(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 534 937**

(51) Int. CI.:

***C12P 1/02*** (2006.01)
***C07C 45/41*** (2006.01)
***C07D 303/04*** (2006.01)
***C07D 311/72*** (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.1999 E 10180179 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.01.2015 EP 2305825**

(54) Título: **Procedimiento de producción de vitaminas**

(30) Prioridad:

**06.07.1998 US 91983 P**
**06.07.1998 US 91951 P**
**06.07.1998 US 91964 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
**30.04.2015**

(73) Titular/es:

**DCV INC. DOING BUSINESS AS BIO-TECHNICAL RESOURSES (100.0%)**
**1035 South Seventh Street**
**Manitowoc, WI 54220, US**

(72) Inventor/es:

**MILLIS, JAMES R.;**
**SAUCY, GABRIEL G.;**
**MAURINA-BRUNKER, JULIE y**
**MCMULLIN, THOMAS W.**

(74) Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

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

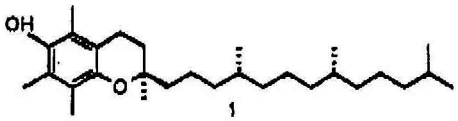
Procedimiento de producción de vitaminas

### CAMPO DE LA INVENCIÓN

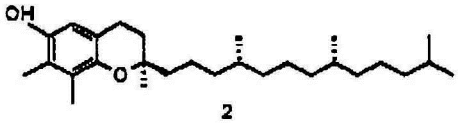
**[0001]** La presente invención se refiere a procedimientos de producción de vitaminas, particularmente de vitaminas A y E y compuestos relacionados.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

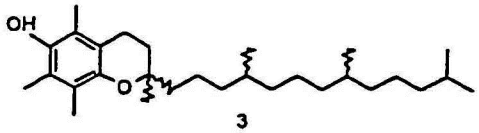
**[0002]** La vitamina E (d-alfa-tocoferol, **1**) es un complemento nutricional importante en seres humanos y animales. El compuesto **1** se obtiene comercialmente mediante aislamiento de una variedad de aceites vegetales, o semisintéticamente mediante metilación de anillo del d-gamma-tocoferol **2** de origen natural relacionado. Es una fuente más importante de vitamina E la síntesis total, que proporciona d,l-alfa-tocoferol **3.** Aunque es una mezcla de isómeros, **3** proporciona mucha de la actividad biológica de **1** y se usa ampliamente debido a su menor coste y mayor disponibilidad. Para una discusión general de la vitamina E, véase L. Machlin, ed., "Vitamin E: A Comprehensive Treatise", Marcel Dekker, NY, 1980.




1

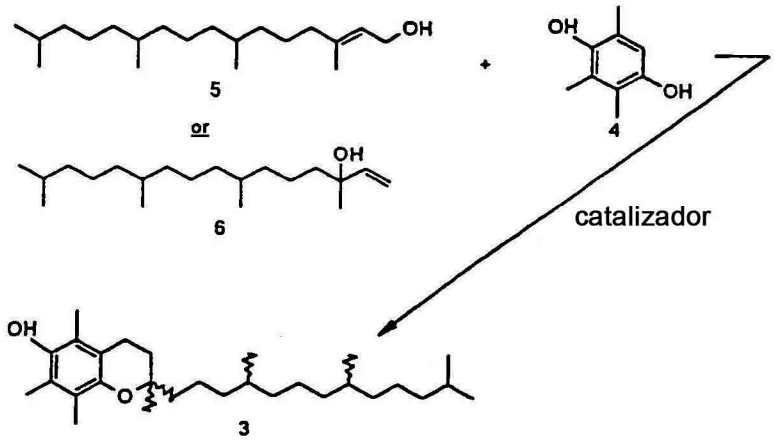



2




3

El d,l-alfa-tocoferol **3** se obtiene haciendo reaccionar trimetilhidroquinona **4** con fitol **5** o isofitol **6** en presencia de un catalizador ácido, a menudo un ácido de Lewis tal como cloruro de cinc. Esta tecnología se ha revisado por S. Kasparek en L. Machlin, ed., "Vitamin E: A Comprehensive Treatise", capítulo 2, pág. 8-65, Marcel Dekker, NY, 1965. Las referencias 140-166 de este capítulo proporcionan las referencias primarias de procedimientos detallados de preparación del compuesto **3**.




