible dos, tres o cuatro enlaces dobles. Todos los residuos mencionados se derivan de los ácidos grasos correspondientes.

45 Los residuos arriba mencionados de R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> y R<sup>9</sup> pueden estar sustituidos con grupos hidroxilo y/o grupos epoxi y/o pueden contener enlaces triples.

Los ácidos grasos poliinsaturados preparados en el proceso de la invención contienen ventajosamente al menos dos, ventajosamente tres, cuatro, cinco o seis enlaces dobles. Los ácidos grasos contienen de manera particularmente ventajosa dos, tres, cuatro o cinco enlaces dobles. Los ácidos grasos preparados en el proceso tienen ventajosamente 18, 20 o 22 átomos de C en la cadena de ácido graso, los ácidos grasos contienen  
50 preferiblemente 20 o 22 átomos de carbono en la cadena de ácido graso. Los ácidos grasos saturados ventajosamente reaccionan poco, o no reaccionan, con los ácidos nucleicos usados en el proceso. Por poco ha de entenderse que en comparación con los ácidos grasos poliinsaturados, los ácidos grasos saturados se convierten con menos de 5 % de la actividad, ventajosamente menos de 3 %, particularmente ventajosamente con menos de 2 %. Estos ácidos grasos preparados pueden producirse como producto único en el proceso o presentarse en una  
55 mezcla de ácido graso.

Las secuencias de ácido nucleico usadas en el proceso de la invención son secuencias de ácido nucleico aisladas que codifican para polipéptidos con actividad desaturasa ω-3 seleccionadas del grupo que se compone de:

- i. Una secuencia de ácidos nucleicos con la secuencia de ácidos representada en SEQ ID NO: 1,
- ii. Secuencias de ácido nucleico que pueden derivarse de la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 2 como resultado del código genético degenerado, o
- iii. Derivados de la secuencia de ácidos nucleicos representada en SEQ ID NO: 1 que codifican para polipéptidos con al menos 70 % de identidad sobre todo el rango de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: 2, que tienen una actividad desaturasa  $\omega$ -3 frente a los ácidos grasos de C<sub>18</sub>, C<sub>20</sub> y C<sub>22</sub>, en cuyo caso se desaturan preferiblemente ácidos grasos de C<sub>20</sub>, y en cuyo caso cerca de 1,5 a 3 % de los ácidos grasos de C<sub>18</sub> presentes en la fuente de ácidos grasos se convierten en los correspondientes ácidos grasos  $\omega$ -3.

En las fórmulas generales I y II, los sustituyentes R<sup>2</sup> o R<sup>3</sup> significan ventajosamente, independientemente entre sí, alquilcarbonilo saturado o insaturado de C<sub>18</sub>-C<sub>22</sub>, de manera particularmente ventajosa significan independientemente entre sí alquilcarbonilo insaturado de C<sub>18</sub>, C<sub>20</sub> o C<sub>22</sub> con al menos dos enlaces dobles.

Los ácidos grasos poliinsaturados preparados en el proceso se enlazan ventajosamente en lípidos de membrana y/o triacilglicéridos, pero también tienen lugar en los organismos como ácidos grasos libres o enlazados en forma de otros ésteres de ácido graso. En tal caso pueden presentarse como "productos puros" o ventajosamente en forma de mezclas de diversos ácidos grasos o mezclas de diferentes glicéridos. Los diversos ácidos grasos enlazados en los triacilglicéridos pueden derivarse en tal caso de ácidos grasos de cadena corta con 4 a 6 átomos de C, ácidos grasos de cadena media con 8 a 12 átomos de C o ácidos grasos de cadena larga con 14 a 24 átomos de C; se prefieren los ácidos grasos de cadena larga, particularmente se prefieren los ácidos grasos de cadena larga LCPUFAs de ácidos grasos de C<sub>18</sub>, C<sub>20</sub> y/o C<sub>22</sub>.

En el proceso se producen ventajosamente ésteres de ácido graso con moléculas de ácidos grasos poliinsaturados de C<sub>18</sub>, C<sub>20</sub> y/o C<sub>22</sub> con al menos dos enlaces dobles en el éster de ácido graso, ventajosamente con al menos dos, tres, cuatro, cinco o seis enlaces dobles en el éster de ácido graso, de manera particularmente ventajosa con al menos tres, cuatro, cinco o seis enlaces dobles en el éster de ácido graso y conducen ventajosamente a la síntesis de ácido linolénico (=LA, C<sub>18</sub>:2<sup>Δ<sup>9,12,15</sup></sup>), ácido  $\gamma$ -linolénico (= GLA, C<sub>18</sub>:3<sup>Δ<sup>6,9,12</sup></sup>), ácido estearidónico (= SDA, C<sub>18</sub>:4<sup>Δ<sup>6,9,12,15</sup></sup>), ácido dihomo- $\gamma$ -linolénico (= DGLA, 20:3<sup>Δ<sup>8,11,14</sup></sup>), ácido  $\omega$ -3-eicosatetraenoico (= ETA, C<sub>20</sub>:4<sup>Δ<sup>8,11,14,17</sup></sup>), ácido araquidónico (ARA, C<sub>20</sub>:4<sup>Δ<sup>5,6,11,14</sup></sup>), ácido eicosapentaenoico (EPA, C<sub>20</sub>:5<sup>Δ<sup>5,8,12,14,17</sup></sup>), ácido  $\omega$ -6-docosapentaenoico (C<sub>22</sub>:5<sup>Δ<sup>4,7,10,13,16</sup></sup>), ácido  $\omega$ -3-docosapentaenoico (C<sub>22</sub>:5<sup>Δ<sup>7,10,13,16,19</sup></sup>), ácido docosahexaenoico (= DHA, C<sub>22</sub>:6<sup>Δ<sup>4,7,10,13,16,19</sup></sup>) o sus mezclas, preferible ARA, EPA y/o DHA.

Los ésteres de ácido graso con moléculas de ácidos grasos poliinsaturados de C<sub>18</sub>, C<sub>20</sub> y/o C<sub>22</sub> pueden aislarse de los organismos que se usan para la producción de los ésteres de ácido graso en forma de un aceite o lípido, por ejemplo en forma de compuestos como esfingolípidos, fosfoglicéridos, lípidos, glicolípidos como glicoesfingolípidos, fosfolípidos como fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol o difosfatidilglicerol, monoacilglicéridos, diacilglicéridos, triacilglicéridos y otros ésteres de ácido graso como los ésteres de acetilo coenzima A, que contienen los ácidos grasos poliinsaturados con al menos dos, tres, cuatro, cinco o seis, preferiblemente cinco o seis enlaces dobles, ventajosamente se aíslan en forma de sus diacilglicéridos, triacilglicéridos y/o en forma de la fosfatidilcolina, particularmente preferible en forma de los triacilglicéridos. Además de estos ésteres, en los organismos, ventajosamente en las plantas, los ácidos grasos poliinsaturados también están contenidos como ácidos grasos libres o enlazados en otros compuestos. Por lo regular, los diferentes compuestos previamente mencionados (ésteres de ácido graso y ácidos grasos libres) están presentes en los organismos en una distribución aproximada de 80 a 90 % en peso de triglicéridos, 2 a 5 % en peso de diglicéridos, 5 a 10 % en peso de monoglicéridos, 1 a 5 % en peso de ácidos grasos libres, 2 a 8 % en peso de fosfolípidos, en cuyo caso la suma de los diferentes compuestos da 100 % en peso.

En el proceso se preparan los LCPUFAs producidos con un contenido de al menos 3 % en peso, ventajosamente de al menos 5 % en peso, preferible de al menos 8 % en peso, particularmente preferible de al menos 10 % en peso, muy particularmente preferible de al menos 15 % en peso respecto de todos los ácidos grasos en los organismos transgénicos, ventajosamente en una planta transgénica. Los ácidos grasos se producen ventajosamente en forma enlazada. Con ayuda de los ácidos nucleicos usados en el proceso de la invención estos ácidos grasos pueden llevarse a posición sn1, sn2 y/o sn3 de los triglicéridos preparados ventajosamente. En el proceso de producción de PUFA las secuencias de desaturasa  $\omega$ -3 de la invención se usan ventajosamente en combinación con otros genes de la síntesis de PUFA, como el gen de A-4-desaturasa,  $\Delta$ -5-desaturasa,  $\Delta$ -6-desaturasa, A $\beta\beta$ -desaturasa, A-5-elongasa, A-6-elongasa y/o A-9-elongasa. De esta manera, en el proceso de la invención, a partir de los compuestos ácido linolénico (C<sub>18</sub>:2) o ácido linolénico (C<sub>18</sub>:3), mediante varios pasos de reacción, pueden producirse los productos finales del proceso, por ejemplo ácido araquidónico (ARA), ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido  $\omega$ -6-docosapentaenoico o DHA. Por lo regular éstos no se producen como productos puros absolutos, por lo regular en el producto final se encuentran contenidos pequeños vestigios de los precursores. Si en el organismo de partida o en la planta de partida se encuentra, por ejemplo, tanto ácido linolénico como también ácido linolénico, entonces los productos finales como ARA, EPA o DHA se presentan como mezclas. Ventajosamente, los precursores no deben ser más de 20 % en peso, preferiblemente no más de 15 % en peso, particularmente preferible no más de 10 % en

peso, muy particularmente preferible no más de 5 % en peso respecto de la cantidad del producto final respectivo. Ventajosamente, en una planta transgénica como productos finales, en el proceso solo se producen ARA, EPA o solo DHA, enlazados o como ácidos libres. Si los compuestos ARA, EPA y DHA se producen simultáneamente, entonces éstos se producen ventajosamente en una proporción de al menos 1:1:2 (EPA:ARA:DHA), ventajosamente de al menos 1:1:3, preferible de 1:1:4, particularmente preferible de 1:1:5.

Los ésteres de ácido graso o mezclas de ácido graso que se han producido según el método de la invención contienen ventajosamente 6 a 15 % de ácido palmítico, 1 a 6 % de ácido esteárico; 7 - 85 % de ácido oléico; 0,5 a 8 % de ácido vaccénico, 0,1 a 1 % de ácido aráquico, 7 a 25 % de ácidos grasos saturados, 8 a 85 % de ácidos grasos insaturados y 60 a 85 % de ácidos grasos poliinsaturados, cada caso respecto del 100 % y del contenido total de ácidos grasos de los organismos. Como ácido graso poliinsaturado ventajoso, en los ésteres de ácido graso o en las mezclas de ácido graso está contenido preferiblemente al menos 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 o 1 % de ácido araquidónico respecto del contenido total de ácido graso. Además, los ésteres de ácido graso o las mezclas de ácido graso que se han obtenido según el método de la invención contienen ventajosamente ácidos grasos seleccionados del grupo de los ácidos grasos: ácido erúrico (ácido 13-docosaenoico), ácido estercúlico (ácido 9,10-metilenoctadec-9-enoico), ácido malválico (ácido 8,9-metilenheptadec-8-enoico), ácido chaulmoógrico (ácido ciclopenten-dodecanoico), ácido graso de furano (ácido 9,12-epoxi-octadeca-9,11-dienoico), ácido vernólico (ácido 9,10-epoxi-octadec-12-enoico), ácido tarírico (ácido 6-octadecinoico), ácido 6-nonadecinoico, ácido santálico (ácido 11-octadecen-9-inoico), ácido 6,9-octadeceninoico, ácido pirúlico (ácido 10-heptadecen-8-inoico), ácido crepenínico (ácido 9-octadecen-12-inoico), ácido 13,14-dihidrooroféico, ácido octadecen-13-ene-9,11-diinoico, ácido petroselénico (ácido cis-6-octadecenoico), ácido 9c,12t-octadecadienoico, ácido calendúlico (ácido 8t10t12c-octadecatrienoico), ácido catálico (ácido 9t11t13c-octadecatrienoico), ácido eleosteárico (ácido 9c11t13t-octadecatrienoico), ácido jacárico (ácido 8c10t12c-octadecatrienoico), ácido pucínico (ácido 9c11t13c-octadecatrienoico), ácido parinárico (ácido 9c11t13t15c-octadecatetraenoico), ácido pinolénico (ácido all-cis-5,9,12-octadecatrienoico), ácido labalénico (ácido 5,6-octadecadienalénico), ácido ricinoleico (ácido 12-hidroxioléico) y/o ácido coriólico (ácido 13-hidroxi-9c,11t-octadecadienoico). Ventajosamente los ésteres de ácido graso o las mezclas de ácido graso, producidos según el método de la invención no contienen, o contienen menos de 0,1 % de todos los ácidos grasos de colesterol, de ácido butírico, ácido clupanodónico (= ácido docosapentaenoico, C22:5<sup>A4,8,12,15,21</sup>) y de ácido nisínico (ácido tetracosahexaenoico, C23:6<sup>A9,8,12,15,16,21</sup>).

Debido a las secuencias de ácido nucleico de la invención o a las secuencias de ácido nucleico usadas en el proceso de la invención puede lograrse un incremento del rendimiento de ácidos grasos poliinsaturados  $\omega$ -3 de al menos 50 %, ventajosamente de al menos 80 %, de manera particularmente ventajosa de al menos 100 %, de una manera muy particularmente ventajosa de al menos 150 % frente al organismo de partida no transgénico, por ejemplo una levadura, un alga, un hongo o una planta como *arabidopsis* o lino al compararse en el análisis de GC, véanse ejemplos.

Los ácidos grasos poliinsaturados químicamente puros también pueden sintetizarse según los métodos previamente descritos. Para esto los ácidos grasos o las composiciones de ácido graso se aíslan del organismo, tales como los microorganismos o las plantas o el medio de cultivo, en el cual o sobre el cual se cultivaron los organismos, o del organismo y del medio de cultivo de manera conocida, por ejemplo mediante extracción, destilación, cristalización, cromatografía o combinaciones de estos métodos. Estos ácidos grasos químicamente puros o composiciones de ácido graso son ventajosos para aplicaciones en el sector de la industria de productos alimenticios, de la industria cosmética y particularmente de la industria farmacéutica.

Como organismo para la preparación en el proceso de invención se consideran en principio todos los organismos como microorganismos, animales no humanos o plantas.

Como plantas se consideran en principio todas las plantas que están en capacidad de sintetizar ácidos grasos como todas las plantas dicotiledóneas o monocotiledóneas, algas o musgo. Las plantas se seleccionan ventajosamente del grupo de las familias vegetales *Adelotheciaceae*, *Anacardiaceae*, *Asteraceae*, *Apiaceae*, *Betulaceae*, *Boraginaceae*, *Brassicaceae*, *Bromeliaceae*, *Caricaceae*, *Cannabaceae*, *Convolvulaceae*, *Chenopodiaceae*, *Cryptocodiaceae*, *Cucurbitaceae*, *Ditrichaceae*, *Elaeagnaceae*, *Ericaceae*, *Euforbiaceae*, *Fabaceae*, *Geraniaceae*, *Gramineae*, *Juglandaceae*, *Lauraceae*, *Leguminosae*, *Linaceae*, *Prasinophyceae* o plantas hortalizas o plantas ornamentales tales como clavelón.

A manera de ejemplo pueden mencionarse las siguientes plantas seleccionadas del grupo: *Adelotheciaceae*, tales como los géneros *Fiscomitrella*, por ejemplo el género y las especies *Physcomitrella patens*, *Anacardiaceae* tales como los géneros *Pistacia*, *Mangifera*, *Anacardium*, por ejemplo el género y las especies *Pistacia vera* [pistacho], *Mangifera indica* [mango] o *Anacardium occidentale* [anacard], *Asteraceae* tales los géneros *Calendula*, *Carthamus*, *Centaurea*, *Cichorium*, *Cinara*, *Helianthus*, *Lactuca*, *Locusta*, *Tagetes*, *Valeriana*, por ejemplo el género y las especies *Calendula officinalis* [caléndulas de jardín], *Carthamus tinctorius* [cártamo, safflower], *Centaurea cyanus* [aciano], *Cichorium intybus* [usillo, achicoria], *Cinara scolimus* [alcachofa], *Helianthus annuus* [girasol], *Lactuca sativa*, *Lactuca crispa*, *Lactuca esculenta*, *Lactuca scariola* L. ssp. *sativa*, *Lactuca scariola* L. var. *integrata*, *Lactuca scariola* L. var. *integrifolia*, *Lactuca sativa* subsp. *romana*, *Locusta communis*, *Valeriana locusta* [lechuga], *Tagetes lucida*,



Tagetes erecta o Tagetes tenuifolia [damasquina, cempasúchil], Apiaceae como el género *Daucus*, por ejemplo el género y la especie *Daucus carota* [zanahoria], Betulaceae como el género *Corilus*, por ejemplo los géneros y especies *Corilus avellana* o *Corilus colurna* [avellano], Boraginaceae como el género *Borago*, por ejemplo el género y la especie *Borago officinalis* [borraja], Brassicaceae tales como los géneros *Brassica*, *Melanosinapis*, *Sinapis*,  
 5 *Arabadopsis*, por ejemplo los géneros y especies *Brassica napus*, *Brassica rapa* ssp. [colza], *Sinapis arvensis*, *Brassica juncea*, *Brassica juncea* var. *juncea*, *Brassica juncea* var. *crispifolia*, *Brassica juncea* var. *foliosa*, *Brassica nigra*, *Brassica sinapioides*, *Melanosinapis communis* [mostaza], *Brassica oleracea* [remolacha forrajera] o *Arabidopsis thaliana*, Bromeliaceae, tales como los géneros *Anana*, *Bromelia* (piña), por ejemplo los géneros y especies *Anana comosus*, *Ananas ananas* o *Bromelia comosa* [piña], Caricaceae como el género *Carica*, como el  
 10 género y la especie *Carica papaya* [papaya], Cannabaceae como el género *Cannabis* como el género y la especie *Cannabis sativa* [cáñamo], Convolvulaceae tales como los géneros *Ipomea*, *Convolvulus*, por ejemplo los géneros y especies *Ipomoea batatas*, *Ipomoea pandurata*, *Convolvulus batatas*, *Convolvulus tiliaceus*, *Ipomoea fastigiata*, *Ipomoea tiliacea*, *Ipomoea triloba* o *Convolvulus panduratus* [batata], Chenopodiaceae como el género *Beta*, tales como los géneros y especies *Beta vulgaris*, *Beta vulgaris* var. *altissima*, *Beta vulgaris* var. *Vulgaris*, *Beta maritima*,  
 15 *Beta vulgaris* var. *perennis*, *Beta vulgaris* var. *conditiva* o *Beta vulgaris* var. *Esculenta* [remolacha azucarera], Crypthecodiniaceae como el género *Crypthecodinium*, por ejemplo el género y la especie *Crypthecodinium cohnii*, Cucurbitaceae como el género *Cucurbita*, por ejemplo los géneros y especies *Cucurbita maxima*, *Cucurbita mixta*, *Cucurbita pepo* o *Cucurbita moschata* [calabaza, zapallo], Cimbelleaceae como los géneros *Amfora*, *Cimbella*, *Okedenia*, *Faeodactylum*, *Reimeria* por ejemplo el género y la especie *Faeodactylum tricornutum*, Ditrichaceae como los géneros *Ditrichaceae*, *Astomiopsis*, *Ceratodon*, *Chrysoblastella*, *Ditrichum*, *Distichium*, *Eccremidium*, *Lofidion*, *Filibertiella*, *Pleuridium*, *Saelania*, *Trichodon*, *Skottsbergia* por ejemplo los géneros y especies *Ceratodon antarcticus*, *Ceratodon columbiae*, *Ceratodon heterofillus*, *Ceratodon purpurascens*, *Ceratodon purpureus*, *Ceratodon purpureus* ssp. *convolutus*, *Ceratodon purpureus* ssp. *stenocarpus*, *Ceratodon purpureus* var. *rotundifolius*, *Ceratodon ratodon*, *Ceratodon stenocarpus*, *Chrysoblastella chilensis*, *Ditrichum ambiguum*, *Ditrichum brevisetum*, *Ditrichum crispatisimum*, *Ditrichum difficile*, *Ditrichum falcifolium*, *Ditrichum flexicaule*, *Ditrichum giganteum*, *Ditrichum heteromallum*, *Ditrichum lineare*, *Ditrichum lineare*, *Ditrichum montanum*, *Ditrichum montanum*, *Ditrichum pallidum*, *Ditrichum punctulatum*, *Ditrichum pusillum*, *Ditrichum pusillum* var. *tortile*, *Ditrichum rhinchostegium*, *Ditrichum schimperi*, *Ditrichum tortile*, *Distichium capillaceum*, *Distichium hagenii*, *Distichium inclinatum*, *Distichium macounii*, *Eccremidium floridanum*, *Eccremidium whiteleggei*, *Lofidion strictus*, *Pleuridium acuminatum*, *Pleuridium alternifolium*, *Pleuridium holdridgei*, *Pleuridium mexicanum*, *Pleuridium ravenelii*, *Pleuridium subulatum*, *Saelania glaucescens*, *Trichodon borealis*, *Trichodon cylindricus* o *Trichodon cylindricus* var. *oblongus*, Elaeagnaceae como el género *Elaeagnus* por ejemplo el género y la especie *Olea europea* [olivo], Ericaceae como el género *Kalmia*, por ejemplo los géneros y especies *Kalmia latifolia*, *Kalmia angustifolia*, *Kalmia microphylla*, *Kalmia polifolia*, *Kalmia occidentalis*, *Cistus chamaerhodendros* o *Kalmia lucida* [laurel de montaña], Euforbiaceae como los géneros  
 35 *Manihot*, *Janifa*, *Jatrofa*, *Ricinus* por ejemplo los géneros y especies *Manihot utilissima*, *Janifa manibot*" *Jatrofa manihot*., *Manihot aipil*, *Manihot dulcis*, *Manihot manihot*, *Manihot melanobasis*, *Manihot esculenta* [yuca, mandioca, casava o casabe] o *Ricinus communis* [ricino], Fabaceae como los géneros *Pisum*, *Albizia*, *Cathormion*, *Feuillea*, *Inga*, *Pithecolobium*, *Acacia*, *Mimosa*, *Medicago*, *Glicine*, *Dolichos*, *Faseolus*, *Soja* por ejemplo los géneros y especies *Pisum sativum*, *Pisum arvense*, *Pisum humile* [guisantes], *Albizia berteriana*, *Albizia julibrissin*, *Albizia lebbeck*, *Acacia berteriana*, *Acacia littoralis*, *Albizia berteriana*, *Albizzia berteriana*, *Cathormion berteriana*, *Feuillea berteriana*, *Inga fragrans*, *Pithecellobium berterianum*, *Pithecellobium fragrans*, *Pithecolobium berterianum*, *Pseudalbizzia berteriana*, *Acacia julibrissin*, *Acacia nemu*, *Albizia nemu*, *Fouillea julibrissin*, *Mimosa julibrissin*, *Mimosa speciosa*, *Sericanrda julibrissin*, *Acacia lebbeck*, *Acacia macnophylla*, *Albizia lebbeck*, *Feuillea lebbeck*, *Mimosa lebbeck*, *Mimosa speciosa* [árbol de la seda], *Medicago sativa*, *Medicago falcata*, *Medicago varia* [alfalfa]  
 45 *Glicine max* *Dolichos soja*, *Glicine gracilis*, *Glicine hispida*, *Faseolus max*, *Soja hispida* o *Soja max* [haba de soja], Funariaceae como los géneros *Afanorrhagma*, *Entosthodon*, *Funaria*, *Fiscomitrella*, *Fiscomitrium* por ejemplo los géneros y especies *Afanorrhagma serratum*, *Entosthodon attenuatus*, *Entosthodon bolanderi*, *Entosthodon bonplandii*, *Entosthodon californicus*, *Entosthodon drummondii*, *Entosthodon jamesonii*, *Entosthodon leibergii*, *Entosthodon neoscoticus*, *Entosthodon rubrisetus*, *Entosthodon spathulifolius*, *Entosthodon tucsoni*, *Funaria americana*, *Funaria bolanderi*, *Funaria calcarea*, *Funaria californica*, *Funaria calvenscens*, *Funaria convoluta*, *Funaria flavicans*, *Funaria groutiana*, *Funaria higrometrica*, *Funaria higrometrica* var. *arctica*, *Funaria higrometrica* var. *calvenscens*, *Funaria higrometrica* var. *convoluta*, *Funaria higrometrica* var. *muralis*, *Funaria higrometrica* var. *utahensis*, *Funaria microstoma*, *Funaria microstoma* var. *obtusifolia*, *Funaria muhlenbergii*, *Funaria orcuttii*, *Funaria plano-convexa*, *Funaria polaris*, *Funaria ravenelii*, *Funaria rubriseta*, *Funaria serrata*, *Funaria sonora*, *Funaria sublimbatus*, *Funaria tucsoni* *Physcomitrella californica*, *Physcomitrella patens*, *Physcomitrella readeri*, *Physcomitrium australe*, *Physcomitrium californicum*, *Physcomitrium collenchimatum*, *Physcomitrium coloradense*, *Physcomitrium cupuliferum*, *Physcomitrium drummondii*, *Physcomitrium eurystomum*, *Physcomitrium flexifolium*, *Physcomitrium hookeri*, *Physcomitrium hookeri* var. *serratum*, *Physcomitrium immersum*, *Physcomitrium kellermanii*, *Physcomitrium megalocarpum*, *Physcomitrium pyriforme*, *Physcomitrium pyriforme* var. *serratum*, *Physcomitrium rufipes*, *Physcomitrium sandbergii*, *Physcomitrium subsfaericum*, *Physcomitrium washingtoniense*, Geraniaceae como los géneros *Pelargonium*, *Cocos*, *Oleum* por ejemplo los géneros y especies *Cocos nucifera*, *Pelargonium grossularioides* o *Oleum cocois* [coco]. Gramineae como el género *Saccharum*, por ejemplo el género y la especie *Saccharum officinarum*, Juglandaceae como los géneros *Juglans*, *Wallia* por ejemplo los géneros y especies *Juglans regia*, *Juglans ailanthifolia*, *Juglans sieboldiana*, *Juglans cinerea*, *Wallia cinerea*, *Juglans bixbyi*, *Juglans californica*,  
 65 *Juglans hindsii*, *Juglans intermedia*, *Juglans jamaicensis*, *Juglans major*, *Juglans microcarpa*, *Juglans nigra* o *Wallia nigra* [nogal], Lauraceae como los géneros *Persea*, *Laurus* por ejemplo los géneros y especies *Laurus nobilis*

[laurel], *Persea americana*, *Persea gratissima* o *Persea persea* [aguacate], Leguminosae como el género *Arachis*, por ejemplo el género y la especie *Arachis hypogaea* [cacaahuete, maní], Linaceae como los géneros *Linum*, *Adenolinum*, por ejemplo los géneros y especies *Linum usitatissimum*, *Linum humile*, *Linum austriacum*, *Linum bienne*, *Linum angustifolium*, *Linum catharticum*, *Linum flavum*, *Linum grandiflorum*, *Adenolinum grandiflorum*, *Linum lewisii*, *Linum narbonense*, *Linum perenne*, *Linum perenne* var. *lewisii*, *Linum pratense* o *Linum trigynum* [lino], Litharieae como el género *Punica*, por ejemplo el género y la especie *Punica granatum* [granada], Malvaceae como el género *Gossypium*, por ejemplo los géneros y especies *Gossypium hirsutum*, *Gossypium arboreum*, *Gossypium barbadense*, *Gossypium herbaceum* o *Gossypium thurberi* [algodón], Marchantiaceae como el género *Marchantia*, por ejemplo los géneros y especies *Marchantia berteroana*, *Marchantia foliacea*, *Marchantia macropora*, Musaceae, como el género *Musa*, por ejemplo los géneros y especies *Musa nana*, *Musa acuminata*, *Musa paradisiaca*, *Musa* spp. [banana], Onagraceae como los géneros *Camissonia*, *Oenothera*, por ejemplo los géneros y especies *Oenothera biennis* o *Camissonia brevipes* [onagra], Palmae como el género *Elaeis*, por ejemplo el género y la especie *Elaeis guineensis* [palma oleífera], Papaveraceae como el género *Papaver*, por ejemplo los géneros y especies *Papaver orientale*, *Papaver rhoeas*, *Papaver dubium* [amapola, adormidera], Pedaliaceae como el género *Sesamum*, por ejemplo el género y la especie *Sesamum indicum* [ajonjolí, sésamo], Piperaceae como los géneros *Piper*, *Artanthe*, *Peperomia*, *Steffensia*, por ejemplo los géneros y especies *Piper aduncum*, *Piper amalago*, *Piper angustifolium*, *Piper auritum*, *Piper betel*, *Piper cubeba*, *Piper longum*, *Piper nigrum*, *Piper retrofractum*, *Artanthe adunca*, *Artanthe elongata*, *Peperomia elongata*, *Piper elongatum*, *Steffensia elongata*. [pimienta de cayena], Poaceae como los géneros *Hordeum*, *Secale*, *Avena*, *Sorghum*, *Andropogon*, *Holcus*, *Panicum*, *Oryza*, *Zea* (maíz), *Triticum*, por ejemplo los géneros y especies *Hordeum vulgare*, *Hordeum jubatum*, *Hordeum murinum*, *Hordeum secalinum*, *Hordeum distichon*, *Hordeum aegiceras*, *Hordeum hexastichon.*, *Hordeum hexastichum*, *Hordeum irregulare*, *Hordeum sativum*, *Hordeum secalinum* [cebada], *Secale cereale* [centeno], *Avena sativa*, *Avena fatua*, *Avena byzantina*, *Avena fatua* var. *sativa*, *Avena hibrida* [avena], *Sorghum bicolor*, *Sorghum halepense*, *Sorghum saccharatum*, *Sorghum vulgare*, *Andropogon drammondii*, *Holcus bicolor*, *Holcus sorghum*, *Sorghum aetiopicum*, *Sorghum arundinaceum*, *Sorghum caffrorum*, *Sorghum cernuum*, *Sorghum dochna*, *Sorghum drummondii*, *Sorghum durra*, *Sorghum guineense*, *Sorghum lanceolatum*, *Sorghum nervosum*, *Sorghum saccharatum*, *Sorghum subglabrescens*, *Sorghum verticilliflorum*, *Sorghum vulgare*, *Holcus halepensis*, *Sorghum miliaceum*, *Panicum militaceum* [sorgo], *Oryza sativa*, *Oryza latifolia* [arroz], *Zea mays* [maíz] *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Triticum turgidum*, *Triticum hibernum*, *Triticum macha*, *Triticum sativum* o *Triticum vulgare* [trigo], Porfiridiaceae como los géneros *Chrootheca*, *Flintiella*, *Petrovanella*, *Porfiridium*, *Rhodella*, *Rhodorus*, *Vanhoeffenia* por ejemplo el género y la especie *Porfiridium cruentum*, Proteaceae como el género *Macadamia*, por ejemplo el género y la especie *Macadamia intergrifolia* [macadamia], Prasinoficeae como los géneros *Nephroselmis*, *Prasinococcus*, *Scherffelia*, *Tetraselmis*. *Mantoniella*, *Ostreococcus*, por ejemplo los géneros y especies *Nephroselmis olivacea*, *Prasinococcus capsulatus*, *Scherffelia dubia*, *Tetraselmis chui*, *Tetraselmis suecica*, *Mantoniella squamata*, *Ostreococcus tauri*, Rubiaceae, como el género *Coffea*, por ejemplo los géneros y especies *Coffea* spp., *Coffea arabica*, *Coffea canefora* o *Coffea liberica* [café], Scrophulariaceae como el género *Verbascum*, por ejemplo los géneros y especies *Verbascum blattaria*, *Verbascum chaixii*, *Verbascum densiflorum*, *Verbascum lagurus*, *Verbascum longifolium*, *Verbascum lichnitis*, *Verbascum nigrum*, *Verbascum olímpicum*, *Verbascum phlomoides*, *Verbascum foenicum*, *Verbascum pulverulentum* o *Verbascum thapsus* [verbasco, candelaria], Solanaceae como los géneros *Capsicum*, *Nicotiana*, *Solanum*, *Licopersicon*, por ejemplo los géneros y especies *Capsicum annuum*, *Capsicum annuum* var. *glabriusculum*, *Capsicum frutescens* [pimienta], *Capsicum annuum* [pimiento], *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana alata*, *Nicotiana attenuata*, *Nicotiana glauca*, *Nicotiana langsdorffii*, *Nicotiana obtusifolia*, *Nicotiana quadrivalvis*, *Nicotiana repanda*, *Nicotiana rustica*, *Nicotiana silvestris* [tabaco], *Solanum tuberosum* [patata], *Solanum melongena* [berenjena] *Licopersicon esculentum*, *Licopersicon licopersicum.*, *Licopersicon pyriforme*, *Solanum integrifolium* o *Solanum licopersicum* [tomate], Sterculiaceae como el género *Theobroma*, por ejemplo el género y la especie *Theobroma cacao* [cacao] o Theaceae como el género *Camellia* por ejemplo el género y la especie *Camellia sinensis* [té].

Microorganismos ventajosos son, por ejemplo, hongos seleccionados del grupo de las familias Chaetomiaceae, Choaneforaceae, Cryptococcaceae, Cunninghamellaceae, Dematiaceae, Moniliaceae, Mortierellaceae, Mucoraceae, Pythiaceae, Saccharomycetaceae, Saprolegniaceae, Schizosacharomycetaceae, Sodariaceae o Tubereulariaceae.

A manera de ejemplo pueden nombrarse los siguientes microorganismos seleccionados del grupo: Choaneforaceae tales como los géneros *Blakeslea*, *Choanefora*, por ejemplo los géneros y especies *Blakeslea trispora*, *Choanefora cucurbitarum*, *Choanefora infundibulifera* var. *cucurbitarum*, *Mortierellaceae* como del género *Mortierella*, por ejemplo los géneros y especies *Mortierella isabellina*, *Mortierella policefala*, *Mortierella ramanniana*, *Mortierella vinacea*, *Mortierella zonata*, Pythiaceae como los géneros *Pythium*, *Phytophthora*, por ejemplo los géneros y especies *Pythium debaryanum*, *Pythium intermedium*, *Pythium irregulare*, *Pythium megalacanthum*, *Pythium paroecandrum*, *Pythium silvaticum*, *Pythium ultimum*, *Phytophthora cactorum*, *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora citricola*, *Phytophthora citrophthora*, *Phytophthora cryptogea*, *Phytophthora drechsleri*, *Phytophthora erythroseptica*, *Phytophthora lateralis*, *Phytophthora megasperma*, *Phytophthora nicotianae*, *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica*, *Phytophthora palmivora*, *Phytophthora parasitica*, *Phytophthora syringae*, Saccharomycetaceae como los géneros *Hansenula*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Yarrowia*, por ejemplo los géneros y especies *Hansenula anomala*, *Hansenula californica*, *Hansenula canadensis*, *Hansenula capsulata*, *Hansenula ciferrii*, *Hansenula glucozima*, *Hansenula henricii*, *Hansenula holstii*, *Hansenula minuta*, *Hansenula nonfermentans*, *Hansenula*

5 filodendri, *Hansenula polimorfa*, *Hansenula saturnus*, *Hansenula subpelliculosa*, *Hansenula wickerhamii*, *Hansenula wingei*, *Pichia alcoholofila*, *Pichia angusta*, *Pichia anomala*, *Pichia bisporea*, *Pichia burtonii*, *Pichia canadensis*, *Pichia capsulata*, *Pichia carsonii*, *Pichia cellobiosa*, *Pichia ciferrii*, *Pichia farinosa*, *Pichia fermentans*, *Pichia finlandica*, *Pichia glucozima*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia haplofila*, *Pichia henricii*, *Pichia holstii*, *Pichia jadinii*, *Pichia lindnerii*,  
 10 *Pichia membranaefaciens*, *Pichia metanolica*, *Pichia minuta* var. *minuta*, *Pichia minuta* var. *nonfermentans*, *Pichia norvegensis*, *Pichia ohmeri*, *Pichia pastoris*, *Pichia filodendri*, *Pichia pini*, *Pichia polimorfa*, *Pichia quercuum*, *Pichia rhodanensis*, *Pichia sargentensis*, *Pichia stipitis*, *Pichia strasburgensis*, *Pichia subpelliculosa*, *Pichia toletana*, *Pichia trehalofila*, *Pichia vini*, *Pichia xilosa*, *Saccharomyces acetii*, *Saccharomyces bailii*, *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces bisporus*, *Saccharomyces capensis*, *Saccharomyces carisbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*,  
 15 *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*, *Saccharomyces chevalieri*, *Saccharomyces delbrueckii*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces drosophilae*, *Saccharomyces elegans*, *Saccharomyces ellipsoideus*, *Saccharomyces fermentati*, *Saccharomyces florentinus*, *Saccharomyces fragilis*, *Saccharomyces heterogenicus*, *Saccharomyces hienipiensis*, *Saccharomyces inusitatus*, *Saccharomyces italicus*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces krusei*, *Saccharomyces lactis*, *Saccharomyces marxianus*, *Saccharomyces microellipsoideus*, *Saccharomyces montanus*, *Saccharomyces norbensis*, *Saccharomyces oleaceus*, *Saccharomyces paradoxus*, *Saccharomyces pastorianus*, *Saccharomyces pretoriensis*, *Saccharomyces rosei*, *Saccharomyces rouxii*, *Saccharomyces uvarum*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Yarrowia lipolitica*, *Schizosaccharomycetaceae* tales como los géneros *Schizosaccharomyces*, por ejemplo las especies *Schizosaccharomyces japonicus* var. *japonicus*, *Schizosaccharomyces japonicus* var. *versatilis*, *Schizosaccharomyces malidevorans*, *Schizosaccharomyces octosporus*, *Schizosaccharomyces pombe* var. *malidevorans*, *Schizosaccharomyces pombe* var. *pombe*, *Thraustochitriaceae* tales como los géneros *Althornia*, *Aplanochitrium*, *Japonochitrium*, *Schizochitrium*, *Thraustochitrium*, por ejemplo las especies *Schizochitrium aggregatum*, *Schizochitrium limacinum*, *Schizochitrium mangrovei*, *Schizochitrium minutum*, *Schizochitrium octosporum*, *Thraustochitrium aggregatum*, *Thraustochitrium amoeboidum*, *Thraustochitrium antacticum*, *Thraustochitrium arudimentale*, *Thraustochitrium aureum*,  
 20 *Thraustochitrium benthicola*, *Thraustochitrium globosum*, *Thraustochitrium indicum*, *Thraustochitrium kerguelense*, *Thraustochitrium kinnei*, *Thraustochitrium motivum*, *Thraustochitrium multirudimentale*, *Thraustochitrium pachidermum*, *Thraustochitrium proliferum*, *Thraustochitrium roseum*, *Thraustochitrium rossii*, *Thraustochitrium striatum* o *Thraustochitrium visurgense*.

30 Otros microorganismos ventajosos son por ejemplo bacterias seleccionados del grupo de las familias *Bacillaceae*, *Enterobacteriaceae* o *Rhizobiaceae*.

A manera de ejemplo pueden nombrarse los siguientes microorganismos seleccionados del grupo: *Bacillaceae* como el género *Bacillus*, por ejemplo los géneros y especies *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, *Bacillus alcalophilus*, *Bacillus amiloliquefaciens*, *Bacillus amyloliticus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus sphaericus* subsp. *fusiformis*, *Bacillus galactophilus*, *Bacillus globisporus*, *Bacillus globisporus* subsp. *marinus*, *Bacillus halophilus*, *Bacillus lentimorbus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus psychrosaccharoliticus*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* o *Bacillus thuringiensis*; *Enterobacteriaceae* como los géneros *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella* o *Serratia*, por ejemplo los géneros y especies *Citrobacter amalonaticus*, *Citrobacter diversus*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter genomospecies*, *Citrobacter gillennii*, *Citrobacter intermedium*, *Citrobacter koseri*, *Citrobacter murlinae*, *Citrobacter sp.*, *Edwardsiella hoshinae*, *Edwardsiella ictaluri*, *Edwardsiella tarda*, *Erwinia alni*, *Erwinia amilovorae*, *Erwinia ananatis*, *Erwinia afidicola*, *Erwinia billingiae*, *Erwinia cacticida*, *Erwinia cancerogena*, *Erwinia carnegieana*, *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*, *Erwinia carotovora* subsp. *betavasculorum*, *Erwinia carotovora* subsp. *odorifera*, *Erwinia carotovora* subsp. *wasabiae*, *Erwinia chrysanthemi*, *Erwinia cripipedii*, *Erwinia dissolvens*, *Erwinia herbicola*, *Erwinia mallotivora*,  
 45 *Erwinia milletiae*, *Erwinia nigrifluens*, *Erwinia nimipressuralis*, *Erwinia persicina*, *Erwinia psidii*, *Erwinia pyrifoliae*, *Erwinia quercina*, *Erwinia rhapontici*, *Erwinia rubrifaciens*, *Erwinia salicis*, *Erwinia stewartii*, *Erwinia tracheifila*, *Erwinia uredavora*, *Escherichia adecarboxilata*, *Escherichia anindolica*, *Escherichia aurescens*, *Escherichia blattae*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* var. *communior*, *Escherichia coli*-mutabile, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermannii*, *Escherichia sp.*, *Escherichia vulneris*, *Klebsiella aerogenes*, *Klebsiella edwardsii* subsp. *atlantae*, *Klebsiella ornithinolitica*, *Klebsiella oxitoca*, *Klebsiella planticola*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *Klebsiella sp.*, *Klebsiella terrigena*, *Klebsiella trevisanii*, *Salmonella abony*, *Salmonella arizonae*, *Salmonella bongori*, *Salmonella choleraesuis* subsp. *arizonae*, *Salmonella choleraesuis* subsp. *bongori*, *Salmonella choleraesuis* subsp. *coleraesuis*, *Salmonella choleraesuis* subsp. *diarizonae*, *Salmonella choleraesuis* subsp. *houtenae*, *Salmonella choleraesuis* subsp. *indica*, *Salmonella choleraesuis* subsp. *salamae*, *Salmonella daressalaam*, *Salmonella enterica* subsp. *houtenae*, *Salmonella enterica* subsp. *salamae*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella gallinarum*, *Salmonella heidelberg*, *Salmonella panama*, *Salmonella senftenberg*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia entomophila*, *Serratia ficaria*, *Serratia fonticola*, *Serratia grimeslii*, *Serratia liquefaciens*, *Serratia marcescens*, *Serratia marcescens* subsp. *marcescens*, *Serratia marinorubra*, *Serratia odorifera*, *Serratia plimouthensis*, *Serratia plimouthica*, *Serratia proteamaculans*, *Serratia proteamaculans* subsp. *quinovora*, *Serratia quinivorans* o *Serratia rubidaea*; *Rhizobiaceae*, tales como los géneros *Agrobacterium*, *Carbophilus*, *Chelatobacter*, *Ensifer*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium* por ejemplo los géneros y especies *Agrobacterium atlanticum*, *Agrobacterium ferrugineum*, *Agrobacterium gelatinovorum*, *Agrobacterium lanymoorei*, *Agrobacterium meteorii*, *Agrobacterium radiobacter*, *Agrobacterium rhizogenes*, *Agrobacterium rubi*, *Agrobacterium stellulatum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium vitis*, *Carbophilus*

carboxidus, *Che/Atobacter heintzii*, *Ensifer adhaerens*, *Ensifer arboris*, *Ensifer fredii*, *Ensifer kostiensis*, *Ensifer kummerowiae*, *Ensifer medicae*, *Ensifer meliloti*, *Ensifer sahari*, *Ensifer terengae*, *Ensifer xinjiangensis*, *Rhizobium ciceri*, *Rhizobium etli*, *Rhizobium fredii*, *Rhizobium galegae*, *Rhizobium gallicum*, *Rhizobium giardinii*, *Rhizobium hainanense*, *Rhizobium huakuii*, *Rhizobium huautlense*, *Rhizobium indigoferae*, *Rhizobium japonicum*, *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium loessense*, *Rhizobium loti*, *Rhizobium lupini*, *Rhizobium mediterraneum*, *Rhizobium meliloti*, *Rhizobium mongolense*, *Rhizobium faseoli*, *Rhizobium radiobacter*, *Rhizobium rhizogenes*, *Rhizobium rubi*, *Rhizobium sullae*, *Rhizobium tianshanense*, *Rhizobium trifolii*, *Rhizobium tropici*, *Rhizobium undicola*, *Rhizobium vitis*, *Sinorhizobium adhaerens*, *Sinorhizobium arboris*, *Sinorhizobium fredii*, *Sinorhizobium kostiense*, *Sinorhizobium kummerowiae*, *Sinorhizobium medicae*, *Sinorhizobium meliloti*, *Sinorhizobium morelense*, *Sinorhizobium sahari* o *Sinorhizobium xinjiangense*.

Otros microorganismos ventajosos para el método de la invención son, por ejemplo, protistos o diatomeas seleccionadas del grupo de las familias Dinophyceae, Turaniellidae u Oxytrichidae, tales como los géneros y especies: *Cryptocodinium cohnii*, *Phaeodactylum tricornum*, *Stilonychia mytilus*, *Stilonychia pustulata*, *Stilonychia putrina*, *Stilonychia notofora*, *Stilonychia sp.*, *Colpidium campilum* o *Colpidium sp.* En el proceso de la invención se utilizan ventajosamente organismos transgénicos como hongos tales como *Mortierella* o *Traustochytrium*, levaduras como *Saccharomyces* o *Schizosaccharomyces*, musgos como *Physcomitrella* o *Ceratodon*, animales no humanos como *Caenorhabditis*, algas como *Cryptocodinium* o *Phaeodactylum* o plantas como las plantas dicotiledóneas o monocotiledóneas. De manera particularmente ventajosa en el proceso de la invención se usan organismos que pertenecen a los organismos que producen aceite, es decir los que se usan para la producción de aceites, como hongos tales como *Mortierella* o *Traustochytrium*, algas tales como *Cryptocodinium*, *Phaeodactylum* o plantas, principalmente plantas, preferiblemente plantas oleaginosas que contienen grandes cantidades de compuestos lipídicos, como cacahuete, colza, canola, girasol, safflower (cárdamo), amapola, mostaza, cáñamo, ricino, olivo, ajonjolí, caléndula, *Punica* (granada), onagra, verbasco, cárdamo, rosas silvestres, avellano, almendro, macadamia, aguacate, laurel, calabaza, lino, soja, pistacho, borraja, árboles (palma oleífera, coco o nogal) o cultivos como maíz, trigo, centeno, avena, triticale, arroz, cebada, algodón, yuca, pimienta, clavelón, plantas solanáceas como patata, tabaco, berenjena y tomate, especies vicia, guisantes, alfalfa o plantas arbustos (café, cacao, té), especies *Salix* y pastos perennes y plantas para forraje. Plantas preferidas según la invención son plantas oleaginosas como cacahuete, colza, canola, girasol, safflower (cárdamo), amapola, mostaza, cáñamo, ricino, olivo, caléndula, *Punica* (granada), onagra, calabaza, lino, soja, borraja, árboles (palma oleífera, coco). Particularmente se prefieren plantas ricas en ácidos grasos de C18:2 y/o C18:3 como girasol, cárdamo, tabaco, verbasco, ajonjolí, algodón, calabaza, amapola, onagra, nogal, lino, cáñamo, cardo o cárdamo. Muy particularmente se prefieren plantas como cárdamo, girasol, amapola, onagra, nogal, lino o cáñamo.

Para el proceso descrito según la invención es ventajoso, adicionalmente a las secuencias de ácido nucleico introducidas en el proceso, introducir, según la reivindicación 2, otros ácidos nucleicos de acuerdo con la reivindicación 10.

En principio pueden usarse todos los genes del metabolismo de ácido graso o de los lípidos ventajosamente en combinación con la desaturasa  $\omega$ -3 de la invención para producir ácidos grasos poliinsaturados. Ventajosamente se usan genes del metabolismo de ácido graso o de lípidos que se seleccionan del grupo de acil-CoA-dehidrogenasa(s), acil-ACP[= acil carrier protein]-desaturasa(s), acil-ACP-tioesterasa(s), ácido graso-acil-transferasa(s), acil-CoA:lisofosfolípido-aciltransferasas, ácido graso-sintasa(s), ácido graso-hidroxilasa(s), acetil-coenzima A-carboxilasa(s), acil-coenzima A-oxidasa(s), ácido graso -desaturasa(s), ácido graso - acetilenasas, lipoxigenasas, triacilglicerol-lipasas, alenóxido-sintasas, hidroperóxido-liasas o ácido graso - elongasa(s) en combinación con la desaturasa  $\omega$ -3. Particularmente se prefieren genes seleccionados del grupo de las  $\Delta$ -4-desaturasas,  $\Delta$ -5-desaturasas,  $\Delta$ -6-desaturasas,  $\Delta$ -8-desaturasas,  $\Delta$ -9-desaturasas,  $\Delta$ -12-desaturasas,  $\Delta$ -5-elongasas,  $\Delta$ -6-elongasas o  $\Delta$ -9-elongasas en combinación con los genes previamente mencionados para la desaturasa  $\omega$ -3, en cuyo caso pueden usarse genes individuales o varios genes en combinación.

La desaturasa  $\omega$ -3 de la invención, en comparación con la desaturasa  $\omega$ -3 conocida, tiene la propiedad ventajosa de que puede desaturar un amplio espectro de ácidos grasos  $\omega$ -6, preferiblemente se desaturan ácidos grasos de C<sub>20</sub> y C<sub>22</sub> como ácidos grasos de C<sub>20:2</sub>, C<sub>20:3</sub>, C<sub>20:4</sub>, o C<sub>22:5</sub>. Aunque también se desaturan ácidos grasos C<sub>18</sub> más cortos como ácidos grasos de C<sub>18:2</sub> o C<sub>18:3</sub>. Mediante estas propiedades de la desaturasa  $\omega$ -3 es posible desplazar ventajosamente el espectro de ácidos grasos dentro de un organismo, ventajosamente dentro de una planta o un hongo, desde los ácidos grasos  $\omega$ -6 hacia los ácidos grasos  $\omega$ -3. Por la desaturasa  $\omega$ -3 de la invención se desaturan preferiblemente ácidos grasos de C<sub>20</sub>. Dentro del organismo estos ácidos grasos de la fuente de ácidos grasos se convierten en al menos 10 %, 15 %, 20 %, 25 % o 30 % en los correspondientes ácidos grasos  $\omega$ -3. Frente a los ácidos grasos de C<sub>18</sub>, la desaturasa  $\omega$ -3 tiene una actividad más baja en un factor de 10, lo que significa que solo aproximadamente 1,5 a 3 % de los ácidos grasos presentes en la fuente de ácidos grasos se convierten en los correspondientes ácidos grasos  $\omega$ -3. Los sustratos preferidos de la desaturasa  $\omega$ -3 de la invención son los ácidos grasos  $\omega$ -6 enlazados en fosfolípidos. La figura 9 muestra claramente en el ejemplo de la desaturación de ácido dihomo- $\gamma$ -linoléico [C<sub>20:4</sub> <sup>$\Delta$ 8,11,14</sup>], que durante la desaturación la desaturasa  $\omega$ -3 ventajosamente no distingue entre ácidos grasos enlazados en posición sn1 o sn2. Se desaturan ácidos grasos enlazados en los fosfolípidos tanto en posición sn1 como en posición sn2. Otra ventaja es que la desaturasa  $\omega$ -3 convierte una gama amplia de

fosfolípidos como fosfatidilcolina (= PC), fosfatidilinositol (= PIS) o fosfatidiletanolamina (= PE). Finalmente también pueden encontrarse productos de desaturación en los lípidos neutrales (= NL), es decir en los triglicéridos.