El isofitol **6** o fitol **5** necesarios para la preparación de **3** se obtienen mediante una síntesis multietapa. Los materiales de partida incluyen típicamente acetona (véase Kasparek en Machlin, "Vitamin E: A Comprehensive Treatise", pág. 44-45, Dekker, NY 1980, y referencias citadas en la misma) y trímero cíclico de isopreno (Pond y col., US 3.917.710 y 3.862.988 (1975)).

**[0003]** Además, se preparó en primer lugar gamma-tocoferol mediante síntesis total por Jacob, Steiger, Todd y Wilcox (J. Chem. Soc. 1939, 542). Estos investigadores produjeron la vitamina haciendo reaccionar el éster de monobenzoato de 2,3-dimetilhidroquinona con bromuro de fitilo en presencia de cloruro de cinc, seguido de la retirada del benzoato, dando un bajo rendimiento (22%) de gamma-tocoferol. Las síntesis publicadas de tocoferoles y tocotrienoles se han revisado por S. Kasparek en L. Machlin, "Vitamin E - A Comprehensive Treatise", Dekker, NY, 1980; sin embargo, no se han registrado procedimientos adicionales de preparación de gamma-tocoferol.

**[0004]** A pesar de los diversos procedimientos conocidos para preparar o aislar miembros de la familia de la vitamina E de compuestos, continúa habiendo la necesidad de procedimientos de producción mejorados y más eficaces.

**[0005]** Se usan vitamina A (retinol) y la provitamina A β-caroteno en productos farmacéuticos, enriquecimiento alimenticio y complementos dietéticos. El acetato (acetato de retinilo), propionato (propionato de retinilo) y palmitato (palmitato de retinilo) de la vitamina A son los derivados de vitamina A más generalmente usados. Todos de vitamina A, ésteres de vitamina A y β-caroteno actualmente producidos comercialmente se producen mediante síntesis química total, excepto algo de vitamina A que se aísla a partir de fuentes alimenticias. Véase en general "Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology", volumen 24, páginas 140-158 (3ª ed. 1984).

**[0006]** Misawa y Shimada, J Biotechnol. 3 enero 1997; 59(3): 169-8 describen la ruta metabólica para la producción de carotenoides en bacterias y levaduras no carotenogénicas.

**[0007]** Simada et al., Appl Environ Microbiol. Julio 1998; 64(7): 2676-80, describen una mayor producción de carotenoides por la levadura de la comida *Candida utilis* a través de la ruta metabólica del mecanismo de los isoprenoides.

**[0008]** El documento EP-A-0486290 describe un procedimiento y composición para incrementar la acumulación de escualeno y esteroles específicos en levadura.

**[0009]** Continúa habiendo la necesidad de procedimientos mejorados y económicos de producción de vitamina A y ésteres de vitamina A.

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

**[00010]**
La Figura 1A ilustra una representación esquemática de la ruta biosintética de isoprenoides dependiente de mevalonato.
La Figura 1B ilustra una representación esquemática de la ruta biosintética de isoprenoides independiente de mevalonato.
La Figura 2 ilustra una realización de una vía para la síntesis química de vitamina E a partir de geranilgeraniol.
La Figura 3 ilustra una realización de una vía para la síntesis química de vitamina E a partir de farnesol.