Debido a la actividad enzimática de los ácidos nucleicos usados en el proceso de la invención, que codifican para polipéptidos con actividad de desaturasa  $\omega$ -3 según la reivindicación 10, en combinación con secuencias de ácido nucleico que codifican para polipéptidos con actividad de  $\Delta$ -4,  $\Delta$ -5,  $\Delta$ -6,  $\Delta$ -8-desaturasa o  $\Delta$ -5-,  $\Delta$ -6- o  $\Delta$ -9-elongasa en el proceso de la invención pueden producirse ventajosamente los más diversos ácidos grasos poliinsaturados. Según la elección de los organismos usados para el proceso de la invención, como las plantas ventajosas pueden producirse mezclas de los diversos ácidos grasos poliinsaturados o ácidos grasos poliinsaturados individuales como EPA o DHA en forma libre o enlazada. Dependiendo de cuál composición de ácido graso predomina en la planta de partida (ácidos grasos de  $C_{18:2}$  o  $C_{18:3}$ ) así se generan ácidos grasos que se derivan de ácidos grasos de  $C_{18:2}$ , como GLA, DGLA o ARA o que se derivan de ácidos grasos de  $C_{18:3}$ , como SDA, ETA o EPA. Si en la planta usada para el proceso está presente solamente el ácido linoléico (= LA,  $C_{18:2}^{\Delta 9,12}$ ), entonces como productos del proceso primero se generan solamente GLA, DGLA y ARA, que pueden estar presente como ácidos grasos libres o enlazados. Gracias a la actividad de la desaturasa  $\omega$ -3 de la invención a partir de éstos pueden sintetizarse finalmente ácidos grasos  $\omega$ -3. Si en la planta usada en el proceso como ácido graso insaturado solo está el ácido  $\alpha$ -linoléico (= ALA,  $C_{18:3}^{\Delta 8,12,15}$ ), por ejemplo como en lino, entonces como productos del proceso pueden generarse solo SDA, ETA, EPA y/o DHA, los cuales pueden presentarse como ácidos grasos libres o enlazados, tal como se describió arriba. Gracias a la modificación de la actividad de la enzima desaturasa  $\omega$ -3 involucrada en la síntesis de manera ventajosa en combinación con la  $\Delta$ -4-,  $\Delta$ -5-,  $\Delta$ -6-desaturasa y/o  $\Delta$ -6-elongasa y/o  $\Delta$ -5-elongasa, o la  $\Delta$ -4-,  $\Delta$ -5-,  $\Delta$ -8-desaturasa, y/o  $\Delta$ -9-elongasa y/o  $\Delta$ -5-elongasa, en los organismos previamente mencionados, ventajosamente en las plantas previamente mencionadas, pueden producirse de manera dirigida solo productos individuales. Gracias a la actividad de la  $\Delta$ -6-desaturasa y  $\Delta$ -6-elongasa se generan, por ejemplo, GLA y DGLA o SDA y ETA, según la planta de partida y el ácido graso insaturado. Preferiblemente se generan DGLA o ETA o sus mezclas. Si la  $\Delta$ -5-desaturasa, la  $\Delta$ -5-elongasa y la  $\Delta$ -4-desaturasa se introducen adicionalmente a los organismos, ventajosamente a las plantas, entonces se generan adicionalmente ARA, EPA y/o DHA. Esto también es válido para los organismos a los que se había introducido previamente la  $\Delta$ -8-desaturasa y  $\Delta$ -9-elongasa. Ventajosamente se sintetizan solamente ARA, EPA o DHA o sus mezclas, de manera particularmente ventajosa solo EPA o DHA o sus mezclas, dependiendo del ácido graso presente en el organismo o en la planta que sirve como sustancia de partida para la síntesis. Puesto que se trata de cadenas de biosíntesis, los productos finales respectivos no se presentan como sustancias puras en los organismos. En el producto final siempre están contenidas pequeñas cantidades de compuestos precursores. Estas pequeñas cantidades son menores al 20 % en peso, ventajosamente menores al 15 % en peso, de manera particularmente ventajosa menores al 10 % en peso, de manera muy particularmente ventajosa menores al 5, 4, 3, 2 o 1 % en peso respecto del producto final DGLA, ETA o sus mezclas o ARA, EPA, DHA o sus mezclas, ventajosamente EPA o DHA o sus mezclas.

Además de la producción de los ácidos grasos de partida para la desaturasa  $\omega$ -3 de la invención, también pueden alimentarse al organismo ácidos grasos desde afuera. Por razones de costes se prefiere la producción en el organismo. Los sustratos preferidos de la desaturasa  $\omega$ -3 son: el ácido linoléico ( $C_{18:2}^{\Delta 9,12}$ ), el ácido  $\gamma$ -linoléico ( $C_{18:3}^{\Delta 8,9,12}$ ), el ácido eicosadienoico ( $C_{20:2}^{\Delta 11,14}$ ), el ácido dihomo- $\gamma$ -linoléico ( $C_{20:3}^{\Delta 8,11,14}$ ), el ácido araquidónico ( $C_{20:4}^{\Delta 9,8,11,14}$ ), el ácido docosatetraenoico ( $C_{22:4}^{\Delta 7,10,13,16}$ ) y el ácido docosapentaenoico ( $C_{22:5}^{\Delta 4,7,10,13,15}$ ).

Para aumentar el rendimiento en el proceso descrito para la producción de aceites y/o triglicéridos con un contenido ventajosamente elevado de ácidos grasos poliinsaturados es ventajoso aumentar la cantidad de producto de partida para la síntesis de ácido graso. Esto puede lograrse, por ejemplo, introduciendo un ácido nucleico al organismo que codifica para un polipéptido con actividad de  $\Delta$ -12-desaturasa. Esto es particularmente ventajoso en organismos que producen aceite, como colza, los cuales tienen un alto contenido de ácido oléico. Puesto que estos organismos tienen solo un bajo contenido de ácido linoléico (Mikoklajczak et al., Journal of the American Oil Chemical Society, 38, 1961, 678 - 681), es ventajoso el uso de las  $\Delta$ -12-desaturasas mencionadas para la producción del producto de partida ácido linoléico.

Los ácidos nucleicos usados en el método descrito provienen ventajosamente de plantas como algas, tales como Isochrysis, Mantoniella, Ostreococcus o Cryptocodinium, algas/diatomeas como Phaeodactylum o Thraustochitrum, musgos tales como Physcomitrella o Ceratodon o plantas superiores como las Primulaceae como Aleuritia, Calendula stellata, Osteospermum spinescens o Osteospermum hioseroides, microorganismos como hongos, tales como Aspergillus, Thraustochitrum, Phytophthora, Entomophthora, Mucor o Mortierella, bacterias como Shewanella, levaduras o animales tales como nematodos, como Caenorhabditis, insectos o peces. Las secuencias de ácido nucleico aisladas de acuerdo con la invención provienen ventajosamente de un animal del orden de los vertebrados. Las secuencias de ácido nucleico provienen preferiblemente de la clase de los vertebrados; Euteleostomi, Actinopterygii; Neopterygii; Taleortei; Euteleostei, Protacanthopterygii. Salmoniformes; Salmonidae u Oncorhinchus. De manera particularmente ventajosa, los ácidos nucleicos provienen de hongos, animales o de plantas como algas o musgos, preferiblemente del orden de los Salmoniformes, como de la familia de los Salmonidae, como del género Salmo, por ejemplo de los géneros y especies Oncorhynchus mykiss, Trutta trutta o Salmo trutta fario o de las diatomeas tales como los géneros Thallasiosira o Cryptocodinium.

En el método descrito se emplean ventajosamente las secuencias de ácido nucleico previamente mencionadas o su derivado u homólogos, los cuales codifican para polipéptidos que aún poseen la actividad enzimática de las proteínas codificadas por las secuencias de ácido nucleico. Estas secuencias se clonan individualmente o en combinación con las secuencias de ácido nucleico que codifican para la desaturasa  $\omega$ -3 en el constructo de expresión y se usan para la introducción y la expresión en organismos. Gracias a su construcción, estos constructos de expresión hacen posible una síntesis ventajosa óptima de los ácidos grasos poliinsaturados producidos en el proceso descrito.

El proceso descrito comprende además el paso de obtener una célula o un organismo completo que contenga las secuencias de ácido nucleico usadas en el proceso, en cuyo caso la célula y/o el organismo se transforma con una secuencia de aminoácidos de la invención que codifica para la desaturasa  $\omega$ -3, con un constructo génico o con un vector tal como se describe a continuación, sola o en combinación con otras secuencias de ácido nucleico que codifican para proteínas del metabolismo de ácido graso o de lípido. El proceso descrito comprende además el paso de obtener los aceites, lípidos o ácidos grasos libres del organismo o del cultivo. El cultivo puede ser, por ejemplo, un cultivo de fermentación, por ejemplo en el caso de cultivo de microorganismos como, por ejemplo, *Mortierella*, *Saccharomyces* o *Thraustochytrium* o un cultivo en invernadero o en campo de una planta. La célula producida de esta manera o el organismo producido de esta manera es ventajosamente una célula de un organismo que produce aceite, tal como una planta oleaginosa, como por ejemplo cacahuete, colza, canola, lino, cáñamo, cacahuete, soja, safflower (cárdamo), cáñamo, girasoles o borraja.

Por cultivo ha de entenderse, por ejemplo, el cultivo de células, tejidos u órganos vegetales sobre o en un medio nutritivo o de la planta entera sobre o en un sustrato, por ejemplo en hidrocultivo, en tierra de macetas o en suelo arado.

"Transgénico" o "recombinante" significa con respecto de, por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico, un casete de expresión (= constructo génico) o un vector que contiene la secuencia de ácido nucleico de la invención o un organismo transformado con las secuencias de ácido nucleico, casete de expresión o vector, todas aquellas construcciones realizadas mediante métodos de ingeniería genética en las que o bien

- a) la secuencia de ácido nucleico, o
- b) una secuencia genética de control conectada funcionalmente con la secuencia de ácido nucleico, por ejemplo un promotor,
- o
- c) (a) y (b)

no se encuentran en su ambiente genético natural o se han modificado mediante métodos de ingeniería genética, en cuyo caso la modificación puede ser, a manera de ejemplo, una sustitución, una adición, una supresión (deletion), inversión o inserción de uno o varios residuos de nucleótidos. Un ambiente genético natural significa el lugar (locus) natural genómico o cromosomal en el organismo original o la presencia en una biblioteca genómica. En el caso de una biblioteca genómica, se obtiene preferiblemente todavía, al menos en parte, el ambiente genético, natural de la secuencia de ácido nucleico. El ambiente flanquea la secuencia de ácido nucleico al menos en un lado y tiene una longitud de secuencia de al menos 50 bp, preferible de al menos 500 bp, particularmente preferible de al menos 1000 bp, muy particularmente preferible de al menos 5000 bp. Un case de expresión que tiene lugar naturalmente, por ejemplo la combinación que ocurre naturalmente del promotor natural de las secuencias de ácido nucleico con los genes respectivos de desaturasa  $\omega$ -3 se convierte en un casete de expresión transgénico si éste se modifica mediante métodos no naturales, sintéticos ("artificiales") como, por ejemplo, un tratamiento mutagénico. Métodos correspondientes se describen, por ejemplo, en US 5,565,350 o WO 00/15815.

En el contexto de la invención por organismo transgénico o planta transgénica ha de entenderse, tal como se mencionó previamente, que los ácidos nucleicos usados en el proceso no están en su sitio natural en el genoma de un organismo, en tal caso los ácidos nucleicos pueden expresarse de manera homóloga o heteróloga. Transgénico también significa sin embargo, tal como se mencionó, que los ácidos nucleicos escritos están en su lugar natural en el genoma de un organismo aunque la secuencia se ha modificado frente a la secuencia natural y/o que las secuencias de regulación de las secuencias naturales se han modificado. Por transgénica ha de entenderse preferiblemente la expresión de los ácidos nucleicos escritos en sitio no natural en el genoma; es decir que se presenta una expresión homóloga o preferiblemente heteróloga de los ácidos nucleicos. Los organismos transgénicos preferidos son hongos como *Mortierella*, musgos como *Physcomitrella*, algas como *Cryptocodium* o plantas como las plantas oleaginosas.

Como organismos u organismos huéspedes para los ácidos nucleicos, el casete de expresión o el vector usados en el proceso de la invención son adecuados en principio, de manera ventajosa, todos los organismos que están en

capacidad de sintetizar ácidos grasos, especialmente ácidos grasos insaturados, o que son adecuados para la expresión de genes recombinantes. A manera de ejemplo pueden mencionarse plantas como Brassicaceae, tales como Arabidopsis, Asteraceae tales como Calendula o plantas de cultivo como la soja, cacahuete, ricino, girasol, maíz, algodón, lino, colza, coco, palma oleífera, cártamo (*Carthamus tinctorius*) o granos de cacao, microorganismos como hongos, por ejemplo del género *Mortierella*, *Thraustochytrium*, *Saprolegnia* o *Pythium*, bacterias como el género *Escherichia* o *Shewanella*, levaduras como el género *Saccharomyces*, cianobacterias, ciliados, algas o protozoos como dinoflagelados, tales como *Cryptothecodinium*. Se prefieren organismos que pueden sintetizar aceites naturales en cantidades más grandes, como hongos tales como *Mortierella alpina*, *Pythium insidiosum* o plantas como soja, colza, coco, Palma oleífera, cárdamo, lino, cáñamo, ricino, caléndula, cacahuete, granos de cacao o girasol o levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, particularmente se prefieren soja, lino, colza, cárdamo, girasol, caléndula, mortierella o *Saccharomyces cerevisiae*. En principio también son adecuados como organismos huéspedes, además de los organismos transgénicos mencionados previamente, los animales transgénicos, ventajosamente animales no humanos, por ejemplo *C. elegans*.

Células huéspedes útiles se mencionan además en: Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzimology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990).

Cepas de expresión útiles, por ejemplo aquellas que tienen una baja actividad de proteasa, se describen en: Gottesman, S., *Gene Expression Technology: Methods in Enzimology* 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 119-128.

A éstas pertenecen células vegetales y determinados tejidos, órganos y partes de plantas en todas sus formas de presentación, como anteras, fibras, pelos radicales, tallos, embriones, callos, cotiledones, peciolos, material de cosecha, tejidos vegetales, tejido reproductivo y cultivos celulares, que se deriven de la propia planta transgénica y/o puedan usarse para producir la planta transgénica.

Plantas transgénicas que contienen ácidos grasos poliinsaturados sintetizados en el proceso de la invención pueden comercializarse directamente son que los aceites, lípidos o ácidos grasos sintetizados deban aislarse. Por plantas en el proceso de la invención se entienden las plantas enteras y las partes de las plantas, órganos vegetales o partes de la planta como hoja, tallo de la hoja, semillas, raíz, tubérculos, anteras, fibras, pelos radicales, tallo, embrión, callos, cotiledones, peciolos, material de cosecha, tejido vegetal, tejido reproductivo, cultivos celulares que se deriven de las plantas transgénicas y/o puedan usarse para producir las plantas transgénicas. Las semillas comprenden en este caso todas las partes de semilla como las vainas de semillas, células de epidermis y de la semilla, endosperma o tejidos de embriones. Sin embargo, los compuestos producidos en el proceso también pueden aislarse de los organismos, ventajosamente plantas en forma de sus aceites, grasa, lípidos y/o ácidos grasos libres. Los ácidos grasos poliinsaturados producidos por este método pueden recolectarse mediante cosecha de los organismos, o bien del cultivo en el que crecen, o bien del campo. Esto puede efectuarse prensando las partes de la planta o extrayendo de ellas, preferentemente de las semillas de la planta. En tal caso, los aceites, grasas, lípidos y/o ácidos grasos libres pueden obtenerse mediante el llamado golpeado frío o prensado en frío, sin aplicar calor al pensar. Para permitir que las partes de la planta, especialmente las semillas, se abran más fácilmente, primero se trituran, se someten a vapor o se tuestan. Las semillas tratadas previamente de esta manera pueden prensarse a continuación o someterse a extracción con hexano caliente. A continuación se retira el solvente. En el caso de microorganismos éstos se extraen después de la cosecha, por ejemplo directamente son más pasos de trabajo o después de la apertura mediante diferentes métodos conocidos por el experto técnico. De esta manera pueden aislarse más de 96 % de los compuestos preparados en el proceso. A continuación, los productos obtenidos de esta manera se siguen procesando, es decir se refinan. En este caso primero se retiran, por ejemplo, los mucílagos vegetales y la materia suspendida. El llamado retiro de los mucílagos puede efectuarse de manera enzimática o, por ejemplo, químicamente/físicamente mediante adición de ácido como ácido fosfórico. A continuación, los ácidos grasos libres se remueven mediante tratamiento con una base, por ejemplo hidróxido de sodio. Para retirar el hidróxido que permanezca en el producto, el producto obtenido se lava cuidadosamente y se seca. Para remover los colorantes contenidos aún en el producto, los productos se someten a un blanqueamiento con arcilla blanqueadora o con carbón activado. Al final, el producto se desodoriza además con vapor de agua, por ejemplo.

Los PUFAs o LCPUFAs producidos mediante este método son preferiblemente moléculas de ácido graso de C<sub>18</sub>, C<sub>20</sub> o C<sub>22</sub> con al menos dos enlaces dobles en la molécula de ácido graso, preferiblemente dos, tres, cuatro, cinco o seis enlaces dobles. Estas moléculas de ácido graso de C<sub>18</sub>, C<sub>20</sub> o C<sub>22</sub> pueden aislarse del organismo en forma de un aceite, un lípido o un ácido graso libre. Organismos adecuados son, por ejemplo, los mencionados previamente. Organismos preferidos son plantas transgénicas.

Se divulgan aceites, lípidos o ácidos grasos o fracciones de los mismos que se hayan preparado mediante el método arriba descrito, de manera particularmente preferida aceite, lípido o una composición de ácido graso que comprenda PUFAs y provengan de plantas transgénicas.

Tal como se ha descrito arriba, estos aceites, lípidos o ácidos grasos contienen ventajosamente 6 a 15 % de ácido palmítico, 1 a 6 % de ácido esteárico; 7 - 85 % de ácido oléico; 0,5 a 8 % de ácido vaccénico, 0,1 a 1 % de ácido aráquico, 7 a 25 % de ácidos grasos saturados, 8 a 85 % de ácidos grasos insaturados una vez y 60 a 85 % de ácidos grasos poliinsaturados, cada uno respecto del 100 % y del contenido total de ácido graso de los organismos.

5 Como ácido graso poliinsaturado ventajoso están contenidos en los ésteres de ácido graso o mezclas de ácido graso preferiblemente al menos 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 o 1 % de ácido araquidónico respecto del contenido total de ácido graso. Además, los ésteres de ácido graso o las mezclas de ácido graso que se hayan producido según el método de la invención contienen ventajosamente ácidos grasos seleccionados del grupo de los ácidos grasos: ácido erúxico (ácido 13-docosaenoico), ácido estercúlico (ácido 9,10-metilen octadec-9-enoico), ácido malválico (ácido 8,9-metilen heptadec-8-enoico), ácido chaulmoógrico (ácido ciclopenten-dodecanoico), ácido graso de furano (ácido 9,12-epoxi-ocdeca-9,11-dienoico), ácido vernónico (ácido 9,10-epoxioctadec-12-enoico), ácido tarírico (ácido 6-octadecinoico), ácido 6-nonadecinoico, ácido santálbico (ácido t11-octadecen-9-ynoico), ácido 6,9-octadecenynoico, ácido pirúlico (ácido t10-heptadecen-8-ynoico), ácido crepenynico (ácido 9-octadecen-12-ynoico), ácido 13,14-dihidroroféico, ácido octadecen-13-ene-9,11diynoico, ácido petroselénico (ácido cis-6-octadecenoico), ácido 9c,12t-octadecadienoico, ácido calendúlico (ácido 8t10t12c-octadecatrienoico), ácido catálpico (ácido 9t11t13c-octadecatrienoico), ácido eleosteárico (ácido 9c11t13t-octadecatrienoico), ácido jacárico (ácido 8c10t12c-octadecatrienoico), ácido punícico (ácido 9c11t13c-octadecatrienoico), ácido parinárico (ácido 9c11t13t15c-octadecatetraenoico), ácido pinolénico (ácido all-cis-5,9,12-octadecatrienoico), ácido labalénico (ácido 5,6-octadecadienalenoico), ácido ricinoléico (ácido 12-hidroxioléico) y/o ácido coriólico (ácido 13-hidroxi-9c,11t-octadecadienoico). Los ésteres de ácido graso o mezclas de ácidos grasos producidos según el método de la invención contienen ventajosamente menos de 0,1 % de, o no contienen, ácido butírico, colesterol, ácido clupanodónico (= ácido docosapentaenoico, C<sub>22:5</sub><sup>A4,8,12,15,21</sup>) y ácido nisínico (ácido tetracosahexaenoico, C<sub>23:6</sub><sup>Δ3,8,12,15,18,21</sup>).

25 Por el término "aceite", "lípido" o "grasa" se entiende una mezcla de ácidos grasos que contiene ácido(s) graso(s), insaturado(s), saturado(s), preferiblemente esterificado(s). Se prefiere que el aceite, lípido o grasa tengan un alto contenido de ácido(s) graso(s) poliinsaturados, libres o ventajosamente esterificados, principalmente ácido linoléico, ácido γ-linoléico, ácido dihomo-γ-linoleico, ácido araquidónico, ácido α-linolénico, ácido estearidónico, ácido eicosatetraenoico, ácido eicosapentaenoico, ácido docosapentaenoico o ácido docosahexaenoico. El contenido de ácidos grasos insaturados esterificados es preferiblemente de aproximadamente 30 %, más preferible un contenido de 50 %, aún más preferible un contenido de 60 %, 70 %, 80 % o más. Para la determinación, el contenido de ácido graso puede determinarse mediante cromatografía después de transferir los ácidos grasos a los ésteres metílicos mediante transesterificación. El aceite, lípido o grasa pueden comprender otros ácidos grasos saturados o insaturados, diferentes, por ejemplo ácido calendúlico, ácido palmítico, ácido palmitoléico, ácido esteárico, ácido oléico, etc. El contenido de los diferentes ácidos grasos en el aceite o grasa puede variar principalmente dependiendo del organismo de partida.

Los ácidos grasos poliinsaturados ventajosamente con al menos dos enlaces dobles, producidos según el método de la invención, son por ejemplo los esfingolípidos, fosfoglicéridos, lípidos, glicolípidos, fosfolípidos, monoacilglicerina, diacilglicerina, triacilglicerina u otros ésteres de ácido graso, tal como se describió arriba.

40 De los ácidos grasos poliinsaturados ventajosamente con al menos cinco o seis enlaces dobles, producidos en el proceso, pueden liberarse los ácidos grasos poliinsaturados contenidos, por ejemplo, mediante un tratamiento alcalino, por ejemplo KOH o NaOH acuosos o hidrólisis ácida, ventajosamente en presencia de un alcohol como metanol o etanol o por una disociación enzimática, y aislarse mediante separación de fases y subsiguiente acidificación sobre H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, por ejemplo. La liberación de los ácidos grasos también puede efectuarse directamente sin el procesamiento descrito previamente.

45 Después de introducirse a un organismo, ventajosamente a una célula vegetal o a una planta, los ácidos nucleicos usados en el proceso pueden o bien estar presentes en un plásmido separado, o integrarse, ventajosamente, al genoma de la célula huésped. En el caso de la integración al genoma, la integración puede ser aleatoria o sino efectuarse por una recombinación tal que el gen nativo se reemplaza por la copia introducida, por lo cual por parte de la célula se modula la producción del compuesto deseado, o mediante el uso de un gen en trans de modo que el gen está enlazado funcionalmente con una unidad de expresión funcional que contiene al menos una secuencia que garantiza la expresión de un gen y al menos una secuencia que garantiza la poliadenilación de un gen transcrito funcionalmente. Los ácidos nucleicos se introducen ventajosamente a los organismos mediante casetes de multiexpresión o constructos para expresión multiparalela, ventajosamente en las plantas para expresión multiparalela, específica para semillas, de los genes.

55 Musgos y algas son los únicos sistemas vegetales que producen cantidades considerables de ácidos grasos poliinsaturados, como el ácido araquidónico (ARA) y/o el ácido eicosapentaenoico (EPA) y/o el ácido docosahexaenoico (DHA). Los musgos contienen PUFAs en lípidos de membrana mientras que las algas, los organismos relacionados con las algas y algunos hongos también acumulan cantidades significativas de PUFAs en la fracción de triacilglicerol. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico que se aíslan de tales variedades que también acumulan PUFAs en la fracción de triacilglicerol son adecuadas de manera particularmente ventajosa para



el proceso de la invención y también para la modificación del sistema de producción de lípidos y de PUFAs en un huésped, principalmente en plantas tales como las oleaginosas, por ejemplo colza, canola, lino, cáñamo, soja, girasol, borraja. Por esta razón son aplicables ventajosamente en el proceso de la invención.

5 Como sustratos de los ácidos nucleicos usados en el proceso, los cuales codifican para polipéptidos con actividad desaturasa  $\omega$ -3, y/o de los otros ácidos nucleicos usados, tales como los ácidos nucleicos que codifican para polipéptidos del metabolismo de ácido graso o de lípido seleccionados del grupo acil-CoA-dehidrogenasa(s), acil-ACP[= acyl carrier protein]-desaturasa(s), acil-ACP-tioesterasa(s), ácido graso-acil-transferasa(s), acil-CoA:lisofofolípido-aciltransferasa(s), ácido graso - sintasa(s), ácido graso-hidroxilasa(s), acetil-coenzima A-carboxilasa(s), acil-coenzima A-oxidasa(s), ácido graso-desaturasa(s), ácido graso-acetilenasa(s), lipoxigenasa(a),  
10 triacilglicerol-lipasa(s), alenóxido sintasa(s), hidroperóxido-liasa(s) o ácido graso-elongasa(s) son adecuados ventajosamente ácidos grasos de C<sub>18</sub>, C<sub>20</sub> o C<sub>22</sub>. Los ácidos grasos convertidos en el proceso como sustratos, se hacen reaccionar preferiblemente en forma de sus ésteres fosfolípidos.

15 Para producir los PUFAs de cadena larga divulgados, los ácidos grasos de C<sub>18</sub> poliinsaturados primero deben desaturarse por la actividad enzimática de una desaturasa y a continuación elongarse en al menos dos átomos de carbono mediante una elongasa. Después de un ciclo de elongación, esta actividad enzimática conduce a ácidos grasos de C<sub>20</sub> y, después de dos ciclos de elongación a ácidos grasos de C<sub>22</sub>. La actividad de las desaturasas y elongasas usadas conduce preferiblemente a ácidos grasos de C<sub>18</sub>, C<sub>20</sub> y/o C<sub>22</sub> ventajosamente con al menos dos enlaces dobles en la molécula de ácido graso, preferiblemente con tres, cuatro, cinco o seis enlaces dobles, particularmente preferible a ácidos grasos de C<sub>20</sub> y/o C<sub>22</sub> con al menos dos enlaces dobles en la molécula de ácido graso, preferiblemente con tres, cuatro, cinco o seis enlaces dobles, muy particularmente preferible con cuatro, cinco o seis enlaces dobles en la molécula. Después de que una primera desaturación y la elongación han tenido lugar, pueden efectuarse otros pasos de desaturación y de elongación, como por ejemplo una desaturación tal en posición  $\Delta$ -5 y  $\Delta$ -4. Como productos del proceso de la invención particularmente se prefieren el ácido eicosatrieno, el ácido eicosapentaenoico, el ácido docosapentaenoico y/o el ácido docosahesaenoico. Los ácidos grasos de C<sub>20</sub> con al menos dos enlaces dobles en el ácido graso pueden elongarse mediante actividad enzimática de las enzimas  
20 usadas en el proceso en forma del ácido graso libre o en forma de los ésteres, tales como fosfolípidos, glicolípidos, esfingolípidos, fosfoglicéridos, monoacilglicerina, diacilglicerina o triacilglicerina.

25 El lugar de biosíntesis preferido de los ácidos grasos, aceites, lípidos o grasas en las plantas usadas ventajosamente es en general, por ejemplo, las semillas o las capas celulares de las semillas, de tal modo que sea práctica una expresión específica de semilla de los ácidos nucleicos usados en el proceso. Sin embargo, es lógico que la biosíntesis de ácidos grasos, aceites o lípidos no debe restringirse al tejido de las semillas sino que también puede efectuarse de una manera específica para tejidos en todas las demás partes de la planta, por ejemplo en las células de la epidermis o en los tubérculos.

30 Si en el proceso de la invención se usan microorganismos tales como levaduras, como *Saccharomyces* o *Schizosaccharomyces*, hongos tales como *Mortierella*, *Aspergillus*, *Phytophthora*, *Entomophthora*, *Mucor* o *Thraustochytrium*, algas como *Isochrysis*, *Phaeodactylum* o *Cryptocodium* como organismos, entonces estos organismos se cultivan preferiblemente en fermentación.

35 Debido al uso de los ácidos nucleicos de la invención que codifican para la desaturasa  $\omega$ -3 mencionada en las reivindicaciones 1 y 10, los ácidos grasos poliinsaturados producidos en el proceso pueden incrementarse en al menos 5 %, preferible en al menos 10 %, particularmente preferible en al menos 20 %, muy particularmente preferible en al menos 50 % frente al tipo silvestre de los organismos que no contienen los ácidos nucleicos de modo recombinante.

40 Mediante el proceso descrito, los ácidos grasos poliinsaturados producidos pueden incrementarse en los organismos usados en el proceso en principio de dos maneras. La fuente de ácidos grasos poliinsaturados y/o la fracción de los ácidos grasos poliinsaturados esterificados producidos mediante el proceso pueden incrementarse ventajosamente. Mediante el proceso de la invención, se incrementa ventajosamente la fuente de ácidos grasos poliinsaturados esterificados en los organismos transgénicos.

45 Si en el proceso de la invención se usan microorganismos como organismos, entonces éstos se cultivan o se crían dependiendo del organismo huésped de una manera conocida por el experto en la materia. Los microorganismos se cultivan por lo regular en un medio líquido que contiene una fuente de carbono, la mayoría de las veces en forma de azúcar, una fuente de nitrógeno, la mayoría de las veces en forma de fuentes orgánicas de nitrógeno como el extracto de levadura o sales como sulfato de amonio, microelementos como sales de hierro, manganeso y magnesio, y opcionalmente vitaminas, a temperaturas entre 0°C y 100°C, preferible entre 10°C a 60°C suministrando oxígeno. En tal caso, el pH del líquido nutriente puede mantenerse en un valor fijo, es decir puede regularse durante el cultivo, pero también puede no regularse. El cultivo puede efectuarse en forma de lotes o de manera continua. Los nutrientes pueden cargarse al inicio de la fermentación o suministrarse después de manera semi-continua o continua.

Los ácidos grasos poliinsaturados producidos pueden aislarse de los organismos según métodos conocidos por el experto en la materia tal como se han descrito arriba. Por ejemplo mediante extracción, destilación, cristalización, opcionalmente mediante precipitación de sal y/o cromatografía. Para esto, previamente los organismos pueden además abrirse de manera ventajosa.

- 5 El proceso descrito se realiza ventajosamente, si los organismos huéspedes son microorganismos, a una temperatura entre 0°C a 95°C, preferible entre 10°C a 85°C, particularmente preferible entre 15°C a 75 °C, muy particularmente preferible entre 15°C a 45°C.

El valor de pH se mantiene en tal caso ventajosamente entre pH 4 y pH 12, preferible entre pH 6 y pH 9, particularmente preferible entre pH 7 y pH 8.

- 10 El proceso descrito puede operarse a manera de lotes, semi-continuamente o continuamente. Un resumen sobre los métodos de cultivo conocidos se encuentra en el libro de texto de Chmiel (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Tecnología de bioprocesos 1. Introducción a la tecnología de bioprocesos) (editorial Gustav Physcher Verlag, Stuttgart, 1991)) o en el libro de texto de Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Bioreactores y dispositivos periféricos) (editorial Vieweg Verlag, Brunswick/Wiesbaden, 1994)).

- 15 El medio de cultivo a usarse tiene que satisfacer de manera adecuada los requerimientos de las cepas o especies respectivas. Las descripciones de medios de cultivo de diversos microorganismos están contenidas en el manual "Manual of Methods for General Bacteriology" de la American Society for Bacteriology (Washington D. C., USA, 1981).

- 20 Tal como se ha descrito arriba, estos medios que pueden emplearse comprenden habitualmente una o más fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, sales inorgánicas, vitaminas y/o microelementos.

- 25 Las fuentes preferidas de carbono son azúcares tales como mono-, di- o polisacáridos. Muy buenas fuentes de carbono son, por ejemplo, glucosa, fructosa, manosa, galactosa, ribosa, sorbosa, ribulosa, lactosa, maltosa, sacarosa, rafinosa, almidón o celulosa. A los medios también puede adicionarse azúcar mediante compuestos complejos como melazas u otros productos secundarios del refinamiento de azúcares. También puede ser ventajoso adicionar mezclas de diversas fuentes de carbono. Otras posibles fuentes de carbono son aceites y grasas como, por ejemplo, aceite de soja, aceite de girasol, aceite de maní y/o grasa de coco, ácidos grasos como, por ejemplo, ácido palmítico, ácido esteárico y/o ácido linoléico, alcoholes y/o polialcoholes como, por ejemplo, glicerina, metanol y/o etanol y/o ácidos orgánicos como, por ejemplo, ácido acético y/o ácido láctico.

- 30 Las fuentes de nitrógeno son habitualmente compuestos de nitrógeno orgánicos o inorgánicos o materiales que contienen estos compuestos. Fuentes de nitrógeno a manera de ejemplo comprenden amoníaco en forma líquida o gaseosa o sales de amonio como sulfato de amonio, cloruro de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio o nitrato de amonio, nitratos, urea, aminoácidos o fuentes complejas de nitrógeno, tales como líquido de maíz macerado, harina de soja, proteína de soja, extracto de levadura, extracto de carne y otros. Las fuentes de nitrógeno pueden usarse individualmente o como mezcla. Los compuestos de sal inorgánicos que puede estar contenidos en los medios comprenden las sales de cloruro, fósforo o sulfato de calcio, magnesio, sodio, cobalto, molibdeno, potasio, mananeso, cinc, cobre y hierro.

Como fuente de azufre para la producción de productos químicos finos azufrados, principalmente de metionina, pueden usarse compuestos azufrados inorgánicos como, por ejemplo, sulfatos, sulfitos, ditionitos, tetracionatos, tiosulfatos, sulfuros pero también compuestos orgánicos de azufre como mercaptanos y tioles.

- 40 Como fuente de fósforo pueden usarse ácido fosfórico, dihidrofosfato de potasio o hidrofosfato dipotásico o las sales correspondientes que contienen sodio.

Al medio pueden adicionarse formadores de complejos a finde mantener los iones metálicos en solución. Formadores de quelatos particularmente adecuados comprenden dihidroxifenoles como catecol o protocatecuato, o ácidos orgánicos como ácido cítrico.

- 45 Los medios de fermentación empleados para el cultivo de microorganismos también contienen usualmente otros factores de crecimiento como vitaminas o promotores de crecimiento, a los cuales pertenecen, por ejemplo, biotina, riboflavina, tiamina, ácido fólico, ácido nicotínico, pantotenato y piridoxina. Los factores de crecimiento y las sales provienen con frecuencia de componentes complejos del medio, como extracto de levadura, melazas, líquido de maíz macerado y similares. Al medio de cultivo pueden adicionarse, además, precursores adecuados. La composición exacta de los compuestos del medio depende fuertemente del respectivo experimento y se decide individualmente para cada caso específico. La información sobre optimización de medios se encuentra disponible en el libro de texto "Applied Microbiol. Physiology, A Practical Approach" (Editores P.M. Rhodes, P.F. Stanbury, IRL

Press (1997) páginas 53-73, ISBN 0 19 963577 3). Los medios de crecimiento también pueden referirse aquí a oferentes comerciales como Standard 1 (Merck) o BHI (Brain heart infusion, DIFCO) y similares.

5 Todos los componentes de un medio se esterilizan o bien por calor (20 min a 1,5 bar y 121°C) o bien mediante filtración estéril. Los componentes pueden esterilizarse o bien juntos o, si es necesario, por separado. Todos los componentes del medio pueden adicionarse al inicio del cultivo u opcionalmente de manera continua o por cargas.

10 La temperatura del cultivo se encuentra normalmente entre 15°C y 45°C, preferiblemente a 25°C hasta 40 °C y puede mantenerse constante o modificarse durante el experimento. El valor de pH del medio debe encontrarse en el rango de 5 a 8,5, preferiblemente alrededor de 7,0. El valor de pH para el cultivo puede controlarse adicionando compuestos básicos como hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, amoníaco o amoníaco acuoso o compuestos ácidos como ácido fosfórico o ácido sulfúrico. Para controlar la formación de espuma pueden emplearse agentes antiespumantes como, por ejemplo, éster poliglicólico de ácido graso. Para mantener la estabilidad de plásmidos pueden agregarse al medio sustancias que actúan selectivamente, como por ejemplo antibióticos. Para mantener las condiciones aeróbicas se introduce al cultivo oxígeno o mezclas gaseosas oxigenadas como, por ejemplo, aire del ambiente. La temperatura del cultivo se encuentra normalmente a 20°C a 45°C y preferiblemente de 25°C a 40°C. El cultivo continúa hasta que se haya formado un máximo del producto deseado. Este objetivo se logra normalmente en el transcurso de 10 horas a 160 horas.

Los caldos de fermentación obtenidos de esta manera que contienen principalmente ácidos grasos poliinsaturados, tienen usualmente una masa seca de 7,5 a 25 % en peso.

20 A continuación, el caldo de fermentación puede procesarse más. Dependiendo del requisito, la biomasa puede removerse total o parcialmente del caldo de fermentación mediante métodos de separación como, por ejemplo, centrifugación, filtración, decantación o una combinación de estos métodos o puede dejarse en el mismo. La biomasa se procesa ventajosamente después de separarse.

25 El caldo de fermentación también puede, sin embargo, espesarse o concentrarse mediante métodos conocidos tales como, por ejemplo, la ayuda del evaporador de rotación, del evaporador de película delgada, evaporador de película caída, mediante ósmosis inversa o mediante nanofiltración, sin separación de células. Este caldo de fermentación concentrado puede procesarse finalmente para obtener los ácidos grasos allí contenidos.

30 Los ácidos grasos obtenidos en el proceso como material de partida también son adecuados como material de partida para la síntesis química de más productos valiosos. Pueden usarse, por ejemplo, en combinación uno con otro o solos para la preparación de productos farmacéuticos, productos alimenticios, comida para animales o cosméticos.

Las secuencias de ácido nucleico usadas en el proceso que codifican para proteínas con actividad desaturasa  $\omega$ -3 se introducen ventajosamente solas o preferiblemente en combinación con otros genes de la síntesis de ácidos grasos en un casete de expresión (= constructo de ácido nucleico), que ventajosamente hace posible la expresión de los ácidos nucleicos en un organismo, a una planta o a un microorganismo.

35 Para introducirse los ácidos nucleicos usados en el proceso de una manera conocida se someten ventajosamente a una amplificación y una ligazón. Preferiblemente se procede de conformidad al protocolo de la polimerasa de ADN-Pfu o de una mezcla de polimerasa de ADN<sub>a</sub> Pfu/Taq. Los cebadores se seleccionan de conformidad a la secuencia a amplificar. Los cebadores (primer) se seleccionan de manera conveniente de tal modo que el amplificado comprende la secuencia codogénica completa del codón de inicio (start) hasta el codón de detención (stop).

40 Después de la amplificación se analiza convenientemente el amplificado. Por ejemplo, el análisis puede efectuarse según la separación electroforética en gel con respecto a la calidad y a la cantidad. A continuación, el amplificado puede purificarse según un protocolo estándar (por ejemplo QIAGEN). Una alícuota del amplificado purificado se pone a disposición luego para la subsiguiente clonación. Los vectores de clonación son conocidos en general para el experto en la materia. A éstos pertenecen principalmente vectores que son replicables en sistemas microbianos, es decir ante todo vectores que garantizan una clonación eficiente en levaduras u hongos, y hacen posible la transformación estable de plantas. Han de mencionarse principalmente diferentes sistemas de vectores adecuados para la transformación mediada por ADN-T, binarios y co-integrados. Sistemas de vectores de este tipo por lo regular se caracterizan porque contienen al menos los genes vir que se requieren para la transformación mediada por Agrobacterium así como las secuencias que delimitan el ADN-T (T-DNA-border). Estos sistemas de vectores también comprenden preferiblemente otras regiones cis-regulatorias como promotores y terminadores y/o marcadores de selección con los cual pueden identificarse de manera correspondiente los organismos transformados. Mientras que los sistemas de vector co-integrados tienen genes vir y secuencias ADN-T dispuestas en el mismo vector, los sistemas binarios se basan en al menos dos vectores, uno de los cuales lleva genes vir pero no ADN-T y un segundo lleva ADN-T, pero no genes vir. De esta manera, los vectores mencionados de último son relativamente pequeños, fáciles de manipular y de replicar tanto en E.-coli como también en Agrobacterium. A estos vectores binarios pertenecen vectores de las series pBIB-HIG, pZP, pBecks, pGreen. De acuerdo con la invención se usan preferiblemente Bin19, pBI101, pBinAR, pGPTV y pCAMBIA. Un resumen de los vectores binarios y de su

utilización son dados por Hellens et al, Trends in Plant Science (2000) 5, 446-451. Para la preparación de vectores primero puede(n) linealizarse endonucleasa(s) de restricción y luego modificarse enzimáticamente de manera adecuada. Después se purifica el vector y se emplea una alícuota para la clonación. En la clonación, el amplificado cortado enzimáticamente y, si se requiere, purificado se clona junto con fragmentos de vector preparados de manera similar usando ligasa. En este caso, un constructo de ácido nucleico específico, o un constructo de vector o de plásmido pueden tener uno o también varios segmentos de gen codogénico. Los segmentos de gen codogénico en estos constructos están preferiblemente conectados de manera funcional con secuencias regulatorias. A las secuencias regulatorias pertenecen principalmente secuencias vegetales como los promotores y terminadores descritos. Los constructos pueden propagarse en condiciones selectivas de manera ventajosamente estable en microorganismos, principalmente en *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens* y hacer posible una transferencia de ADN heterólogo en plantas o microorganismos.

Usando ventajosamente vectores de clonación, los ácidos nucleicos usados en el proceso, los ácidos nucleicos y los constructos de ácido nucleico pueden introducirse en organismos como microorganismos o, ventajosamente, en plantas y de esta manera en la transformación de las plantas, como aquellas que se publican y se citan en: Plant Molecular Biology and Biotechnology (CRC Press, Boca Raton, Florida), Capítulo 6/7, páginas 71-119 (1993); F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; en: Transgenic Plants, volumen 1, Engineering and Utilization, editors: Kung y R. Wu, Academic Press, 1993, 15-38; B. Jené et al., Techniques for Gene Transfer, en: Transgenic Plants, volumen 1, Engineering and Utilization, editors: Kung y R. Wu, Academic Press (1993), 128-143; Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225). Los ácidos nucleicos usados en el proceso, los ácidos nucleicos y los constructos de ácido nucleico y/o vectores pueden usarse para la modificación por ingeniería genética de un amplio espectro de organismos, ventajosamente de plantas, de modo éstas se vuelvan mejores y/o más eficientes productoras de PUFAs.

Existe una serie de mecanismos a través de los cuales es posible una modificación de la proteína de desaturasa  $\omega$ -3 descrita así como de las otras proteínas usadas en el proceso como las proteínas de  $\Delta$ -9-elongasa,  $\Delta$ -6-desaturasa,  $\Delta$ -8-desaturasa,  $\Delta$ -6-elongasa,  $\Delta$ -5-desaturasa, A-5-elongasa o  $\Delta$ -4-desaturasa de tal modo que el rendimiento, producción y/o eficiencia de la producción de los ácidos grasos ventajosamente poliinsaturados en una planta, preferiblemente en una planta oleaginosa o en un microorganismo puede influenciarse directamente debido a esta proteína modificada. La cantidad o la actividad de las proteínas o genes de A-9-elongasa,  $\Delta$ -6-desaturasa,  $\Delta$ -8-desaturasa,  $\Delta$ -6-elongasa,  $\Delta$ -5-desaturasa,  $\Delta$ -5-elongasa,  $\Delta$ -4-desaturasa o desaturasa  $\omega$ -3 pueden incrementarse de tal modo que se produzcan cantidades más grandes de los productos génicos y de esta manera, en últimas, cantidades más grandes de los compuestos de la fórmula general I. Es posible una síntesis de novo en un organismo, en el que esté ausente la actividad y la capacidad para la biosíntesis de los compuestos antes de la introducción del/ de los gene(s) correspondientes. Lo correspondiente es válido para la combinación con otras desaturasas o elongasas u otras enzimas del metabolismo de ácido graso y de lípido. El uso de secuencias diferentes, divergentes, es decir secuencias que se diferencian al nivel de secuencia de ADN, también puede ser ventajoso; o el uso de promotores para expresión génica que hace posible una expresión génica temporal diferente, por ejemplo dependiente del grado de madurez de una semilla o de un tejido que almacena aceite.

Introducir un gen de  $\Delta$ -9-elongasa,  $\Delta$ -6-desaturasa,  $\Delta$ -8-desaturasa,  $\Delta$ -6-elongasa,  $\Delta$ -5-desaturasa,  $\Delta$ -5-elongasa, A-4-desaturasa y/o desaturasa  $\omega$ -3 en un organismo solos o en combinación con otros genes en una célula puede no solo incrementar el flujo de la biosíntesis hacia el producto final sino también incrementar la composición correspondiente de triacilglicerina o crearla de novo. Igualmente puede incrementarse la cantidad o actividad de otros genes en la importación de nutrientes que son necesarios para la biosíntesis de uno o varios ácidos grasos, aceites, lípidos polares y/o neutrales de tal modo que la concentración de estos precursores, cofactores o compuestos intermedios se incrementa dentro de las células o dentro del compartimiento de almacenamiento, por lo cual la capacidad de las células para producir PUFAs se incrementa más, como se describe a continuación. Mediante la optimización de la actividad o el incremento de la cantidad de uno o más genes  $\Delta$ -9-elongasa,  $\Delta$ -6-desaturasa,  $\Delta$ -8-desaturasa,  $\Delta$ -6-elongasa,  $\Delta$ -5-desaturasa,  $\Delta$ -5-elongasa, A-4-desaturasa o desaturasa  $\omega$ -3, que intervienen en la biosíntesis de estos compuestos, o mediante la destrucción de la actividad de uno o varios genes que intervienen en el catabolismo de estos compuestos, puede ser posible incrementar el rendimiento, producción y/o eficiencia de la producción de las moléculas de ácido graso y lípido de los organismos y ventajosamente de las plantas.

Las moléculas de ácidos nucleicos usados en el proceso divulgado codifican para proteínas o partes de éstas, en cuyo caso la proteína o la proteína

individual o las partes de la misma que contienen una secuencia de aminoácido con suficiente homología a una secuencia de aminoácido que está representada en las secuencias SEQ ID NO: 2 de tal modo que la proteína o parte de la misma todavía tienen una actividad desaturasa  $\omega$ -3. La proteína o las partes de la misma que se codifica(n) por la(s) molécula(s) preferiblemente tienen además su actividad enzimática esencial y la capacidad de intervenir en el metabolismo de compuestos necesarios para la formación de membranas celulares o corpúsculos de lípidos en organismos, ventajosamente en plantas o en el transporte de moléculas a través estas membranas. Las proteínas codificadas por las moléculas de ácido nucleico son ventajosamente idénticas en preferentemente al

menos cerca de 70 % y más preferiblemente en al menos cerca de 80 % o 90 % y lo más preferiblemente en al menos cerca de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más, a la secuencia de aminoácidos representadas en la SEQ ID NO: 2. En el contexto de la invención por homología u homólogo se entiende identidad o idéntico.

5 La homología se calculó por toda la región de secuencia de aminoácido o ácido nucleico. Para comparar las diferentes secuencias, para el experto en la materia se encuentra disponible una serie de programas que se basan en diferentes algoritmos. En tal caso, los algoritmos de Needleman y Wunsch o Smith y Waterman proporcionan resultados particularmente confiables. Para la comparación de secuencia se usó el programa PileUp (J. Mol. Evolution., 25, 351-360, 1987, Higgins et al., CABIOS, 5 1989: 151-153) o el programa Gap y BestPhyt [Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. 48; 443-453 (1970) y Smith and Waterman (Adv. Appl. Math. 2; 482-489, (1981))] que están contenidos en el paquete de software GCG [Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711. (1991)] Los valores de homología de secuencia indicados en porcentaje se determinaron con el programa GAP por toda la región de secuencia con los siguientes ajustes: Gap Weight: 50, Length Weight: 3, Average Match: 10.000 y Average Mismatch: 0.000. Estos ajustes se usaron siempre, si no se indica algo diferente, como ajustes estándar para comparaciones de secuencias.

15 Por actividad enzimática esencial de la desaturasa  $\omega$ -3 usada en el proceso descrito ha de entenderse que frente a las proteínas / enzimas codificadas por la secuencia SEQ ID NO: 1 y sus derivados, tiene aún al menos una actividad enzimática de al menos 10 %, preferible de 20 %, particularmente preferible de 30 % y muy particularmente 40 % y de esta manera pueden intervenir en el metabolismo de compuestos necesarios para la formación de ácidos grasos, ésteres de ácido graso tales como diacilglicéridos y/o triacilglicéridos en un organismo, ventajosamente una planta o célula vegetal, o en el transporte de moléculas a través de membranas, en cuyo caso se consideran cadenas de carbono de C<sub>18</sub>, C<sub>20</sub> o C<sub>22</sub> en la molécula de ácido graso con enlaces dobles en al menos dos, ventajosamente tres, cuatro, cinco o seis sitios.

25 Los ácidos nucleicos utilizables ventajosamente en el proceso proceden de bacterias, hongos, diatomeas, animales como *Caenorhabditis* o plantas como algas o musgos como de los géneros *Shewanella*, *Physcomitrella*, *Thraustochytrium*, *Fusarium*, *Phytophthora*, *Ceratodon*, *Isochrysis*, *Aleurita*, *Muscarioides*, *Mortierella*, *Phaeodactylum*, *Cryptocodinium*, especialmente de los géneros y especies *Thalassiosira pseudonana*, *Euglena gracilis*, *Physcomitrella patens*, *Phytophthora infestans*, *Fusarium gramineum*, *Cryptocodinium cohnii*, *Ceratodon purpureus*, *Isochrysis galbana*, *Aleurita farinosa*, *Thraustochytrium* sp., *Muscarioides viallii*, *Mortierella alpina*, *Phaeodactylum tricomutum* o *Caenorhabditis elegans* o particularmente ventajosamente *Phytophthora infestans*, *Thalassiosira pseudonana* o *Cryptocodinium cohnii*.

30 De manera alternativa en el proceso descrito pueden usarse las secuencias de nucleótidos que codifican para desaturasa  $\omega$ -3 y que hibridan ventajosamente en condiciones rigurosas (stringent) en una secuencia de nucleótido como se representa en SEQ ID NO: 1.

35 Las secuencias de ácido nucleico usadas en el proceso se introducen en un casete de expresión que hace posible la expresión de los ácidos nucleicos en organismos tales como microorganismos o plantas.

En tal caso, las secuencias de ácido nucleico, que codifican para la desaturasa  $\omega$ -3, están funcionalmente conectadas con una o varias señales de regulación, de manera ventajosa, para incrementar la expresión génica. Estas secuencias regulatorias deben hacer posible la expresión dirigida de los genes y de la expresión de proteína. Esto puede significar según el organismo huésped, por ejemplo, que el gen solo se expresa y/o sobre-expresa después de la inducción, o que se expresa y/o se sobre-expresa inmediatamente. Estas regulatorias son, por ejemplo, secuencias a las que se enlazan inductores o represores y de esta manera regulan la expresión del ácido nucleico. Adicionalmente a estas nuevas secuencias de regulación o en lugar de estas secuencias la regulación natural de estas secuencias puede estar presente todavía antes que los propios genes estructurales y opcionalmente han sido modificados genéticamente, de tal modo que la regulación natural se desconecta y se eleva la expresión de los genes. El casete de expresión (= constructo de expresión = constructo génico) puede, sin embargo, estar construido de manera más simple; es decir, no se insertaron señales regulatorias adicionales antes que la secuencia de ácido nucleico o sus derivados y no se removió el promotor natural con su regulación. En lugar de esto, la secuencia regulatoria natural mutó de tal manera que la regulación ya no tiene lugar y/o la expresión aumenta. Estos promotores modificados pueden introducirse en forma de secuencias parciales (= promotor con partes de las secuencias de ácido nucleico de la invención) o también solos antes del gen natural para incrementar la actividad. El constructo génico también puede contener además, de manera ventajosa, una o varias de las llamadas "secuencias enhancer" conectadas funcionalmente con el promotor, las cuales hacen posible una expresión elevada de la secuencia de ácido nucleico. También pueden insertarse secuencias adicionales ventajosas en el extremo 3' de las secuencias de ADN como otros elementos regulatorios o terminadores. Los genes de desaturasa-  $\omega$ -3 pueden estar contenidos en una o varias copias en el casete de expresión (= constructo génico). Lo mismo es válido para los otros genes de la biosíntesis del ácido graso que se usan en combinación con la desaturasa  $\omega$ -3 de la invención. Ventajosamente solo una copia de los genes está presente respectivamente en el casete de expresión. Este constructo génico o los constructos génicos pueden expresarse en el organismo huésped. En tal caso, el constructo génico o los constructos génicos pueden insertarse en uno o varios vectores y estar

presentes libres en la célula o, sin embargo, insertarse en el genoma. Es ventajoso para la inserción de otros genes en el genoma huésped si los genes a expresarse se presentan juntos en el constructo génico.

Las secuencias regulatorias o factores pueden tener en tal caso, tal como se ha descrito arriba, preferiblemente un efecto positivo en la expresión génica de los genes introducidos e incrementarla de esta manera. De este modo puede efectuarse un refuerzo de los elementos regulatorios de manera ventajosa a nivel del nivel de transcripción, usando fuertes señales de transcripción como promotores y/o "enhancer". Además, sin embargo, también es posible un refuerzo de la traducción (translation) mejorando, por ejemplo, la estabilidad del ARN.

Además se divulgan uno o varios constructos génicos que contienen una o varias secuencias que se definen mediante SEQ ID NO: 1 o sus derivados y que codifican para polipéptidos según SEQ ID NO: 2. Las proteínas de desaturasa  $\omega$ -3 mencionadas conducen ventajosamente en tal caso a una desaturación de ácidos grasos  $\omega$ -6, en cuyo caso el sustrato tiene ventajosamente dos, tres, cuatro o cinco enlaces dobles y tiene ventajosamente 18, 20 o 22 átomos de carbono en la molécula de ácido graso. Lo mismo es válido para sus homólogos, derivados o análogos que están enlazados funcionalmente con una o varias señales de regulación, de manera ventajosa para incrementar la expresión génica.