La Figura 4 ilustra el crecimiento y la producción de farnesol de cepas derivadas de la cepa MBNA1-13.
La Figura 5 ilustra el crecimiento de cepas naturales, *erg9* y con *ERG9* reparado.
La Figura 6 ilustra la producción de farnesol en microorganismos con producción amplificada de HMG-CoA reductasa.
La Figura 7 ilustra la producción de farnesol y GG en cepas que sobreexpresan GGPP sintasas.
La Figura 8 ilustra el efecto de la producción amplificada de FPP sintasa sobre la producción de farnesol y GG.
La Figura 9 ilustra la ruta de conversión metabólica de isoprenol y prenol en farnesol.
La Figura 10 ilustra una vía de síntesis química para la producción de acetato de vitamina A a partir de farnesol.
La Figura 11 ilustra una vía de síntesis química alternativa para la producción de acetato de vitamina A a partir de farnesol.
La Figura 12 ilustra un procedimiento para preparar β-caroteno a partir de retinal usando una reacción de acoplamiento de carbonilo.
La Figura 13 ilustra un procedimiento para preparar β-caroteno usando una reacción de alquilación.

**DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN**

1.0 Introducción

**[00011]** La presente invención proporciona un procedimiento de fermentación para la producción de farnesol o geranilgeraniol, o las formas fosfato de los mismos, es decir, farnesilpirofosfato (FPP) o geranilgeranilpirofosfato (GGPP), que comprende: a) proporcionar un microorganismo que se ha modificado genéticamente para incrementar el número de copias del gen de HMG-CoA reductasa, cuyo microorganismo es capaz de producir farnesol, geranilgeraniol, FPP o GGPP en un medio de fermentación, en el que el medio de fermentación comprende una fuente de carbono en una cantidad inicial entre aproximadamente 1 gramo por litro y aproximadamente 100 gramos por litro de medio de fermentación; b) cultivar el microorganismo recombinante en condiciones en las que la fuente de carbono en el medio de fermentación se agota y se reconstituye durante la fermentación; y c) recuperar dicho producto, en el que se reduce la actividad de escualeno sintasa de dicho microorganismo, y en el que si el microorganismo es capaz de producir geranilgeraniol o GGPP, el microorganismo comprende además un gen que codifica GGPP sintasa.

**[00012]** Las realizaciones adicionales de la invención se establecen en las reivindicaciones que se acompañan.

**[00013]** También se describe en el presente documento un procedimiento para producir α-tocoferol y ésteres de α-tocoferilo en el que se utiliza un sistema biológico para producir farnesol o geranilgeraniol (GG). El farnesol se puede utilizar como material de partida para sintetizar químicamente el producto final, ésteres de α-tocoferilo. Alternativamente, el farnesol se puede convertir químicamente en GG. El GG, producido biológicamente o mediante síntesis a partir del farnesol, se puede utilizar a continuación como material de partida para producir α-tocoferilo y ésteres de α-tocoferilo. La presente descripción también incluye varios aspectos de materiales biológicos e intermedios útiles en la producción de farnesol o GG mediante producción biológica. La presente descripción también incluye procedimientos de producción de α-tocoferol y ésteres de α-tocoferilo utilizando farnesol y/o GG producidos mediante cualquier medio como material de partida.

**[00014]** La presente descripción también se refiere a un procedimiento para producir vitamina A a partir de farnesol. En una realización preferida, el farnesol se produce biológicamente.

2.0 Producción biológica de farnesol y GG

**[00015]** Los isoprenoides son la mayor familia de productos naturales, con aproximadamente 22.000 estructuras diferentes conocidas. Todos los isoprenoides derivan del compuesto $C_5$ pirofosfato de isopentilo (IPP). Por tanto, las cadenas principales carbonadas de todos los compuestos isoprenoides se crean mediante adiciones secuenciales de las unidades $C_5$ a la cadena poliprenoide en crecimiento.