Las secuencias de regulación ventajosas para el nuevo método se presentan, por ejemplo, en promotores tales como el promotor *cos*, *tac*, *trp*, *tet*, *trp-tet*, *lpp*, *lac*, *lpp-lac*-, *laclq*, *T7*, *T5*, *T3*, *gal*, *trc*, *ara*, *SP6*,  $\lambda$ -PR o  $\lambda$ -PL y se aplican de manera ventajosa en bacterias gram-negativas. Otras secuencias de regulación ventajosas se presentan, por ejemplo, en los promotores gram-positivos *amy* y *SPO2*, en los promotores de levadura o de hongo *ADC1*, *MF $\alpha$* , *AC*, *P-60*, *CIC1*, *GAPDH*, *TEF*, *rp28*, *ADH* o en los promotores vegetales *CaMV/35S* [Franck et al., *Cell* 21 (1980) 285-294], *PRP1* [Ward et al., *Plant Mol. Biol.* 22 (1993)], *SSU*, *OCS*, *lib4*, *usp*, *STLS1*, *B33*, *nos* o en el promotor de ubiquitina o faseolina. En este contexto también son ventajosos los promotores inducibles como los promotores descritos en EP-A-0 388 186 (inducibles por bencilsulfonamida), Plant J. 2, 1992:397-404 (Gatz et al., inducibles por tetraciclina), EP-A-0 335 528 (inducibles por ácido abscísico) o WO 93/21334 (inducibles con etanol o ciclohexenol). Otros promotores vegetales adecuados son el promotor de *FBPasa* citosólica o el promotor *ST-LSI* de la patata (Stockhaus et al., *EMBO J.* 8, 1989, 2445), el promotor de la fosforibosilpirofosfatamidotransferasa de glicina *max* (número de acceso de Genbank U87999) o el promotor específico de nodos descrito en la EP-A-0 249 676. Promotores particularmente ventajosos son promotores que hacen posible la expresión en tejidos que intervienen en la biosíntesis de ácido graso. Promotores muy particularmente ventajosos son promotores específicos de semillas, como el promotor *USP* de acuerdo con la práctica pero también otros promotores como el promotor *LeB4*, *DC3*, *faseolina* o *napina*. Otros promotores particularmente ventajosos son promotores específicos de semilla que pueden usarse para plantas monocotiledóneas o dicotiledóneas y se describen en US 5,608,152 (promotor de *napina* de colza), WO 98/45461 (promotor de *oleosina* de *arabidopsis*), US 5,504,200 (promotor de *faseolina* de *Faseolus vulgaris*), WO 91/13980 (promotor *Bce4* de *Brassica*), por Bäumlein et al., *Plant J.*, 2, 2, 1992:233-239 (promotor *LeB4* de una leguminosa), en cuyo caso estos promotores son adecuados para las dicotiledóneas. Los siguientes promotores son adecuados, por ejemplo, para monocotiledóneas: promotores *lpt-2* o *lpt-1* de cebada (WO 95/15389 y WO 95/23230), promotor *hordeína* de Cebada y otros promotores adecuados descritos en WO 99/16890.

En principio, para el nuevo método es posible usar todos los promotores naturales con sus secuencias de regulación, tales como los arriba mencionados. Asimismo es posible y ventajoso usar promotores sintéticos, ya sea adicionalmente o solos, particularmente cuando son mediadores en una expresión específica de semilla, tal como se describe, por ejemplo, en WO 99/16890.

Para lograr un contenido particularmente alto de PUFAs ante todo en plantas transgénicas, la desaturasa  $\omega$ -3 y/o los genes de biosíntesis de PUFA deben expresarse ventajosamente de manera específica para semillas en semillas oleaginosas. Para este propósito pueden usarse promotores específicos de semillas, o aquellos promotores que son activos en el embrión y/o en la endosperma. Los promotores específicos de semillas pueden aislarse en principio tanto de las plantas dicotiledóneas como también de las monocotiledóneas. Promotores ventajosos preferidos se listan a continuación: *USP* (= unknown seed protein) y *Vicilin* (*Vicia faba*) [Bäumlein et al., *Mol. Gen. Genet.*, 1991, 225(3)], *napina* (colza) [US 5,608,152], *Acil-Carrier Protein* (colza) [US 5,315,001 y WO 92/18634], *oleosina* (*Arabidopsis thaliana*) [WO 98/45461 y WO 93/20216], *faseolina* (*Faseolus vulgaris*) [US 5,504,200], *Bce4* [WO 91/13980], leguminosas *B4* (promotor *LegB4*) [Bäumlein et al., *Plant J.*, 2,2, 1992], *Lpt2* y *Lpt1* (cebada) [WO 95/15389 y WO95/23230], promotores específicos de semillas a partir de arroz, maíz y trigo (WO 99/16890), *Amy32b*, *Amy 6-6* y *aleuraina* [US 5,677,474], *Bce4* (colza) [US 5,530,149], *glicinina* (soja) [EP 571 741], *fosfoenolpiruvato carboxilasa* (soja) [JP 06/62870], *ADR12-2* (soja) [WO 98/08962], *isocitratliasa* (colza) [US 5,689,040] o  $\alpha$ -amilasa (cebada) [EP 781 849].

La expresión de los genes vegetales también puede facilitarse mediante un promotor inducible químicamente (véase un resumen en Gatz 1997, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48:89-108). Promotores inducibles químicamente son particularmente adecuados cuando se desea que la expresión del gen se efectúe de una manera específica en el tiempo. Ejemplos de tales promotores son: un promotor inducible por ácido salicílico (WO 95/19443), un promotor inducible por tetraciclina (Gatz et al. (1992) *Plant J.* 2, 397-404) y un promotor inducible por etanol.

Para asegurar una integración estable de los genes de biosíntesis a la planta transgénica por varias generaciones, cada uno de s ácidos nucleicos usados en el proceso, que codifican para los genes de desaturasa  $\omega$ -3 u otros genes de la biosíntesis de ácido graso como  $\Delta$ -9-elongasa,  $\Delta$ -6-desaturasa,  $\Delta$ -8-desaturasa,  $\Delta$ -6-elongasa,  $\Delta$ -5-desaturasa, A-5-elongasa y/o  $\Delta$ -4-desaturasa, debe expresarse bajo el control de un promotor propio, preferiblemente un promotor diferente puesto que los motivos de secuencia que se repiten conducen a la inestabilidad de eventos de ADN-T o de recombinación. El casete de expresión en tal caso está estructurado de tal modo que a un promotor le sigue ventajosamente un sitio de corte, adecuado para la inserción del ácido nucleico a expresar, en un polylinker y después opcionalmente se encuentra un terminador detrás del polylinker. Esta secuencia se repite varias veces, preferiblemente tres, cuatro o cinco veces de tal modo que hasta cinco genes puedan combinarse en un constructo e introducirse a la planta transgénica para la expresión. La secuencia se repite ventajosamente hasta tres veces. Para la expresión, las secuencias de ácido nucleico se insertan detrás del promotor mediante los sitios de corte adecuados, por ejemplo en el polylinker. Cada secuencia de ácido nucleico tiene ventajosamente su propio promotor y, opcionalmente, su propio terminador. Constructos ventajosos de este tipo se divulgan, por ejemplo, en DE 10102337 o DE 10102338 (véase, por ejemplo, en los protocolos de secuencia adjuntos). Pero también es posible insertar varias secuencias de ácido nucleico detrás de un promotor y, opcionalmente, ante un terminador. En tal caso el sitio de inserción o la secuencia de los ácidos nucleicos insertados en el casete de expresión no es de importancia decisiva; es decir que una secuencia de ácido nucleico puede insertarse en la primera o en la última posición en el casete sin que por esto la expresión se vea influida esencialmente. En el casete de expresión pueden usarse ventajosamente diferentes promotores como, por ejemplo, el promotor USP, LegB4 o DC3, y diferentes terminadores. Pero también es posible usar solo un tipo de promotor en el casete. Aunque esto puede conducir a eventos indeseados de recombinación.

Tal como se ha descrito arriba, la transcripción de los genes introducidos debe terminarse ventajosamente mediante terminadores adecuados en el extremo 3' de los genes de biosíntesis introducidos (detrás de un codón stop). Aquí puede usarse, por ejemplo, el terminador OCS1. Como es el caso para los promotores, para cada gen deben usarse diferentes secuencias de terminador.

Tal como se describió arriba, el constructo génico también puede comprender otros genes que deben introducirse a los organismos. Es posible y ventajoso introducir a los organismos huéspedes y expresar allí genes regulatorios tales como genes para inductores, represores o enzimas que debido a su actividad enzimática intervienen en la regulación de uno o varios genes de una vía de biosíntesis. Los genes pueden ser de origen heteróloga u homóloga. Además, otros genes de biosíntesis del metabolismo de ácido graso o lípido pueden estar contenidos ventajosamente en el constructo de ácido nucleico o en el constructo génico o estos genes pueden encontrarse en otro u otros constructos más. Como genes de biosíntesis del metabolismo de ácido graso o lípido, ventajosamente se selecciona un gen del grupo acil-CoA-dehidrogenasa(s), acil-ACP[= acil carrier protein]-desaturasa(s), acil-ACP-tioesterasa(s), ácido graso-acil-transferasa(s), acil-CoA:lisofofolípido-aciltransferasa(s), ácido graso-sintasa(s), ácido graso-hidroxilasa(s), acetil-coenzima A-carboxilasa(s), acil-coenzima A-oxidasa(s), ácido graso-desaturasa(s), ácido graso-acetilasa(s), lipoxigenasa(s), triacilglicerol-lipasa(s), alenóxido-sintasa(s), hidroperóxido-liasa(s) o ácido graso-elongasa(s) o sus combinaciones. Secuencias de ácido nucleico particularmente ventajosas son genes de biosíntesis del metabolismo de ácido graso o de lípido seleccionados del grupo de la acil-CoA:lisofofolípido-aciltransferasa, A-4-desaturasa, A-5-desaturasa,  $\Delta$ -6-desaturasa,  $\Delta$ -8-desaturasa,  $\Delta$ -9-desaturasa,  $\Delta$ -12-desaturasa, A-5-elongasa,  $\Delta$ -6-elongasa y/o A-9-elongasa.

En tal caso pueden clonarse los ácidos nucleicos o genes previamente mencionados en combinación con otras elongasas y desaturasas en casetes de expresión como los previamente mencionados y emplearse para la transformación de plantas con ayuda de agrobacterium.

Tal como se describió arriba, las secuencias o factores regulatorios pueden en tal caso influir positivamente, de manera preferida, en la expresión génica de los genes introducidos y de esta manera incrementarla. De esta manera puede efectuarse un refuerzo de los elementos regulatorios de una manera ventajosa a nivel de transcripción, usando señales de transcripción fuertes como promotores y/o "enhancer". Además, también es posible un refuerzo de la traducción (translation) mejorando, por ejemplo, la estabilidad el ARNm. Los casetes de expresión pueden usarse en principio directamente para introducir a las plantas o, no obstante, introducirse a un vector.

Estos vectores ventajosos, preferiblemente vectores de expresión, contienen los ácidos nucleicos de la invención usados en el proceso los cuales codifican para desaturasas  $\omega$ -3 mencionadas en las reivindicaciones, así como opcionalmente otros ácidos nucleicos usados en el proceso que codifican para  $\Delta$ -9-elongasas,  $\Delta$ -6-desaturasas,  $\Delta$ -8-desaturasas,  $\Delta$ -6-elongasas, A-5-desaturasas,  $\Delta$ -5-elongasas o A-4-desaturasas, o un constructo de ácido nucleico que contiene el ácido nucleico usado solo o en combinación con otros genes de biosíntesis del metabolismo de ácido graso o de lípido como las acil-CoA:lisofofolípido-aciltransferasas, A-4-desaturasas, A-5-desaturasas, A-6-desaturasas,  $\Delta$ -8-desaturasas,  $\Delta$ -9-desaturasas,  $\Delta$ -12-desaturasas,  $\omega$ 3-desaturasas,  $\Delta$ -5-elongasas,  $\Delta$ -6-elongasas y/o  $\Delta$ -9-elongasas. Tal como aquí se usa, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede transportar otro ácido nucleico al cual está enlazado. Un tipo de vector es un "plásmido", que representa un bucle de ADN bicatenario circular en el cual pueden ligarse segmentos adicionales de ADN. Otro tipo de vector es un vector viral, en cuyo caso pueden ligarse segmentos de ADN adicionales al genoma viral. Los vectores determinados

pueden replicarse de manera autónoma en una célula huésped a la que se han introducido (por ejemplo, vectores de bacterias con origen de replicación bacteriana). Otros vectores se integran ventajosamente al genoma de una célula huésped al introducirse a la célula huésped y de esta manera replicarse junto con el genoma huésped. Además, determinados vectores pueden controlar la expresión de genes con los que están enlazados funcionalmente. Estos vectores se denominan aquí "vectores de expresión". Los vectores de expresión, que son adecuados para las técnicas de recombinación de ADN, tienen habitualmente la forma de plásmidos. En la presente descripción "plásmido" y "vector" se usan de manera intercambiable puesto que el plásmido es la forma de vector que se usa con mayor frecuencia. Sin embargo, la invención debe comprender estas otras formas de vector de expresión, tales como vectores virales que ejercen funciones similares. Además, el término vector también debe abarcar otros vectores que son conocidos para el experto en la materia, como fagos, virus tales como SV40, CMV, TMV, transposons, elementos IS, fásmidos, fagémidos, cósmidos, ADN lineales o circulares.

Los vectores de expresión recombinantes usados ventajosamente en el proceso comprenden las secuencias arriba descritas y/o el constructo génico arriba descrito en una forma que es adecuada para la expresión de los ácidos nucleicos usados en una célula huésped, lo cual significa que los vectores de expresión recombinantes comprenden una o varias secuencias de regulación seleccionadas sobre la base de células huéspedes que se utilizan para la expresión y las cuales están enlazadas funcionalmente con la secuencia de ácido nucleico a expresar. En un vector de expresión recombinante "enlazado funcionalmente" significa que la secuencia de nucleótido de interés se enlaza de tal modo a la(s) secuencia(s) de regulación que es posible la expresión de la secuencia de nucleótido y se enlazan entre sí de tal modo que ambas secuencias cumplen la función pronosticada atribuida a la secuencia (por ejemplo, en un sistema de transcripción in vitro / de traducción o en una célula huésped si el vector se introduce a la célula huésped). El término "secuencia de regulación" debe abarcar promotores, enhancer y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Estas secuencias de regulación se describen, por ejemplo, en Goeddel: Gene Expression Technology: Methods in Enzimology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990), o véase: Gruber y Crosby en: Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, CRC Press, Boca Raton, Florida, editores: Glick y Thompson, capítulo 7, 89-108, incluidas las referencias bibliográficas en estos trabajos. Las secuencias de regulación comprenden aquellas que controlan la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de células, y aquellas que controlan la expresión directa de la secuencia de nucleótidos solo en determinadas células huéspedes en determinadas condiciones. El experto en la materia sabe que la configuración del vector de expresión puede depender de factores como la elección de la célula huésped a transformarse, la extensión de expresión de la proteína deseada, etc.

Los vectores de expresión recombinantes usadas pueden configurarse para la expresión de desaturasas  $\omega$ -3,  $\Delta$ -9-elongasas,  $\Delta$ -6-desaturasas,  $\Delta$ -8-desaturasas, A-6-elongasas,  $\Delta$ -5-desaturasas,  $\Delta$ -5-elongasas y/o  $\Delta$ -4-desaturasas en células procariotas o eucariotas. Esto es ventajoso porque los pasos intermedios de la construcción del vector se realizan convenientemente con frecuencia en microorganismos. Por ejemplo, los genes de  $\omega$ -3-desaturasa,  $\Delta$ -9-elongasa,  $\Delta$ -6-desaturasa,  $\Delta$ -8-desaturasa,  $\Delta$ -6-elongasa,  $\Delta$ -5-desaturasa,  $\Delta$ -5-elongasa y/o  $\Delta$ -4-desaturasa pueden expresarse en células bacterianas, células de insectos (usando vectores de expresión de Baculovirus), células de levaduras y de otros hongos (véase Romanos, M.A., et al. (1992) "Foreign gene expression in yeast a review", Yeast 8:423-488; van den Hondel, C.A.M.J.J., et al. (1991) "Heterologous gene expression in filamentous fungi", en: More Gene Manipulations in Fungi, J.W. Bennet & L.L. Lasure, editores, páginas 396-428: Academic Press: San Diego; y van den Hondel, C.A.M.J.J., & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, en: Applied Molecular Genetics of Fungi, Peberdy, J.F., et al., editores, páginas 1-28, Cambridge University Press: Cambridge), Algas (Falciatore et al., 1999, Marine Biotechnology.1, 3:239-251), ciliados de los tipos: Holotrichia, Peritrichia, Spirotrichia, Suctorina, Tetrahimena, Paramecium, Colpidium, Glaucoma, Platyophrya, Potomacus, Desaturasaudocohnilembus, Euplotes, Engelmaniella y Stilonychia, principalmente del género Stilonychia lemnae, con vectores según un método de transformación tal como se describe en WO 98/01572, así como preferiblemente en células de plantas multicelulares (véase Schmidt, R. y Willmitzer, L. (1988) "High efficiency Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of Arabidopsis thaliana leaf and cotyledon explants" Plant Cell Rep.:583-586; Plant Molecular Biology and Biotechnology, C Press, Boca Raton, Florida, capítulo 6/7, páginas 71-119 (1993); F.F. White, B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, en: Transgenic Plants, volumen 1, Engineering and Utilization, editores: Kung y R. Wu, Academic Press (1993), 128-43; Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225 (y las fuentes bibliográficas citadas allí)). Células huéspedes adecuadas se discuten además en Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzimology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). El vector de expresión recombinante puede transcribirse y traducirse in vitro alternativamente usando, por ejemplo, secuencias de regulación de promoter T7 y polimerasa T7.

La expresión de proteínas en procariotas se efectúa la mayoría de las veces con vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles que controlan la expresión de proteínas de fusión o de no fusión. Vectores de expresión típicos son, entre otros, pGEX (Farmacia Biotech Inc; Smith, D.B., y Johnson, K.S. (1988) Gene 67:31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) y pRIT5 (Farmacia, Piscataway, NJ), en los que S-transferasa de glutatona (GST), proteína E-enlazante de maltosa y proteína A se fusionan a la proteína recombinante objetivo.

Ejemplos de vectores de expresión de E. Coli inducibles, de no fusión, adecuados son, entre otros, pTrc (Amann et al. (1988) Gene 69:301-315) y pET 11d (Studier et al., Gene Expression Technology: Methods in Enzimology 185,



Academic Press. San Diego, California (1990) 60-89). La expresión del gen objetivo del vector pTrc se basa en la transcripción mediante polimerasa de ARN huésped por un promotor de fusión híbrido-trp-lac. La expresión de gen objetivo del vector pET 11 d se basa en la transcripción de un promotor de fusión T7-gn10-lac que está mediada por una polimerasa de ARN viral co-expresada (T7 gn1). Esta polimerasa viral está proporcionada por las cepas huéspedes BL21 (DE3) o HMS174 (DE3) de un  $\lambda$ -profago residente que aloja un gen T7 gn1 bajo el control de transcripción del promotor lacUV 5.

Otros vectores adecuados en organismos procariontes son conocidos por el experto en la materia; estos vectores están, por ejemplo, en *E. coli* pLG338, pAC184, la serie pBR, como pBR322, la serie pUC, como pUC18 o pUC19, la serie M113mp, pKC30, pRep4, pHS1, pHS2, pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III113-B1,  $\lambda$ gt11 o pBdCl, en *Streptomyces* pIJ101, pIJ364, pIJ702 o pIJ361, en *Bacillus* pUB110, pC194 o pBD214, en *Corynebacterium* pSA77 o pAJ667.

En otra forma de realización el vector de expresión es un vector de expresión de levadura. Ejemplos de vectores para la expresión en la levadura *S. cerevisiae* comprenden pYeDesaturasac1 (Baldari et al. (1987) *Embo J.* 6:229-234), pMFa (Kurjan y Herskowitz (1982) *Cell* 30:933-943), pJRY88 (Schultz et al. (1987) *Gene* 54:113-123) así como pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Vectores y métodos para la construcción de vectores que son adecuados para la utilización en otros hongos, como los hongos filamentosos, comprenden aquellos que están descritos detalladamente en: van den Hondel, C.A.M.J.J., & Punkt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, en: *Applied Molecular Genetics of fungi*, J.F. Peberdy et al., editores, páginas 1-28, Cambridge University Press: Cambridge, o en: *More Gene Manipulations in Fungi* [J.W. Bennet & L.L. Lasure, editores, páginas 396-428: Academic Press: San Diego]. Otros vectores adecuados de levadura son, por ejemplo, pAG-1, YEep6, YEep13 o pEMBLie23.

Alternativamente pueden expresarse las desaturasas  $\omega$ -3,  $\Delta$ -9-elongasas,  $\Delta$ -6-desaturasas,  $\Delta$ -8-desaturasas,  $\Delta$ -6-elongasas,  $\Delta$ -5-desaturasas,  $\Delta$ -5-elongasas y/o  $\Delta$ -4-desaturasas en células de insectos usando vectores de expresión de Baculovirus. Los vectores de Baculovirus que se encuentran disponibles para la expresión de proteínas en células de insectos cultivadas (por ejemplo, células Sf9) comprenden la serie pAc (Smith et al. (1983) *Mol. Cell Biol.* 3:2156-2165) y la serie pVL (Lucklow y Summers (1989) *Virology* 170:31-39).

Los vectores arriba mencionados son solo un pequeño resumen de los vectores adecuados posibles. Otros plásmidos son conocidos por el experto en la materia y se describen, por ejemplo, en: *Cloning Vectors* (editores Pouwels, P.H., et al., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018). Otros sistemas de expresión adecuados para células procariontes o eucariotas véanse en los capítulos 16 y 17 de Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

En el proceso pueden expresarse las desaturasas  $\omega$ -3,  $\Delta$ -9-elongasas,  $\Delta$ -6-desaturasas,  $\Delta$ -8-desaturasas,  $\Delta$ -6-elongasas,  $\Delta$ -5-desaturasas,  $\Delta$ -5-elongasas y/o  $\Delta$ -4-desaturasas en células de vegetales unicelulares (como algas), véase Falcitore et al., 1999, *Marine Biotechnology* 1 (3):239-251 y los datos bibliográficos citados allí, y células vegetales de plantas superiores (por ejemplo espermatofitos, como frutos del campo). Ejemplos de vectores de expresión de plantas comprenden aquellos que se describen detalladamente en: Becker, D., Kemper, E., Schell, J., y Masterson, R. (1992) "New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border", *Plant Mol. Biol.* 20:1195-1197; y Bevan, M.W. (1984) "Binary Agrobacterium vectors for plant transformation", *Nud. Acids Res.* 12:8711-8721; *Vectors for Gene Transfer in Higher Plants*; en: *Transgenic Plants*, volumen 1, Engineering and Utilization, editores: Kung y R. Wu, Academic Press, 1993, páginas 15-38.

Un casete de expresión de plantas contiene preferiblemente secuencias de regulación, los cuales pueden controlar la expresión de genes en células vegetales y están enlazadas funcionalmente de tal modo que cada secuencia puede cumplir su función, como terminación de la transcripción, por ejemplo señales de poliadenilación. Señales preferidas de poliadenilación son aquellos que provienen de ADN-T de *Agrobacterium tumefaciens*, tales como el gen 3 del plásmido Ti pTtACH5, conocido como sintasa de octopina (Gielen et al., *EMBO J.* 3 (1984) 835 y siguientes) o equivalentes funcionales de éstas, pero también son adecuados todos los otros terminadores activos funcionalmente en plantas.

Puesto que la expresión de genes vegetales muy frecuentemente no está restringida a niveles de transcripción, un casete de expresión de planta contiene preferiblemente otras secuencias enlazadas funcionalmente, como enhancer de traducción, por ejemplo la secuencia overdrive que contiene la secuencia líder no traducida 5' del virus mosaico de tabaco que eleva la proporción proteína/ARN (Gallie et al., 1987, *Nucl. Acids Research* 15:8693-8711).

Como se describió arriba, la expresión de genes vegetales debe estar enlazada funcionalmente con un promotor adecuado que realiza la expresión de genes de una manera oportuna, específica para células o tejidos. Los promotores útiles son promotores constitutivos (Benfey et al., *EMBO J.* 8 (1989) 2195-2202), como aquellos que provienen de vegetales/virus, como 35S CAMV (Franck et al., *Cell* 21 (1980) 285-294), 19S CaMV (véase también

US 5352605 y WO 84/02913) o promotores vegetales, como el promotor de la sub-unidad pequeña de la Rubisco descrito en US 4,962,028.

5 Otras secuencias preferidas para el uso en el enlace funcional en casetes de expresión de genes vegetales son secuencias targeting (de direccionamiento) que son necesarias para el direccionamiento del producto génico en su compartimiento celular correspondiente (véase un resumen en Kermodé, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996) 285-423 y las referencias bibliográficas allí citadas), por ejemplo en las vacuolas, todas las especies de plástidos, como amiloplastos, cloroplastos, cromoplastos, al espacio extracelular, las mitocondrias, el retículo endoplasmático, componentes de aceite, peroxisomas y otros compartimientos de células vegetales.

10 La expresión de genes vegetales también puede facilitarse tal como se describe arriba mediante un promotor inducible químicamente (véase un resumen en Gatz 1997, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 48:89-108). Promotores inducibles químicamente son adecuados particularmente si se desea que la expresión de genes se efectúa de manera específica en el tiempo. Ejemplos de tales promotores son un promotor inducible de ácido salicílico (WO 95/19443), un promotor inducible de tetraciclina (Gatz et al. (1992) Plant J. 2, 397-404) y un promotor inducible de etanol.

15 También son promotores adecuados los promotores que reaccionan a condiciones de estrés bióticas o abióticas, por ejemplo el promotor de gen PRP1 inducido por patógeno (Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993) 361-366), el promotor hsp80 de tomate, inducible por calor (US 5,187,267), el promotor alfaamilasa de patata, inducible por frío (WO 96/12814) o el promotor pinII inducible por heridas (EP-A-0 375 091).

20 Se prefieren principalmente aquellos promotores que provocan la expresión de genes en tejidos y órganos, en los que tiene lugar la biosíntesis de ácido graso, lípido y aceite, en células de semillas, como las células de la endosperma y del embrión que se desarrolla. Promotores adecuados son el promotor del gen de napina de colza (US 5,608,152), el promotor USP de Vicia faba (Baeumlein et al., Mol Gen Genet, 1991, 225 (3):459-67), el promotor de oleosina de Arabidopsis, (WO 98/45461), el promotor faseolina de *Faseolus vulgaris* (US 5,504,200), el promotor Bce4 de Brassica (WO 91/13980) o el promotor B4 de leguminosa (LeB4; Baeumlein et al., 1992, Plant Journal, 2 (2):233-9) así como promotores que provocan la expresión específica de semilla en plantas monocotiledóneas como maíz, cebada, trigo, centeno, arroz, etc. Promotores notables adecuados son el promotor lpt2 o lpt1 de cebada (WO 95/15389 y WO 95/23230) o los descritos en WO 99/16890 (promotores del gen hordeína-cebada, del gen glutelina-arroz, del gen orizina-arroz, del gen prolamina-arroz, del gen gliadina-trigo, del gen glutelina-trigo, del gen zeína-maíz, del gen glutelina-avena, del gen kasirina-sorgo, del gen secalina-centeno).

30 Principalmente, puede ser deseada la expresión multiparalela de las desaturasas  $\omega$ -3,  $\Delta$ -9-elongasas, A-6-desaturasas,  $\Delta$ -8-desaturasas,  $\Delta$ -6-elongasas,  $\Delta$ -5-desaturasas,  $\Delta$ -5-elongasas y/o A-4-desaturasas usadas en el proceso. La introducción de aquellos casetes de expresión puede efectuarse mediante una transformación simultánea de varios constructos individuales de expresión o preferiblemente mediante combinación de varios casetes de expresión en un constructo. También pueden transformarse varios vectores respectivamente con varios casetes de expresión y transferirse a la célula huésped.

Asimismo particularmente adecuados son promotores que provocan la expresión específica de plástidos puesto que los plástidos son el compartimento en el que se sintetizan los precursores y algunos productos finales de la biosíntesis de lípidos. Promotores adecuados, como el promotor de polimerasa-ARN viral, se describen en WO 95/16783 y WO 97/06250, y el promotor clpP de Arabidopsis, descrito en WO 99/46394.

40 El ADN vector puede introducirse en células procariótidas o eucariótidas mediante técnicas convencionales de transformación o transfección. Los términos "transformación" y "transfección", conjugación y transducción, tal como aquí se usan, deben comprender una gran cantidad de métodos conocidos en el estado de la técnica para introducir ácidos nucleicos extraños (por ejemplo ADN) en una célula huésped, incluida la co-precipitación con fosfato de calcio, cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección, competencia natural, transferencia mediada químicamente, electroporación o bombardeo de partículas. Métodos adecuados para la transformación o transfección de células huéspedes, incluidas las células vegetales, pueden encontrarse en Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual., 2. Edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) y otros manuales de laboratorio, como Methods in Molecular Biology, 1995, volumen 44, Agrobacterium protocols, Editores: Gardand y Davey, Humana Press, Totowa, New Jersey.

50 Las células huéspedes que son adecuadas en principio para alojar el ácido nucleico descrito, el producto génico descrito o el vector de la invención son todos organismos procarióticos o eucarióticos. Los organismos huéspedes usados de manera ventajosa son microorganismos como hongos o levaduras o células vegetales, preferiblemente plantas o partes de las mismas. Hongos, levaduras o plantas se usan preferiblemente, particularmente se refieren plantas, muy particularmente se prefieren plantas oleaginosas que contienen grandes cantidades de compuestos de lípidos como colza, onagra, cáñamo, cárdamo, cacahuete, canola, lino, soja, cardo (safflower), girasol, borraja, o plantas como maíz, trigo, centeno, avena, triticale, arroz, cebada, algodón, yuca, pimienta, tagetes, plantas solanáceas como patata, tabaco, berenjena y tomate, especies de vicia, guisantes, alfalfa, plantas arbustos (café,

cacao, té), especies de salix, árboles (palma oleífera, coco) así como pastos perennes y plantas forrajeras del campo. Plantas de la invención particularmente preferidas son plantas oleaginosas como soja, cacahuete, colza, canola, lino, cáñamo, onagra, girasol, cardo, árboles (palma oleífera, coco).

5 Otro objeto de la invención son las secuencias de ácido nucleico aisladas como se describió arriba que codifican para polipéptidos con actividad desaturasa  $\omega$ -3, en cuyo caso las desaturasas  $\omega$ -3 codificadas por las secuencias de ácido nucleico convierten ácidos grasos de C<sub>18</sub>, C<sub>20</sub> y C<sub>22</sub> con dos, tres, cuatro o cinco enlaces dobles y ventajosamente ácidos grasos de C<sub>18</sub> poliinsaturados con dos o tres enlaces dobles y ácidos grasos poliinsaturados de C<sub>20</sub> con dos, tres o cuatro enlaces dobles. También se desaturan ácidos grasos de C<sub>22</sub> con cuatro o cinco enlaces dobles.

10 El término "(molécula de) ácido nucleico", tal como se usa aquí, comprende además en una forma ventajosa de realización la secuencia no traducida en el extremo 3' y en el extremo 5' de la región codificante del gen: al menos 500, preferiblemente 200, particularmente preferible 100 nucleótidos de la secuencia hacia arriba del extremo 5' de la región codificante y al menos 100, preferible 50, particularmente preferible 20 nucleótidos de la secuencia hacia abajo del extremo 3' de la región codificante del gen. Una molécula de ácido nucleico "aislada" se separa de las  
15 otras moléculas de ácido nucleico, que se presentan en la fuente natural del ácido nucleico. Un ácido nucleico "aislado" preferiblemente no tiene secuencias que flanquee naturalmente ácido nucleico en el ADN genómico del organismo, de l cual procede el ácido nucleico (por ejemplo secuencias que se encuentran en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico). En diferentes formas de realización la molécula aislada de desaturasa  $\omega$ -3 pueden contener, por ejemplo, menos de aproximadamente 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb o 0,1 kb de secuencias de nucleótidos que  
20 flanquean naturalmente la molécula de ácido nucleico en el ADN genómico de la célula de la cual proviene el ácido nucleico.

Las moléculas de ácido nucleico usadas en el proceso, por ejemplo una molécula de ácido nucleico con una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 o una parte de la misma, puede aislarse usando técnicas estándar de biología molecular y la información de secuencias proporcionada aquí. Con ayuda de algoritmos de comparación,  
25 también puede identificarse, por ejemplo, una secuencia homóloga o una región de secuencia conservada, homóloga a nivel de ADN o de aminoácido. Estas pueden usarse como sondas de hibridación así como técnicas de hibridación estándar (como se describen, por ejemplo, en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2. Edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) para aislar otras secuencias de ácido nucleico útiles en el proceso. Además, una molécula de ácido nucleico que  
30 comprende una secuencia completa de la SEQ ID NO: 1 o una parte de la misma puede aislarse por reacción en cadena de polimerasa, en cuyo caso se usa el cebador de oligonucleótido sobre la base de esta secuencia o de las partes de la misma (por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que comprende la secuencia completa o una parte de la misma pueden aislarse mediante reacción en cadena de polimerasa usando cebadores de oligonucleótidos que se han generado sobre la base de esta misma secuencia). Por ejemplo, ARN, puede aislarse de células (por  
35 ejemplo, mediante método de extracción de guanidiniotiocianato de Chirgwin et al. (1979) Biochemistry 18:5294-5299) y ADNc puede producirse mediante transcriptasa inversa (por ejemplo transcriptasa inversa de Moloney-MLV, obtenible de Gibco/BRL, Bethesda, MD, o transcriptasa inversa de AMV, obtenible de Seikagaku America, Inc., St.Petersburg, FL). Cebadores de oligonucleótidos sintéticos para la amplificación por medio de reacción en cadena de polimerasa pueden generarse sobre la base de la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1 o con ayuda de la  
40 secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 2. Un ácido nucleico de la invención puede amplificarse usando ADNc o, alternativamente, ADN genómico como matriz y cebadores de oligonucleótidos adecuados de acuerdo con técnica de amplificación de PCR. El ácido nucleico amplificado de esta manera puede clonarse a un vector adecuado y caracterizarse por medio de análisis secuencial de ADN. Oligonucleótidos que corresponden a una secuencia de nucleótidos-desaturasa pueden producirse mediante métodos estándar, por ejemplo con un  
45 aparato automático de síntesis de ADN.

Homólogos de la secuencia de ácido nucleico de desaturasa  $\omega$ -3 con la secuencia SEQ ID NO: 1 significan, por ejemplo, variantes alélicas con al menos cerca de 60 %, preferiblemente al menos 70 %, más preferiblemente al menos 80 %, 90 % o 95 % y aún mucho más preferible al menos cerca de 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de identidad u homología con una secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1 o sus homólogos, derivados o  
50 análogos o partes de los mismos. Además, los homólogos son moléculas de ácido nucleico con una secuencia de nucleótidos que hibridan la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1 o una parte de la misma, por ejemplo en condiciones rigurosas. Variantes alélicas comprenden principalmente variantes funcionales que pueden obtenerse mediante delección, inserción o sustitución de nucleótidos de/en la secuencia representada en SEQ ID NO: 1, en cuyo caso, sin embargo, la intención es que la actividad enzimática de las proteínas sintetizadas resultantes de esto se mantenga de manera ventajosa para la inserción de uno o varios genes. Las proteínas que todavía poseen la actividad enzimática de la desaturasa  $\omega$ -3, es decir cuya actividad esencialmente no se ha reducido, significan proteínas con al menos 10 %, preferiblemente 20 %, particularmente preferible 30 %, muy particularmente preferible 40 % de la actividad enzimática original, comparada con la proteína codificada por SEQ ID NO: 1. La homología se calculó por toda la región de secuencia de aminoácido o de ácido nucleico. Para la preparación de diferentes  
55 secuencias el experto en la materia tiene disponible una serie de programas que se basan en algoritmos diferentes. En tal caso los algoritmos de Needleman y Wunsch o Smith y Waterman suministran resultados particularmente

5 confiables. Para la comparación de las secuencias se usó el programa PileUp (J. Mol. Evolution., 25, 351-360, 1987, Higgins et al., CABIOS, 5,1989:151-153) o el programa Gap y BestPhyt [Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. 48; 443-453 (1970) y Smith and Waterman (Adv. Appl. Math. 2; 482-489 (1981)), los cuales están contenidos en el paquete de software GCG [Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711 1 (1991)]. Los valores de homología de secuencia indicados arriba en porcentaje se determinaron con el programa GAP por toda la región de secuencia con los siguientes ajustes: Gap Weight: 50, Length Weight: 3, Average Match: 10.000 y Average Mismatch: 0.000. Las cuales se usaron siempre para comparaciones de secuencia como ajustes estándar si no se indica algo diferente.

10 Homólogos de la SEQ ID NO: 1 también significan, por ejemplo, homólogos bacterianos, de hongos y de plantas, secuencias abreviadas, ADN o ARN monocatenarios de la secuencia de ADN codificante y no codificante.

15 Homólogos de la SEQ ID NO: 1 también significan derivados como, por ejemplo, variantes de promotor. Los promotores hacia arriba de las secuencias indicadas de nucleótidos pueden modificarse por uno o varios intercambios de nucleótidos, por inserción(es) y/o deleción(es), no obstante sin que la funcionalidad o la actividad de los promotores se perturbe. Además es posible que la actividad de los promotores se eleve por modificación de su secuencia o que se reemplacen completamente por promotores más activos, incluso de organismos heterólogos.

20 Los ácidos nucleicos y moléculas de proteína mencionados en las reivindicaciones con actividad desaturasa  $\omega$ -3, que intervienen en el metabolismo de lípidos y ácidos grasos, cofactores de PUFA y enzimas o en el transporte de compuestos lipofílicos a través de las membranas, se usan en el proceso de la invención para modulación de la producción de PUFAs en organismos transgénicos ventajosamente en plantas como maíz, trigo, centeno, avena, triticale, arroz, cebada, habas de soja, cacahuete, algodón, especies de lino como lino de aceite o de fibra, especies de brassica como colza, canola y nabina, pimienta, girasol, borraja, onagra y tagetes, plantas solanáceas como patata, tabaco, berenjena y tomate, especies de vicia, guisantes, yuca, alfalfa, plantas de arbustos (café, cacao, té), especies de salix, árboles (palma oleífera, coco) y pastos perennes y plantas forrajeras del campo, ya sea directamente (por ejemplo si la sobre-expresión o la optimización de una proteína de biosíntesis de ácido graso tiene un efecto directo en el rendimiento, producción y/o eficiencia de la producción del ácido graso a partir de organismos modificados) y/o pueden tener un efecto indirecto que no obstante conduce a un incremento del rendimiento, producción y/o eficiencia de la producción de los PUFAs o a una reducción de compuestos indeseados (por ejemplo cuando la modulación del metabolismo de lípidos y ácidos grasos, cofactores y enzimas conduce a modificaciones del rendimiento, producción y/o eficiencia de la producción o de la composición de los compuestos deseados dentro de las células lo cual a su vez puede influir la producción de uno o de varios ácidos grasos).

30 La combinación de diferentes moléculas precursoras y enzimas de biosíntesis conduce a la producción de diferentes moléculas de ácido graso, lo cual tiene un efecto decisivo en la composición de los lípidos. Puesto que los ácidos grasos poliinsaturados (= PUFAs) no solo se incorporan simplemente en la triacilglicerina sino también en lípidos de membrana.

35 Particularmente, para la preparación de PUFAs, por ejemplo ácido estearidónico, ácido eicosapentaenoico y ácido docosahexaenoico son adecuadas boraginaceas, primulaceas, o linaceas. De manera particularmente ventajosa es adecuado el lino (*Linum usitatissimum*) para la producción de PUFAS ventajosamente con las secuencias de ácido nucleico de la invención, tal como se ha descrito, en combinación con otras desaturasas y elongasas.

40 La síntesis de lípido puede dividirse en dos secciones: la síntesis de ácidos grasos y su enlace a sn-Glicerín-3-fosfato y la adición o modificación de un grupo de cabeza polar. Lípidos usuales que se usan en membranas comprenden fosfolípidos, glicolípidos, esfingolípidos y fosfoglicéridos. La síntesis de ácido graso inicia con la conversión de acetyl-CoA en malonil-CoA mediante la acetyl-CoA carboxilasa o en acetyl-ACP mediante la acetyltransferasa. Después de una reacción de condensación éstas dos moléculas de producto forman juntas acetoacetyl-ACP, que se convierte mediante una serie de reacciones de condensación, reducción y deshidratación, de tal modo que se obtiene una molécula de ácido graso saturada con la longitud de cadena deseada. La producción de los ácidos grasos insaturados de estas moléculas se cataliza por desaturasas específicas, y ya sea aeróbicamente por medio de oxígeno molecular o anaeróbicamente (respecto de la síntesis de ácido graso en microorganismos véase F.C. Neidhardt et al. (1996) *E. coli* y *Salmonella*. ASM Press: Washington, D.C., páginas 612-636 y las referencias bibliográficas allí contenidas; Lengeler et al. (editores.) (1999) *Biology of Prokaryotes*. Thieme: Stuttgart, New York, y las referencias bibliográficas contenidas, así como Magnuson, K., et al. (1993) *Microbiological Reviews* 57:522-542 y las referencias bibliográficas contenidas). Para más elongaciones, los ácidos grasos enlazados a fosfolípidos producidos de esta forma deben transferirse de nuevo a continuación desde los fosfolípidos a la fuente de ésteres de ácido graso-CoA. Esto se hace posible por las acil-CoA: lisofosfolípido-aciltransferasas. Además, estas enzimas pueden transferir los ácidos grasos elongados de nuevo desde los ésteres CoA a los fosfolípidos. Esta secuencia de reacción puede transcurrir opcionalmente varias veces.

55 Los precursores para la biosíntesis de PUFA son, por ejemplo, ácido oléico, ácido linoléico y ácido linolénico. Estos ácidos grasos de carbono  $C_{19}$  se elongan a  $C_{20}$  y  $C_{22}$ , para obtener ácidos grasos del tipo de cadenas eicosa y docosa. Con ayuda de la desaturasa  $\omega$ -3 usada en el proceso el ácido araquidónico pueden convertirse en ácido

eicosapentaenoico y el ácido docosapentaenoico en ácido docosahexaenoico y usarse a continuación para diversos propósitos en aplicaciones de alimentos, forrajes, cosméticos o farmacéuticos. Con las enzimas mencionadas pueden prepararse ácidos grasos de C<sub>18</sub>, C<sub>20</sub> y/o C<sub>22</sub> con al menos dos, ventajosamente al menos tres, cuatro, cinco o seis enlaces dobles en la molécula de ácido graso, preferiblemente ácidos grasos de C<sub>20</sub> o C<sub>22</sub> ventajosamente con cuatro, cinco o seis enlaces dobles en la molécula de ácido graso. La desaturación puede efectuarse antes o después de la elongación del ácido graso correspondiente. Por lo tanto, los productos de las actividades de desaturación y de la desaturación y elongación adicionales posibles conducen a PUFAs preferidos con alto grado de desaturación, incluida una elongación más de ácidos grasos de C<sub>20</sub> a C<sub>22</sub>. Los sustratos de la desaturación usada en el proceso descrito son ácidos grasos de C<sub>18</sub>, C<sub>20</sub> o C<sub>22</sub> como, por ejemplo, ácido linoléico, ácido  $\gamma$ -linolénico, ácido dihomog $\gamma$ -linolénico, ácido araquidónico, ácido docosatetraenoico o ácido docosapentaenoico. Sustratos preferidos son ácido araquidónico, ácido docosatetraenoico o ácido docosapentaenoico. Los ácidos grasos de C<sub>20</sub> o C<sub>22</sub> sintetizados con al menos dos enlaces dobles en el ácido graso se producen en el proceso descrito en forma del ácido graso libre o en forma de sus ésteres, por ejemplo en forma de sus glicéridos.

Por el término "glicérido" se entiende una glicerina esterificada con uno, dos o tres residuos de ácido carboxílico (mono-, di- o triglicérido). Por "glicérido" también se entiende una mezcla de diferentes glicéridos. El glicérido o la mezcla de glicéridos puede contener otros aditivos, por ejemplo ácidos grasos libres, antioxidantes, proteínas, carbohidratos, vitaminas y/u otras sustancias.

Por un "glicérido" en el contexto del proceso descrito se entienden además derivados de la glicerina. Entre éstos también se cuentan, además de los glicéridos de ácido graso arriba descritos, glicerofosfolípidos y glicerglicolípidos. Aquí pueden mencionarse a manera de ejemplo preferiblemente los glicerofosfolípidos como lecitina (fosfatidilcolina), cardiolipina, fosfatidilglicerina, fosfatidilserina y alquilglicerofosfolípidos.

Además, los ácidos grasos deben transportarse después a diferentes lugares de modificación e incorporarse al lípido de almacenamiento triacilglicerina. Otro paso importante en la síntesis de lípidos es la transferencia de ácidos grasos a los grupos polares de cabeza, por ejemplo mediante aciltransferasa glicerina-ácido graso (véase Frentzen, 1998, *Lipid*, 100(4-5):161-166).

Publicaciones sobre la biosíntesis de ácido graso – plantas, desaturación, el metabolismo de lípidos y el transporte de membrana de los compuestos que contienen grasa, la betaoxidación, la modificación de ácido graso y los cofactores, el almacenamiento de triacilglicerina y el ensamblamiento de la misma, incluso las citas bibliográficas allí citadas véanse en los siguientes artículos: Kinney, 1997, *Genetic Engineering*, Editores: JK Setlow, 19:149-166; Ohlrogge y Browse, 1995, *Plant Cell* 7:957-970; Shanklin y Cahoon, 1998, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49:611-641; Voelker, 1996, *Genetic Engineering*, Editores: JK Setlow. 18:111-13; Gerhardt, 1992, *Prog. Lipid R.* 31:397-417; Günemann-Schäfer & Kindl, 1995, *Biochim. Biophys Acta* 1256:181-186; Kunau et al., 1995, *Prog. Lipid Res.* 34:267-342; Stymne et al., 1993, en: *Biochemistry and Molecular Biology of Membrane and Storage Lipids of Plants*, Editores: Murata y Somerville, Rockville, American Society of Plant Physiologists, 150-158, Murfi & Ross 1998, *Plant Journal*. 13(1): 1-16.

Los PUFAs producidos en el proceso comprenden un grupo de moléculas que los animales superiores ya no pueden producir y de esta manera deben asimilarse o los animales superiores ya no pueden producir ellos mismos de manera suficiente y de esta manera deben ingerir adicionalmente a pesar que pueden sintetizarse fácilmente por otros organismos como bacterias; por ejemplo, los gatos ya no pueden sintetizar el ácido araquidónico.

Por fosfolípidos que se convierten ventajosamente por la desaturasa  $\omega$ -3 descrita, en el contexto de la invención han de entenderse fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerina y/o fosfatidilinositol de manera ventajosa fosfatidilcolina. Los términos producción o productividad son conocidos en el campo técnico y comprenden la concentración del producto de fermentación (compuestos de la fórmula I) que se forma en un determinado lapso de tiempo y en un determinado volumen de fermentación (por ejemplo, kg de producto por hora por litro). El término eficiencia de la producción comprende el tiempo que es necesario para alcanzar una determinada cantidad de producción (por ejemplo, cuánto necesita la célula para establecer una cierta rata de rendimiento de un producto químico fino). El término rendimiento o rendimiento de producto/ carbón es conocido en el campo especializado y comprende la eficiencia de la conversión de la fuente de carbón al producto (es decir, al producto químico fino). Esto se expresa usualmente, por ejemplo, como kg de producto por kg de fuente de carbono. Incrementando el rendimiento o producción del compuesto, la cantidad de moléculas obtenidas o de las moléculas obtenidas adecuadas de este compuesto en una cierta cantidad de cultivo se incrementa durante un lapso de tiempo establecido. Los términos biosíntesis o vía de biosíntesis son conocidos en el campo de la especialidad y comprenden la síntesis de un compuesto, preferiblemente de un compuesto orgánico, por parte de una célula a partir de compuestos intermedios, por ejemplo en un proceso de varios pasos y fuertemente regulado. Los términos catabolismo o vía catabólico son conocidos en el campo especializado y comprenden la disociación de un compuesto, preferiblemente de un compuesto orgánico por parte de una célula para dar catabolitos (dicho en general, moléculas más pequeñas o menos complejas), por ejemplo en un proceso de varios pasos y fuertemente regulado. El término metabolismo es conocido en el campo especializado y comprende la totalidad de las reacciones bioquímicas que tienen lugar en el organismo. El metabolismo de un determinado compuesto (por ejemplo, el

metabolismo de un ácido graso) comprende entonces la totalidad de las vías biosintéticas, de modificación y catabólicas de este compuesto en la célula las cuales se refieren a este compuesto.

Adicionalmente a las desaturasas  $\omega$ -3 mostradas en SEQ ID NO: 1 el experto en la materia reconoce que dentro de una población pueden existir polimorfismos de secuencia de ADN que conducen a modificaciones en las secuencias de aminoácido de la desaturasa  $\omega$ -3. Estos polimorfismos genéticos en el gen de desaturasa  $\omega$ -3 pueden existir entre individuos de una población como resultado de la variación natural. Estas variantes naturales usualmente causan una varianza de 1 a 5 % en la secuencia de nucleótidos del gen de desaturasa  $\omega$ -3. Todas y cada una de estas variaciones y todos los polimorfismos de aminoácidos resultantes de éstas en la desaturasa  $\omega$ -3, que sean el resultado de una variación natural y no modifiquen la actividad funcional están descritas aquí.

Para el proceso de la invención, las moléculas ventajosas de ácido nucleico pueden aislarse con base en su homología con los ácidos nucleicos de desaturasa  $\omega$ -3 aquí revelados usando las secuencias o una parte de las mismas como sonda de hibridación según las técnicas de hibridación estándar en condiciones de hibridación rigurosas. En tal caso pueden usarse, por ejemplo, moléculas de ácido nucleico aisladas que tienen una longitud de al menos 15 nucleótidos e hibridan en condiciones rigurosas con las moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1. También pueden usarse ácidos nucleicos de al menos 25, 50, 100, 250 o más nucleótidos. El término "hibridado en condiciones rigurosas", tal como aquí se usa, debe describir condiciones de hibridación y de lavado en las cuales secuencias de nucleótidos que son homólogas entre sí en al menos 60 % permanecen habitualmente hibridadas entre sí. Las condiciones son preferiblemente de tal tipo que las secuencias que son homólogas entre sí en al menos aproximadamente 65 %, más preferiblemente en al menos cerca de 70 % y aún más preferiblemente en al menos cerca de 75 % o más, permanecen habitualmente hibridadas entre sí. Estas condiciones rigurosas son conocidas para el experto en la materia y pueden encontrarse en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N. Y. (1989). 6.3.1-6.3.6.. Un ejemplo preferido, no limitante de condiciones de hibridación rigurosas son hibridaciones en 6 x cloruro de sodio / citrato de sodio (sodium chloride/sodium citrate = SSC) a cerca de 45°C, seguidas de uno o varios pasos de lavado en 0,2 x SSC, 0,1 % SDS a 50 hasta 65°C. El experto en la materia conoce que estas condiciones de hibridación difieren dependiendo del tipo del ácido nucleico y, si están presentes solventes orgánicos, respecto de la temperatura y de la concentración del búfer. En "condiciones de hibridación estándar", dependiendo del ácido nucleico, la temperatura difiere entre 42°C y 58°C en búfer acuoso con una concentración de 0,1 a 5 x SSC (pH 7,2). Si un solvente orgánico está presente en el búfer arriba mencionado, por ejemplo formamida al 50 %, en condiciones estándar la temperatura es de aproximadamente 42°C. Para híbridos ADN : ADN las condiciones de hibridación son preferiblemente, por ejemplo, 0,1 x SSC y 20°C a 45°C, preferiblemente entre 30°C y 45°C. Preferiblemente, las condiciones de hibridación para híbridos DNA:RNA son, por ejemplo, 0,1 x SSC y 30°C a 55°C, preferiblemente entre 45°C y 55°C. Las temperaturas de hibridación mencionadas previamente, por ejemplo, se determinan para un ácido nucleico con cerca de 100 bp (= pares de bases) de longitud y un contenido G + de 50 % en ausencia de formamida. El experto en la materia sabe como determinar las condiciones de hibridación requeridas por medio de libros de texto, tales como los previamente mencionados o los siguientes libros de texto: Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989; Hames y Higgins (Editores.) 1985, "Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press, Oxford; Brown (Editores.) 1991, "Essential Molecular Biology: A Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press, Oxford.