**[00016]** Aunque las etapas biosintéticas que conducen desde IPP a isoprenoides son universales, existen dos rutas diferentes que conducen a IPP. Los hongos (tales como levadura) y animales poseen la ruta dependiente de mevalonato bien conocida (exhibida en la Figura 1A) que usa acetil CoA como precursor inicial. Las bacterias y plantas superiores, por otro lado, poseen una ruta independiente de mevalonato recién descubierta, también designada en la presenta memoria como la ruta sin mevalonato (exhibida en la Figura 1B) que parte desde piruvato y 3-fosfato de gliceraldehído [Lois y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 2105-2110 (1998); Rohmer y col., J. Am. Chem. Soc. 118, 2564-2566 (1996); Arigoni, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 10600-10605 (1997); Lange y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 2100-2104 (1998)]. En plantas (incluyendo microalgas), hay evidencias de que existen ambas rutas dependiente e independiente de mevalonato, siendo la primera citosólica y la segunda plastídica [Arigoni, y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 10600-10605 (1997); Lange y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 2100-2104 (1998)]. Se han establecido varias etapas de la ruta independiente de mevalonato. La primera

etapa, catalizada por 5-fosfato de D-1-desoxixilulosa sintasa, forma 5-fosfato de D-1-desoxixilulosa a partir de piruvato y 3-fosfato de gliceraldehído. La segunda y tercera etapas, catalizadas por 5-fosfato de D-1-desoxixilulosa reductoisomerasa, catalizan la conversión de 5-fosfato de D-1-desoxixilulosa en 2-C-metil-D-eritritol-4-P (MEP). Son necesarias varias reacciones adicionales para convertir MEP en IPP, y esas enzimas son desconocidas en este momento [Lois y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 2105-2110 (1998); Takahashi y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 2100-2104 (1998); Duvold y col. Tetrahedron Letters, 38, 4769-4772 (1997)].

**[00017]** Farnesol y GG son alcoholes prenílicos producidos mediante la desfosforilación de pirofosfato de farnesilo (FPP) y pirofosfato de geranilgeranilo (GGPP), respectivamente. FPP y GGPP son intermedios en la biosíntesis de compuestos isoprenoides, incluyendo esteroles, ubiquinonas, hemo, dolicoles y carotenoides, y se usan en la prenilación post-traduccional de proteínas. Tanto FPP como GGPP derivan de IPP. Las realizaciones de la presente invención incluyen la producción biológica de farnesol o GG en cultivos de células procariotas o eucariotas y sistemas exentos de células, independientedemente de si el organismo utiliza la ruta dependiente o independiente de mevalonato para la biosíntesis del precursor de todos los isoprenoides, IPP. La referencia en el presente documento a fosfato de farnesilo o fosfato de geranilgeranilo designa los compuestos mono-, di- y trifosfato respectivos, a menos que se designe específicamente una forma específica.

2.1 Microorganismo modificado

**[00018]** Los sistemas biológicos adecuados para producir farnesol y GG incluyen cultivos de células procariotas y eucariotas y sistemas exentos de células. Los sistemas biológicos preferidos incluyen sistemas fúngicos, bacterianos y de microalgas. Los sistemas biológicos más preferidos son cultivos de células fúngicas, más preferiblemente un cultivo de células de levadura, y lo más preferiblemente un cultivo de células *Saccharomyces cerevisiae*. Se prefieren los hongos puesto que tienen un largo historial de uso en procesos industriales y pueden manipularse tanto por técnicas de microbiología clásica como de ingeniería genética. Las levaduras, en particular, están bien caracterizadas genéticamente. Es más, se ha secuenciado el genoma entero de *S. cerevisiae*, y ya se han clonado los genes que codifican las enzimas de la ruta de isoprenoides. La *S. cerevisiae* crece también a altas densidades celulares, y se han notificado cantidades de escualeno y ergosterol (véase la Figura 1) de hasta un 16% del peso celular seco en cepas modificadas por ingeniería genética. Para una revisión reciente de la ruta de isoprenoides en levadura, véase Parks y Casey, Annu. Rev. Microbiol. 49: 95-116 (1995).