Para determinar la homología porcentual (= identidad) de dos secuencias de aminoácido (por ejemplo de la secuencia SEQ ID NO: 2) o de dos ácidos nucleicos (por ejemplo SEQ ID NO: 1) las secuencias se escriben una bajo la otra para propósitos de comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse vacíos en la secuencia de una proteína o de un ácido nucleico para generar un alineamiento óptimo con la otra proteína o el otro ácido nucleico). Los residuos de aminoácido o nucleótidos en las posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos correspondientes se comparan entonces. Si una posición en una secuencia se ocupa por el mismo residuo de aminoácido o el mismo nucleótido que la posición correspondiente en otra secuencia, entonces las moléculas son homólogas en esta posición (es decir, "homología" de aminoácido o de ácido nucleico, tal como se usa aquí, corresponde a una "identidad" de aminoácido o ácido nucleico). La homología porcentual entre las dos secuencias es una función de la cantidad de posiciones idénticas que son comunes a las secuencias (es decir % de homología = cantidad de las posiciones idénticas / cantidad total de las posiciones x 100). De esta manera, los términos homología e identidad han de considerarse como sinónimos. Los programas, o algoritmos, usados se describen arriba.

Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica una desaturasa  $\omega$ -3, la cual es homóloga a la secuencia de proteína de la SEQ ID NO: 2, puede generarse introduciendo una o varias sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos a una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1, de modo que se introducen una o varias sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos a la proteína codificada. Pueden introducirse mutaciones a una de las secuencias de la SEQ ID NO: 1 mediante técnicas estándar como mutagénesis específica de posición y mutagénesis mediada por PCR. Se prefiere producir sustituciones de aminoácidos conservadoras en uno o varios de los residuos de aminoácidos no esenciales pronosticados. En una "sustitución conservadora de aminoácido" el residuo de aminoácido se intercambia por un residuo de aminoácido con una cadena lateral similar. En el campo de la especialidad se han definido familias de ésteres de aminoácido con cadenas laterales similares. Estas familias

comprenden aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina).  
 5 Un residuo de aminoácido no esencial pronosticado en ácido lisofosfatídico aciltransferasa, glicerina-3-fosfato aciltransferasa, diacilglicerina aciltransferasa o lecitina colesterol aciltransferasa se intercambia de esta manera preferiblemente por otro residuo de aminoácido de la misma familia de cadenas laterales. De manera alterna, en otra forma de realización, las mutaciones pueden introducirse de manera aleatoria por toda, o una parte de, la  
 10 secuencia que codifica ácidoLisofosfatídico aciltransferasa, glicerina-3-fosfato aciltransferasa, diacilglicerina aciltransferasa o lecitina colesterol aciltransferasa, por ejemplo mediante mutagénesis de saturación, y los mutantes resultantes pueden tamizarse según la actividad aquí descrita de ácido lisofosfatídico aciltransferasa, glicerina-3-fosfato aciltransferasa, diacilglicerina aciltransferasa o lecitina colesterol Aciltransferasa a fin de identificar mutantes que han mantenido la actividad de ácido lisofosfatídico aciltransferasa, glicerina-3-fosfato aciltransferasa, diacilglicerina aciltransferasa o lecitina colesterol aciltransferasa. Después de la mutagénesis de una de las  
 15 secuencias de la SEQ ID NO: 1, la proteína codificada puede expresarse de manera recombinante y la actividad de la proteína puede determinarse, por ejemplo, usando el ensayo aquí descrito.

Otros objetos de la invención son organismos transgénicos no humanos que contienen los ácidos nucleicos SEQ ID NO: 1 de la invención o un constructo génico o un vector, los cuales contienen estas secuencias de ácido nucleico  
 20 descritas. El organismo no humano es ventajosamente un microorganismo, una animal no humano o una planta, particularmente preferible una planta.

LISTADO DE SECUENCIA

<110> BASF Plant Science GmbH  
 <120> Método para la producción de ácidos grasos insaturados omega-3 en organismos transgénicos  
 25 <130> PF 55371  
 <140> 20040003  
 <141> 2004-02-26  
 <160> 2  
 <170> PatentIn version 3.1  
 30 <210> 1  
 <211> 1086  
 <212> DNA  
 <213> Phytophthora infestans  
 <220>  
 35 <221> CDS  
 <222> (1)..(1086)  
 <223> Omega-3-Desaturasa  
 <400> 1

ES 2 375 363 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| atg | gcg | acg | aag | gag | gcg | tat | gtg | ttc | ccc | act | ctg | acg | gag | atc | aag | 48  |
| Met | Ala | Thr | Lys | Glu | Ala | Tyr | Val | Phe | Pro | Thr | Leu | Thr | Glu | Ile | Lys |     |
| 1   |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     | 15  |     |     |
| cgg | tcg | cta | cct | aaa | gac | tgt | ttc | gag | gct | tcg | gtg | cct | ctg | tcg | ctc | 96  |
| Arg | Ser | Leu | Pro | Lys | Asp | Cys | Phe | Glu | Ala | Ser | Val | Pro | Leu | Ser | Leu |     |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     |     | 30  |     |     |
| tac | tac | acc | gtg | cgt | tgt | ctg | gtg | atc | gcg | gtg | gct | cta | acc | ttc | ggt | 144 |
| Tyr | Tyr | Thr | Val | Arg | Cys | Leu | Val | Ile | Ala | Val | Ala | Leu | Thr | Phe | Gly |     |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| ctc | aac | tac | gct | cgc | gct | ctg | ccc | gag | gtc | gag | agc | ttc | tgg | gct | ctg | 192 |
| Leu | Asn | Tyr | Ala | Arg | Ala | Leu | Pro | Glu | Val | Glu | Ser | Phe | Trp | Ala | Leu |     |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |
| gac | gcc | gca | ctc | tgc | acg | ggc | tac | atc | ttg | ctg | cag | ggc | atc | gtg | ttc | 240 |
| Asp | Ala | Ala | Leu | Cys | Thr | Gly | Tyr | Ile | Leu | Leu | Gln | Gly | Ile | Val | Phe |     |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |     |     |
| tgg | ggc | ttc | ttc | acg | gtg | ggc | cac | gat | gcc | ggc | cac | ggc | gcc | ttc | tcg | 288 |
| Trp | Gly | Phe | Phe | Thr | Val | Gly | His | Asp | Ala | Gly | His | Gly | Ala | Phe | Ser |     |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     |     | 95  |     |



ES 2 375 363 T3

|   |     |
|---|-----|
| cgc tac cac ctg ctt aac ttc gtg gtg ggc act ttc atg cac tcg ctc | 336 |
| Arg Tyr His Leu Leu Asn Phe Val Val Gly Thr Phe Met His Ser Leu |     |
| 100 105 110   |     |
| atc ctc acg ccc ttc gag tcg tgg aag ctc acg cac cgt cac cac cac | 384 |
| Ile Leu Thr Pro Phe Glu Ser Trp Lys Leu Thr His Arg His His His |     |
| 115 120 125   |     |
| aag aac acg ggc aac att gac cgt gac gag gtc ttc tac ccg caa cgc | 432 |
| Lys Asn Thr Gly Asn Ile Asp Arg Asp Glu Val Phe Tyr Pro Gln Arg |     |
| 130 135 140   |     |
| aag gcc gac gac cac ccg ctg tct cgc aac ctg att ctg gcg ctc ggg | 480 |
| Lys Ala Asp Asp His Pro Leu Ser Arg Asn Leu Ile Leu Ala Leu Gly |     |
| 145 150 155 160   |     |
| gca gcg tgg ctc gcc tat ttg gtc gag ggc ttc cct cct cgt aag gtc | 528 |
| Ala Ala Trp Leu Ala Tyr Leu Val Glu Gly Phe Pro Pro Arg Lys Val |     |
| 165 170 175   |     |
| aac cac ttc aac ccg ttc gag cct ctg ttc gtg cgt cag gtg tca gct | 576 |
| Asn His Phe Asn Pro Phe Glu Pro Leu Phe Val Arg Gln Val Ser Ala |     |
| 180 185 190   |     |
| gtg gta atc tct ctt ctc gcc cac ttc ttc gtg gcc gga ctc tcc atc | 624 |
| Val Val Ile Ser Leu Leu Ala His Phe Phe Val Ala Gly Leu Ser Ile |     |
| 195 200 205   |     |
| tat ctg agc ctc cag ctg ggc ctt aag acg atg gca atc tac tac tat | 672 |
| Tyr Leu Ser Leu Gln Leu Gly Leu Lys Thr Met Ala Ile Tyr Tyr Tyr |     |
| 210 215 220   |     |
| gga cct gtt ttt gtg ttc ggc agc atg ctg gtc att acc acc ttc cta | 720 |
| Gly Pro Val Phe Val Phe Gly Ser Met Leu Val Ile Thr Thr Phe Leu |     |
| 225 230 235 240   |     |
| cac cac aat gat gag gag acc cca tgg tac gcc gac tcg gag tgg acg | 768 |
| His His Asn Asp Glu Glu Thr Pro Trp Tyr Ala Asp Ser Glu Trp Thr |     |
| 245 250 255   |     |
| tac gtc aag ggc aac ctc tcg tcc gtg gac cga tcg tac ggc gcg ctc | 816 |
| Tyr Val Lys Gly Asn Leu Ser Ser Val Asp Arg Ser Tyr Gly Ala Leu |     |
| 260 265 270   |     |
| att gac aac ctg agc cac aac atc ggc acg cac cag atc cac cac ctt | 864 |
| Ile Asp Asn Leu Ser His Asn Ile Gly Thr His Gln Ile His His Leu |     |
| 275 280 285   |     |
| ttc cct atc att ccg cac tac aaa ctc aag aaa gcc act gcg gcc ttc | 912 |
| Phe Pro Ile Ile Pro His Tyr Lys Leu Lys Lys Ala Thr Ala Ala Phe |     |
| 290 295 300   |     |
| cac cag gct ttc cct gag ctc gtg cgc aag agc gac gag cca att atc | 960 |
| His Gln Ala Phe Pro Glu Leu Val Arg Lys Ser Asp Glu Pro Ile Ile |     |
| 305 310 315 320   |     |

ES 2 375 363 T3

aag gct ttc ttc cgg gtt gga cgt ctc tac gca aac tac ggc gtt gtg 1008  
 Lys Ala Phe Phe Arg Val Gly Arg Leu Tyr Ala Asn Tyr Gly Val Val  
 325 330 335

gac cag gag gcg aag ctc ttc acg cta aag gaa gcc aag gcg gcg acc 1056  
 Asp Gln Glu Ala Lys Leu Phe Thr Leu Lys Glu Ala Lys Ala Ala Thr  
 340 345 350

gag gcg gcg gcc aag acc aag tcc acg taa 1086  
 Glu Ala Ala Ala Lys Thr Lys Ser Thr  
 355 360

<210> 2

<211> 361

<212> PRT

5 <213> Phytophthora infestans

<400> 2

ES 2 375 363 T3

Met Ala Thr Lys Glu Ala Tyr Val Phe Pro Thr Leu Thr Glu Ile Lys  
1 5 10 15

Arg Ser Leu Pro Lys Asp Cys Phe Glu Ala Ser Val Pro Leu Ser Leu  
20 25 30

Tyr Tyr Thr Val Arg Cys Leu Val Ile Ala Val Ala Leu Thr Phe Gly  
35 40 45

Leu Asn Tyr Ala Arg Ala Leu Pro Glu Val Glu Ser Phe Trp Ala Leu  
50 55 60

Asp Ala Ala Leu Cys Thr Gly Tyr Ile Leu Leu Gln Gly Ile Val Phe  
65 70 75 80

Trp Gly Phe Phe Thr Val Gly His Asp Ala Gly His Gly Ala Phe Ser  
85 90 95

Arg Tyr His Leu Leu Asn Phe Val Val Gly Thr Phe Met His Ser Leu  
100 105 110

Ile Leu Thr Pro Phe Glu Ser Trp Lys Leu Thr His Arg His His His  
115 120 125

Lys Asn Thr Gly Asn Ile Asp Arg Asp Glu Val Phe Tyr Pro Gln Arg  
130 135 140

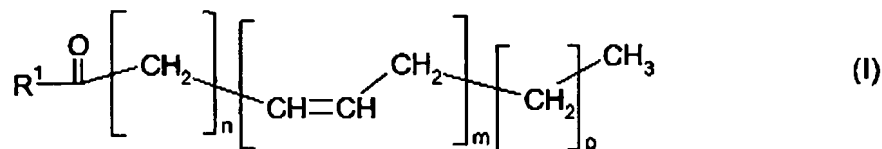
Lys Ala Asp Asp His Pro Leu Ser Arg Asn Leu Ile Leu Ala Leu Gly  
145 150 155 160

Ala Ala Trp Leu Ala Tyr Leu Val Glu Gly Phe Pro Pro Arg Lys Val  
165 170 175

Asn His Phe Asn Pro Phe Glu Pro Leu Phe Val Arg Gln Val Ser Ala  
 180 185 190  
 Val Val Ile Ser Leu Leu Ala His Phe Phe Val Ala Gly Leu Ser Ile  
 195 200 205  
 Tyr Leu Ser Leu Gln Leu Gly Leu Lys Thr Met Ala Ile Tyr Tyr Tyr  
 210 215 220  
 Gly Pro Val Phe Val Phe Gly Ser Met Leu Val Ile Thr Thr Phe Leu  
 225 230 235 240  
 His His Asn Asp Glu Glu Thr Pro Trp Tyr Ala Asp Ser Glu Trp Thr  
 245 250 255  
 Tyr Val Lys Gly Asn Leu Ser Ser Val Asp Arg Ser Tyr Gly Ala Leu  
 260 265 270  
 Ile Asp Asn Leu Ser His Asn Ile Gly Thr His Gln Ile His His Leu  
 275 280 285  
 Phe Pro Ile Ile Pro His Tyr Lys Leu Lys Lys Ala Thr Ala Ala Phe  
 290 295 300  
 His Gln Ala Phe Pro Glu Leu Val Arg Lys Ser Asp Glu Pro Ile Ile  
 305 310 315 320  
 Lys Ala Phe Phe Arg Val Gly Arg Leu Tyr Ala Asn Tyr Gly Val Val  
 325 330 335  
 Asp Gln Glu Ala Lys Leu Phe Thr Leu Lys Glu Ala Lys Ala Ala Thr  
 340 345 350  
 Glu Ala Ala Ala Lys Thr Lys Ser Thr  
 355 360

REIVINDICACIONES

1. Proceso para la producción de compuestos de la fórmula general I



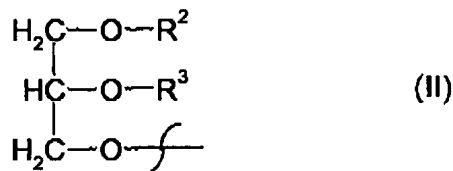
5 en organismos transgénicos con un contenido de al menos 1 % en peso de estos compuestos respecto del contenido total de lípidos del organismo transgénico caracterizado porque comprende los siguientes pasos de proceso:

10 a) introducir al organismo un vector de expresión recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica para una desaturasa ω-3 que presenta actividad de desaturasa ω-3 frente a los ácidos grasos de C<sub>18</sub>, C<sub>20</sub> y C<sub>22</sub>, en cuyo caso se desaturan preferiblemente ácidos grasos de C<sub>20</sub>, y en cuyo caso cerca de 1,5 a 3 % de los ácidos grasos de C<sub>18</sub> presentes en la fuente de ácido graso se convierten en los ácidos grasos ω-3 correspondientes, y

b) criar el organismo en condiciones que hacen posible la producción de los compuestos de la fórmula general I, y

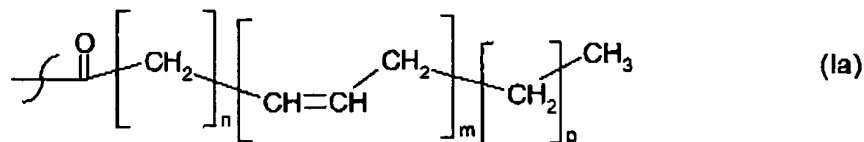
en cuyo caso las variables y sustituyentes en la fórmula I tienen el siguiente significado:

15 R<sup>1</sup> = hidroxilo, coenzima A - (tioéster), liso-fosfatidilcolina, liso-fosfatidiletanoamina, liso-fosfatidilglicerol, liso-difosfatidilglicerol, liso-fosfatidilserina, liso-fosfatidilinositol, esfingobase, o un residuo de la fórmula general II



R<sup>2</sup> = hidrógeno-, liso-fosfatidilcolina, liso-fosfatidiletanolamina, liso-fosfatidilglicerol, liso- difosfatidilglicerol, liso-fosfatidilserina, liso-fosfatidilinositol o alquilcarbonilo saturado o insaturado de C<sub>22</sub>-C<sub>24</sub>,

20 R<sup>3</sup> = hidrógeno, alquilcarbonilo saturado o insaturado de C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub>, o R<sup>2</sup> o R<sup>3</sup> son independientemente entre sí un residuo de la fórmula general Ia:



n = 3,4,5,6,7 o 9, m= 2,3,4,5 o 6 y p=0 o 3,

donde la secuencia de ácido nucleico se selecciona del grupo:

- i. de una secuencia de ácido nucleico con la secuencia representada en SEQ ID NO: 1,
- 25 ii. secuencias de ácido nucleico que como resultado del código genético degenerado pueden derivarse de la secuencia de aminoácido representada en SEQ ID NO: 2, o
- iii. derivados de la secuencia de ácido nucleico representada en SEQ ID NO: 1 que codifican para un polipéptido con al menos 70 % de identidad por toda la región de secuencia de aminoácidos con SEQ 10 NO: 2 que tiene una actividad desaturasa ω-3 frente a ácidos grasos de C<sub>18</sub>, C<sub>20</sub> y C<sub>22</sub>, en cuyo caso preferiblemente se desaturan ácidos

grasos de C<sub>20</sub>, y en cuyo caso cerca de 1,5 a 3 % de los ácidos grasos de C<sub>18</sub> presentes en la fuente de ácido graso se convierten en los ácidos grasos ω-3.

- 5 2. Proceso según la reivindicación 1, caracterizado porque adicional a la secuencia de ácido nucleico introducida, referida en el punto a), la cual codifica para una desaturasa ω-3 que tiene una actividad desaturasa ω-3 frente a ácidos grasos de C<sub>18</sub>, C<sub>20</sub> y C<sub>22</sub>, en cuyo caso preferiblemente se desaturan ácidos grasos de C<sub>20</sub>, y en cuyo caso cerca de 1,5 a 3 % de los ácidos grasos de C<sub>18</sub> presentes en la fuente de ácido graso se convierten en los ácidos grasos ω-3 correspondientes, se introducen otras secuencias de ácido nucleico que codifican para polipéptidos con actividad de Δ-9-elongasa, Δ-6-desaturasa, Δ-8-desaturasa, Δ-6-elongasa, Δ-5-desaturasa, Δ-5-elongasa o Δ-4-desaturasa.
- 10 3. Proceso según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque los sustituyentes R<sup>2</sup> o R<sup>3</sup> independientemente entre sí significan alquilcarbonilo de C<sub>18</sub>-C<sub>22</sub> saturado o insaturado.
4. Proceso según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque los sustituyentes R<sup>2</sup> o R<sup>3</sup> independientemente entre sí significan alquilcarbonilo insaturado de C<sub>18</sub>, C<sub>20</sub> o C<sub>22</sub> con al menos dos enlaces dobles.
- 15 5. Proceso según las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el organismo transgénico es un microorganismo transgénico o una planta transgénica.
6. Proceso según las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque el organismo transgénico es una planta que produce aceite, una planta hortaliza o una planta ornamental.
7. Proceso según las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque el organismo transgénico es una planta transgénica seleccionada del grupo de las familias vegetales Adelotheceae, Anacardiaceae, Asteraceae, Apiaceae, Betulaceae, Boraginaceae, Brassicaceae, Bromeliaceae, Caricaceae, Cannabaceae, Convolvulaceae, Chenopodiaceae, Cryptocodiaceae, Cucurbitaceae, Ditrichaceae, Elaeagnaceae, Ericaceae, Euforbiaceae, Fabaceae, Geraniaceae, Gramineae, Juglandaceae, Lauraceae, Leguminosae, Linaceae o Prasinoficeae.
- 20 8. Proceso según las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque los compuestos de la fórmula general I se aíslan del organismo en forma de sus aceites, lípidos o ácidos grasos libres.
- 25 9. Proceso según las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque los compuestos de la fórmula general I se aíslan en una concentración de al menos 5 % en peso respecto del contenido total de lípido del organismo transgénico.
10. Secuencias de ácido nucleico aisladas que codifican para polipéptidos con actividad desaturasa ω-3 seleccionadas del grupo:
- a) de una secuencia de ácido nucleico con la secuencia representada en SEQ ID NO: 1,
- 30 b) secuencias de ácido nucleico que como resultado del código genético degenerado pueden derivarse de la secuencia de aminoácidos representada en SEQ ID NO: 2, o
- c) Derivados de la secuencia de ácido nucleico representada en SEQ ID NO: 1 que codifican para polipéptidos con al menos 70 % de identidad por toda la región de secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO: 2, los cuales tienen una actividad desaturasa ω-3 frente a ácidos grasos de C<sub>18</sub>, C<sub>20</sub> y C<sub>22</sub>, en cuyo caso se desaturan preferiblemente ácidos grasos de C<sub>20</sub>, y en cuyo caso cerca de 1,5 a 3 % de los ácidos grasos de C<sub>18</sub> presentes en la fuente de ácidos grasos se convierten en los ácidos grasos ω-3 correspondientes.
- 35 11. Secuencia de ácido nucleico aislada según la reivindicación 10, en cuyo caso la secuencia proviene de una alga, un hongo, un microorganismo o un animal no humano.
- 40 12. Secuencia de ácido nucleico aislada según la reivindicación 10 u 11, en cuyo caso la secuencia proviene de la familia de las Pythiaceae.
13. Secuencia de aminoácidos que se codifica por una secuencia de ácido nucleico aislada según una de las reivindicaciones 10 a 12.
14. Constructo génico que contiene un ácido nucleico aislado según una de las reivindicaciones 10 a 12, en cuyo caso el ácido nucleico está enlazado funcionalmente con una o varias señales de regulación.
- 45 15. Constructo génico según la reivindicación 14, caracterizado porque el constructo de ácido nucleico contiene genes adicionales de biosíntesis del metabolismo del ácido graso o del lípido seleccionados del grupo de acil-CoA-

dehidrogenasa (s), acil-ACP[= acil carrier protein]-desaturasa(s), acil-ACP-tioesterasa(s), ácido graso-acil-transferasa(s), acil-CoA:lisofosfolípido-aciltransferasa(s), ácido graso-sintasa(s), ácido graso-hidroxilasa(s), acetil-coenzima A-carboxilasa(s), acil-coenzima A-oxidasa(s), ácido graso-desaturasa(s), ácido graso-acetilenasas, lipoxigenasas, triacilglicero-lipasas, alenóxido-sintasas, hidroperóxido-liasas o ácido graso-elongasa(s).

- 5 16. Constructo génico según la reivindicación 14 o 15, caracterizado porque el constructo de ácido nucleico contiene genes adicionales de biosíntesis del metabolismo de ácido graso o de lípido seleccionados del grupo de la  $\Delta$ -4-desaturasa,  $\Delta$ -5-desaturasa,  $\Delta$ -6-desaturasa,  $\Delta$ -8-desaturasa,  $\Delta$ -9-desaturasa,  $\Delta$ -12-desaturasa,  $\Delta$ -6-elongasa,  $\Delta$ -5-elongasa o  $\Delta$ -9-elongasa.
- 10 17. Organismo transgénico no humano que contiene un constructo génico según la reivindicación 14 en cuyo caso el organismo es un microorganismo o una planta.

Figura 1: Diferentes vías de síntesis para la biosíntesis de DHA (ácido docosahexaenoico)

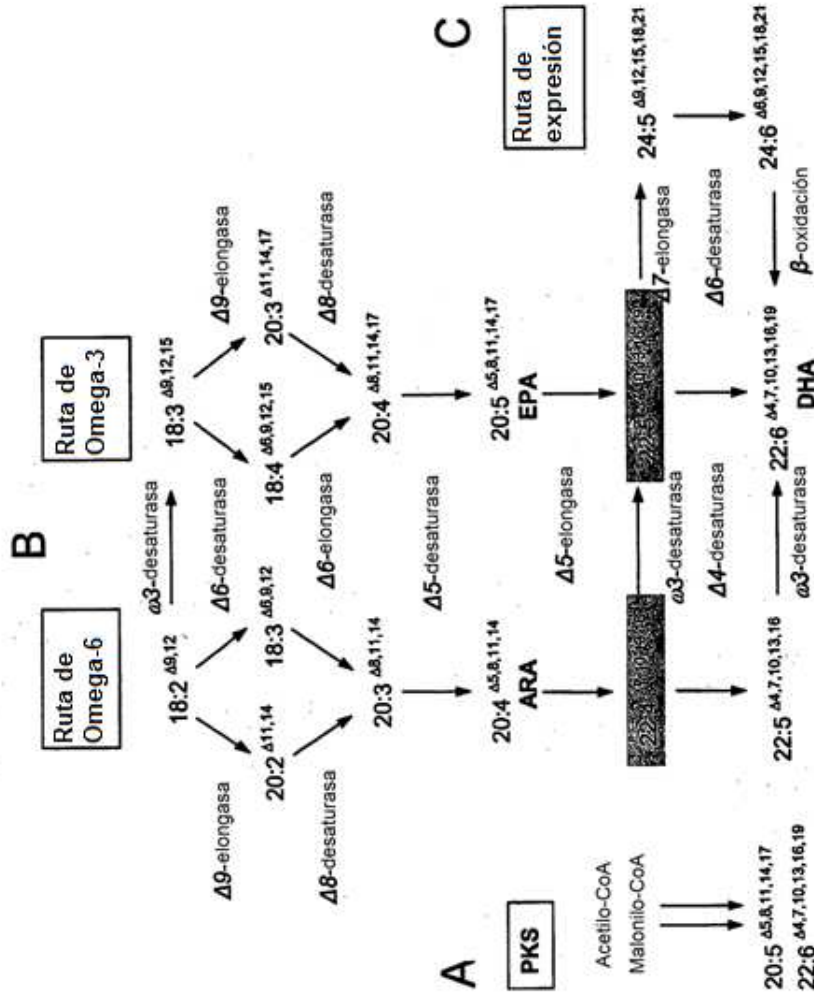




Figura 2: Desaturación de ácido linoléico (18:2 ácido graso  $\omega$ -6) a ácido  $\alpha$ -linolénico(18:3 ácido graso  $\omega$ -3) mediante Pi-omega3Des.

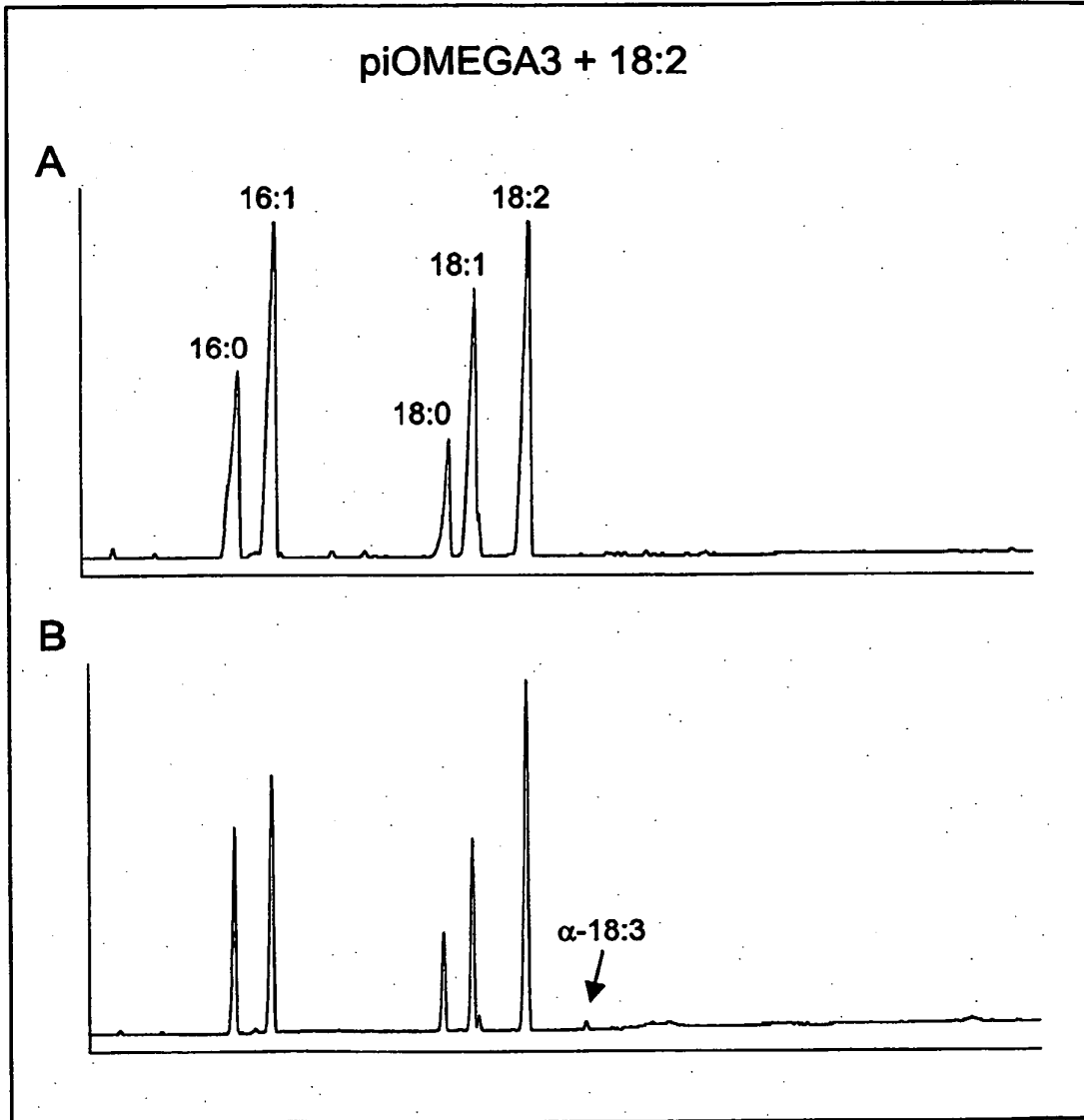


Figura 3: Desaturación de ácido  $\gamma$ -linolénico (ácido graso  $\omega$ -6 18:3) a ácido estearidónico (ácido graso  $\omega$ -3 18:4) mediante Pi-omega3Des..

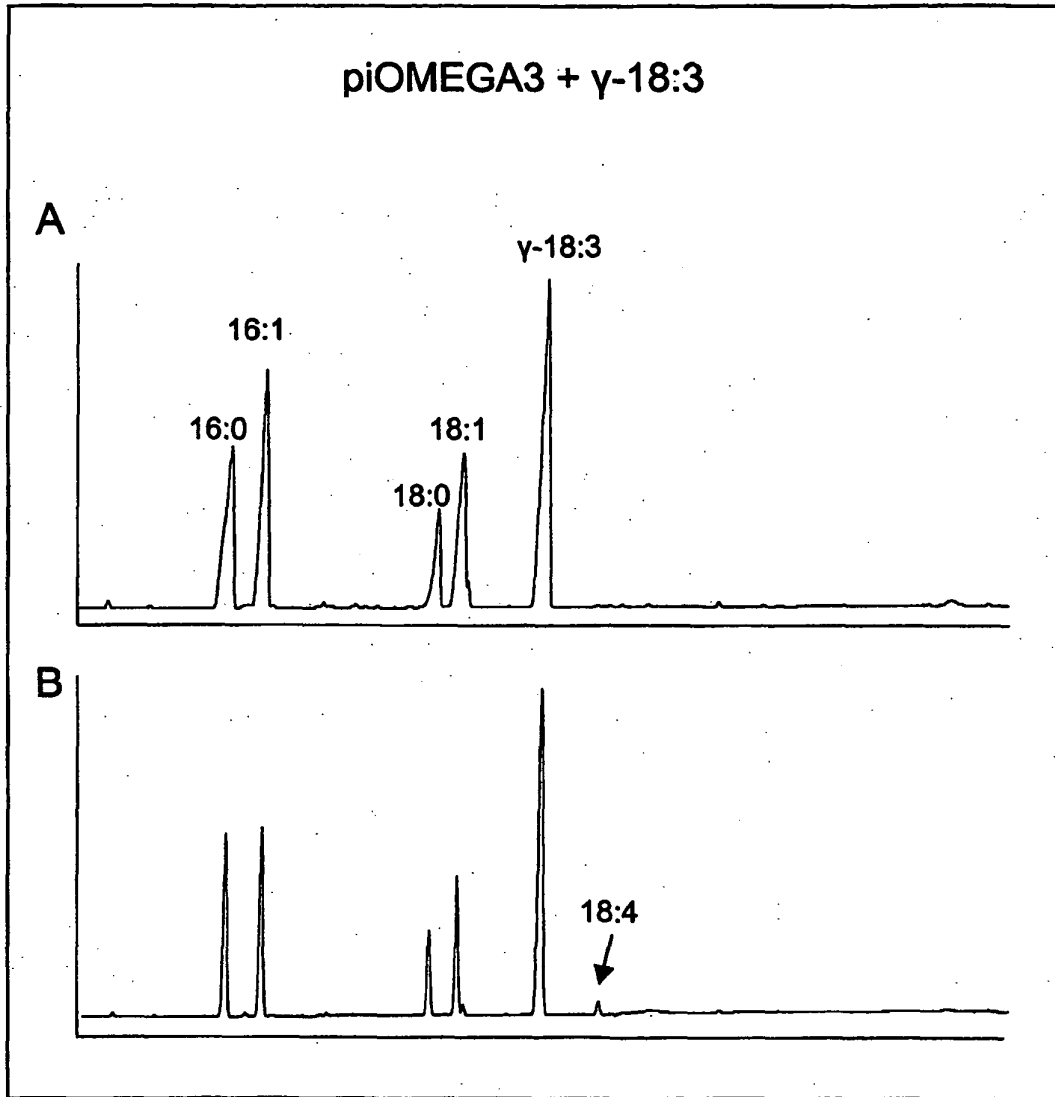


Figura 4: Desaturación de ácido graso  $\omega$ -6 C20:2 a ácido graso  $\omega$ -3 mediante Pi-omega3Des.

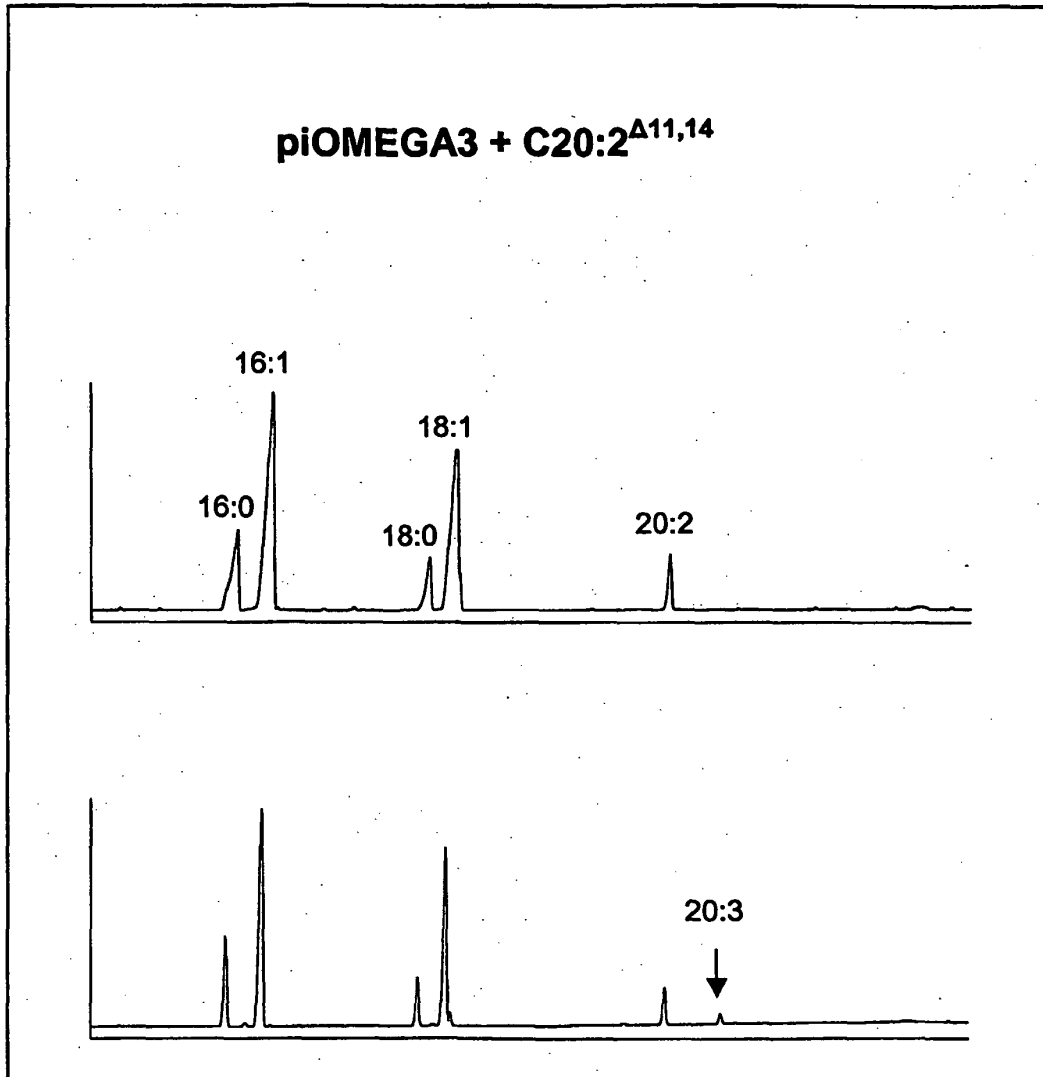


Figura 5: Desaturación de ácido graso  $\omega$ -6 C20:3 a ácido graso  $\omega$ -3 C20:4 mediante Pi-omega3Des.

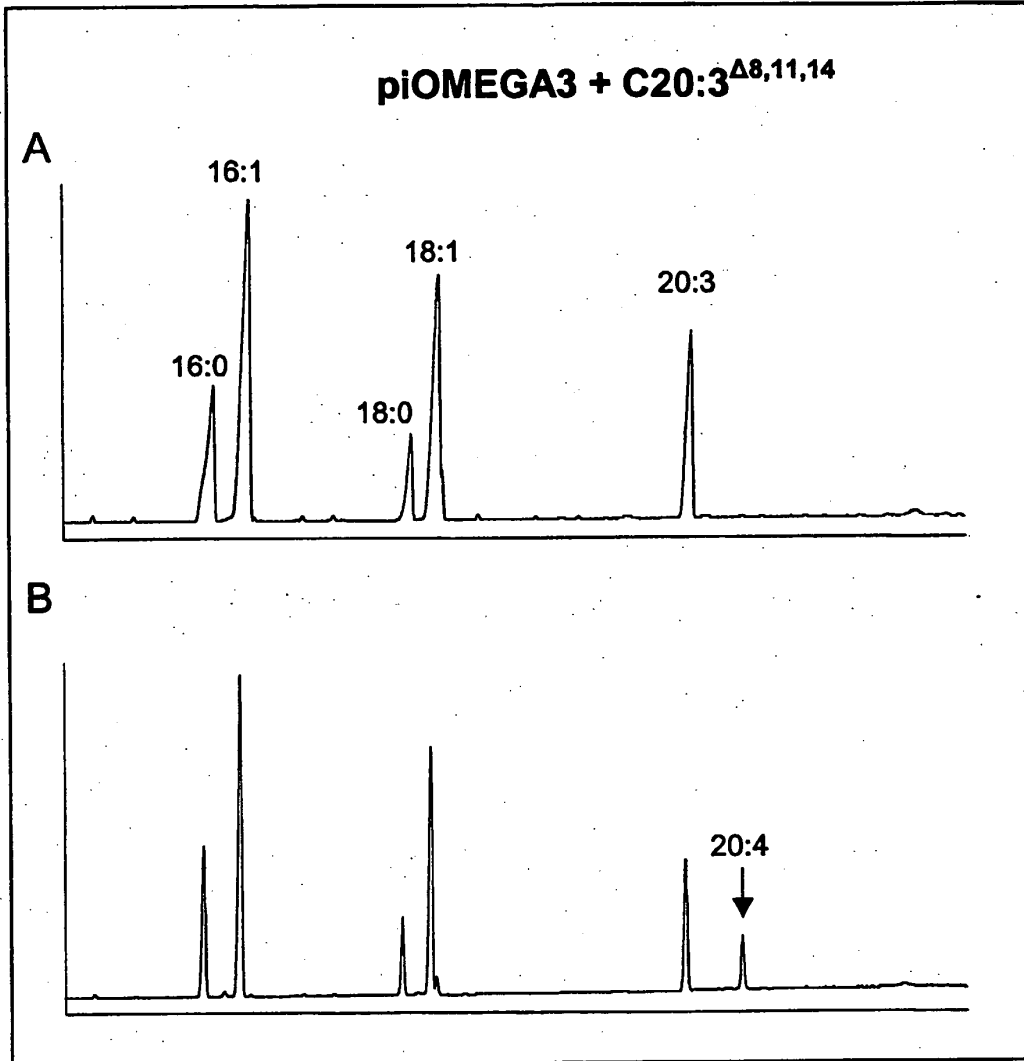


Figura 6: Desaturación de ácido araquidónico (ácido graso  $\omega$ -6 C20:4) a ácido eicosapentanoico (ácido graso  $\omega$ -3 C20:5) mediante la Pi-omega3Des.

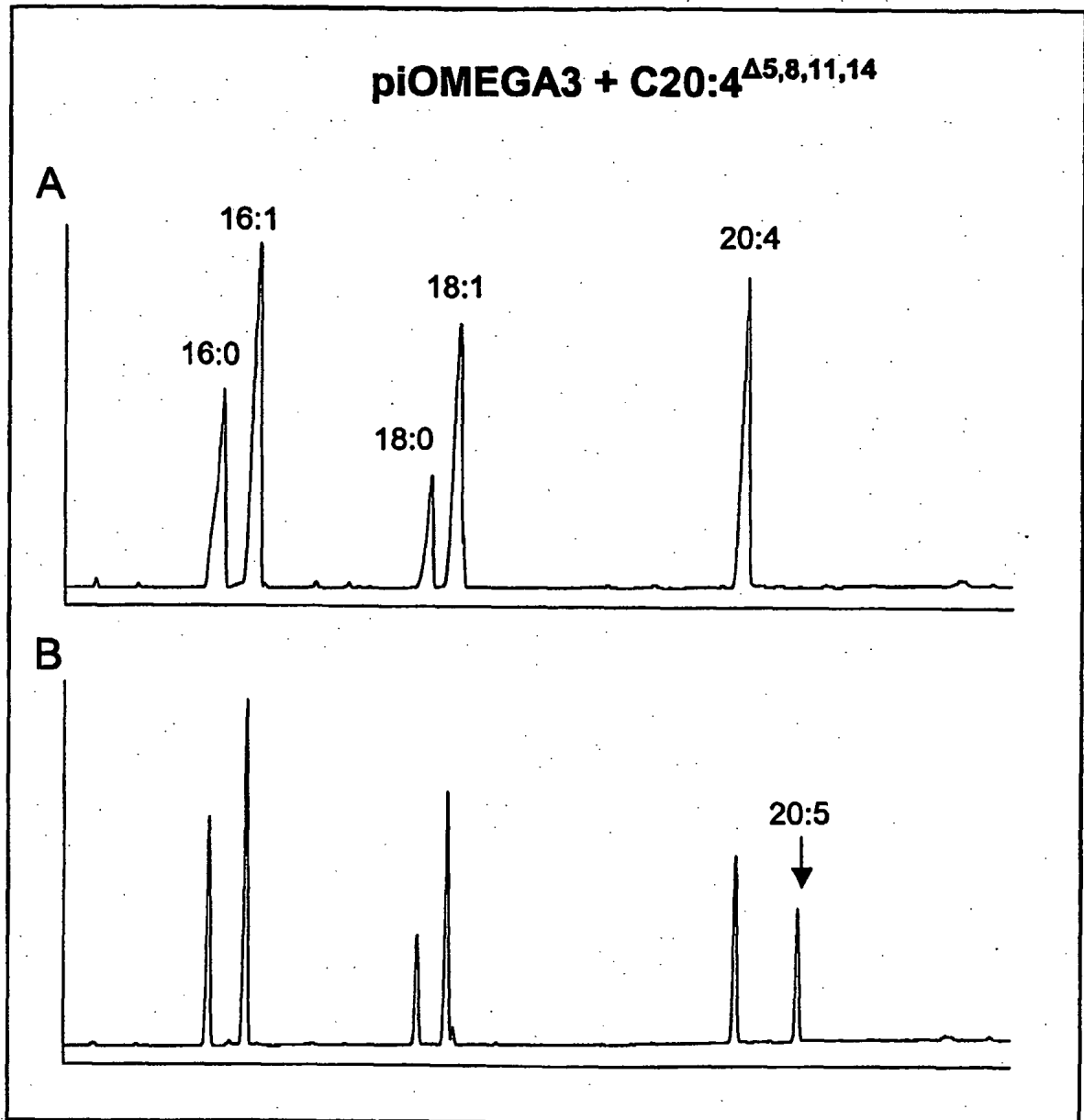


Figura 7: Desaturación de ácido docosatetraenoico (ácido graso  $\omega$ -6 C22:4) a ácido docosapentaenoico (ácido graso  $\omega$ -3 C22:5) mediante Pi-omega3Des.

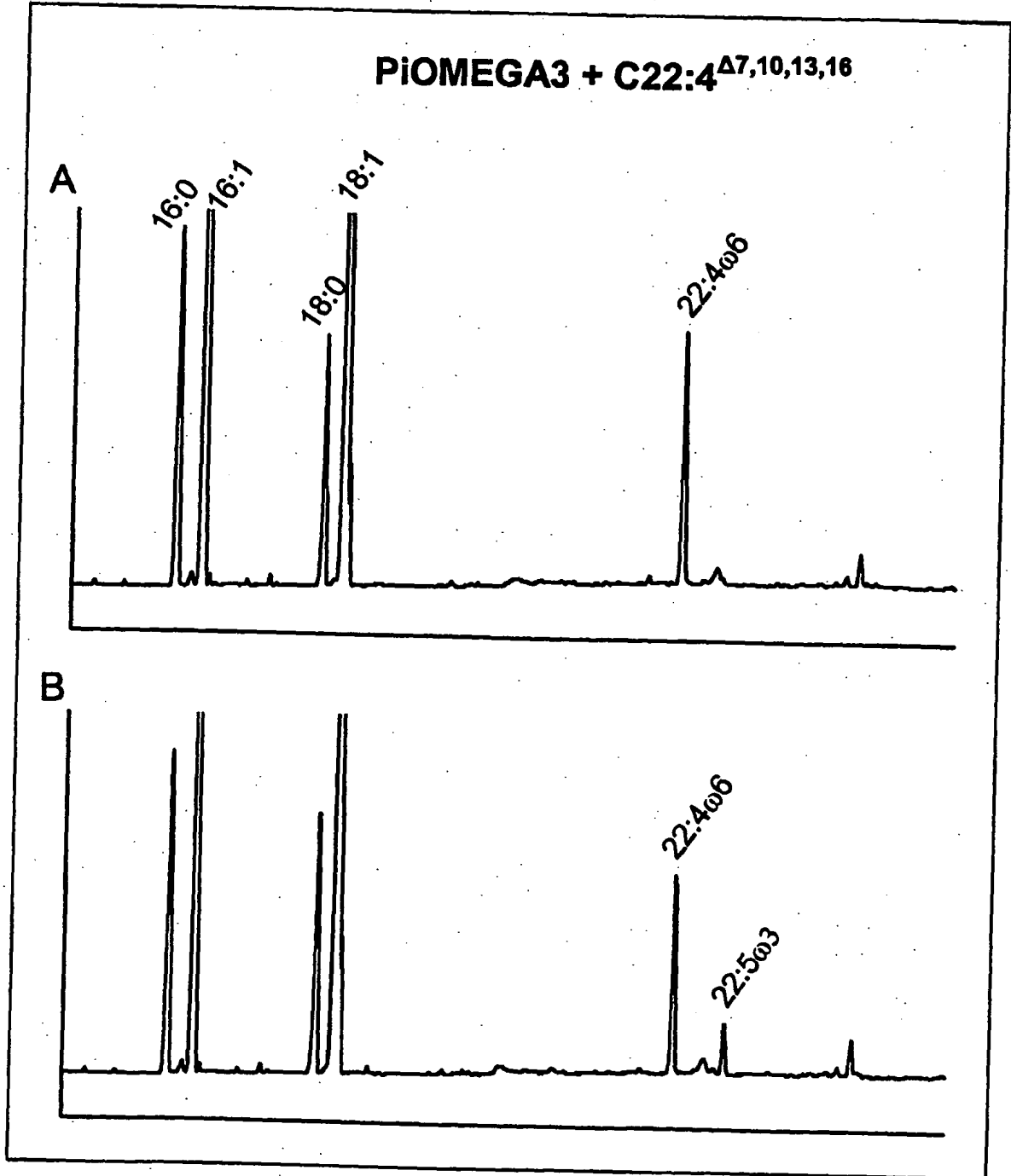


Figura 8: Especificidad de sustrato de la Pi-omega3Des. frente a diferentes ácidos grasos

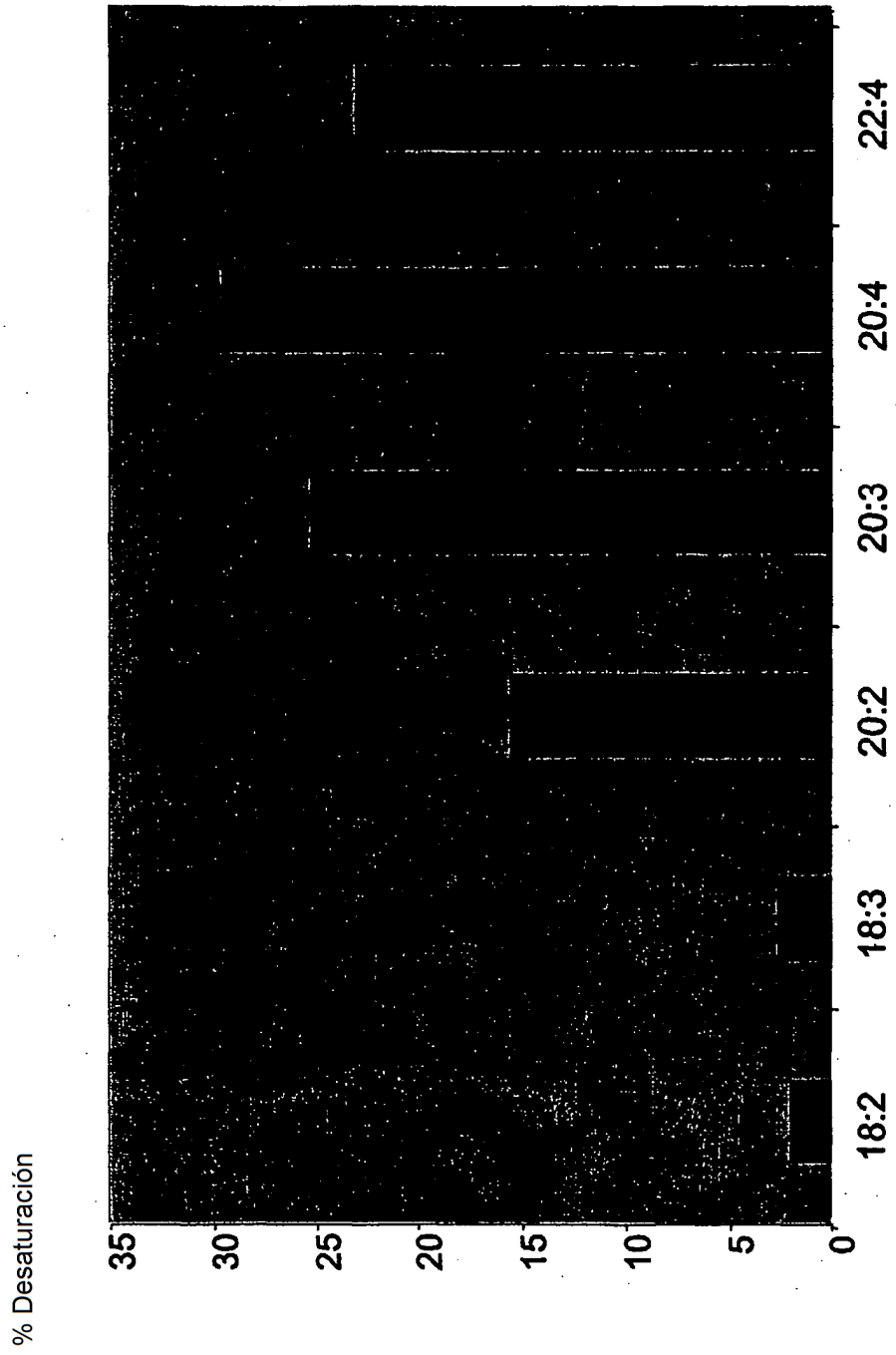


Figura 9. Desaturación de ácido araquidónico enlazado a fosfolípido hasta EPA mediante la Pi-Omega3Des.