**[00019]** El procariota preferido es *E. Coli. E. Coli* está bien establecido como microorganismo industrial utilizado en la producción de metabolitos (aminoácidos, vitaminas) y varias proteínas recombinantes. El genoma completo de *E. Coli* también se ha secuenciado y los sistemas genéticos están muy desarrollados. Tal como se ha mencionado anteriormente, *E. Coli* utiliza la ruta independiente de mevalonato para la síntesis de IPP. Los genes *dxs, dxr, idi* e *ispA* de *E. Coli*, que codifican D-1-desoxixilulosa 5-fosfato sintasa, D-1-desoxixilulosa 5-fosfato reductoisomerasa, IPP isomerasa y FPP sintasa, respectivamente, se han clonado y secuenciado (Fujisaki et al. J. Biochem. 108, 995-1000 (1990); Lois et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 2105-2110 (1998); Hemmi et al., J. Biochem., 123, 1088-1096 (1998)].

**[00020]** Las microalgas preferidas para uso en la presente invención incluyen *Chlorella* y *Prototheca*.

**[00021]** Los organismos adecuados útiles en la producción de farnesol y GG están disponibles de numerosas fuentes, tales como la “American Type Culture Collection (ATCC)”, Rockville, MD, la “Culture Collection of Algae (UTEX)”, Austin, TX, el “Northern Regional Research Laboratory (NRRL)”, Peoria, IL y el “E. coli Genetic Stock Center (CGSC)”, New Haven, CT. En particular, hay colecciones de cultivo de *S. cerevisiae* que se han usado para estudiar la ruta de isoprenoides que están disponibles, por ejemplo, por Jasper Rine en la “University of California”, Berkeley, CA y por Leo Parks en la “North Carolina State University”, Raleigh, NC.

**[00022]** Preferiblemente, las células usadas en el cultivo celular están genéticamente modificadas para incrementar el rendimiento de farnesol o GG. Las células pueden modificarse genéticamente mediante técnicas de ingeniería genética (concretamente, tecnología recombinante), técnicas de microbiología clásicas o una combinación de dichas técnicas, y pueden incluir también variantes genéticas de origen natural. Algunas de dichas técnicas se dan a conocer en general, por ejemplo, en Sambrook y col., 1989, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor Labs Press. Un microorganismo modificado genéticamente puede incluir un microorganismo en el que se han insertado, eliminado o modificado moléculas de ácido nucleico (concretamente mutado, por ejemplo, mediante inserción, deleción, sustitución y/o inversión de nucleótidos) de tal manera que dichas modificaciones proporcionen el efecto deseado de rendimientos aumentados de farnesol o GG en el microorganismo o en el sobrenadante de cultivo. Como se usa en el presente documento, las modificaciones genéticas que dan como resultado una reducción de la expresión génica, de la función del gen o de la función del producto génico (concretamente, la proteína codificada por el gen) pueden designarse como inactivación (completa o parcial), deleción, interrupción, bloqueo o regulación por disminución de un gen. Por ejemplo, una modificación genética en un gen que da como resultado una reducción de la función de la proteína codificada por dicho gen puede ser el resultado de una deleción completa del gen (concretamente, el gen no existe y por lo tanto la proteína no existe),

una mutación en el gen que da como resultado la traducción incompleta o nula de la proteína (por ejemplo, la proteína no se expresa) o una mutación en el gen que reduce o anula la función natural de la proteína (por ejemplo, se expresa una proteína que tiene una actividad enzimática reducida o nula). Las modificaciones genéticas que dan como resultado un aumento de la expresión o función génica pueden designarse como amplificación, sobreproducción, sobreexpresión, potenciación, adición o regulación por aumento de un gen. La adición de genes clonados para incrementar la expresión génica puede incluir mantener el gen o genes clonados en plásmidos replicantes o integrar el gen o genes clonados en el genoma del organismo productor. Además, aumentar la expresión de los genes clonados deseados puede incluir ligar operativamente el gen o genes clonados con elementos de control transcripcional nativos o heterólogos.

2.1.1 Modificaciones de escualeno sintasa

**[00023]** Las realizaciones de la presente invención incluyen la producción biológica de farnesol o GG mediante el cultivo de un microorganismo, preferiblemente levadura, que se ha modificado genéticamente para modular la actividad de una o más de las enzimas de su ruta biosintética de isoprenoides. En una realización, se ha modificado genéticamente un microorganismo reduciendo (incluyendo eliminando) la acción de la actividad escualeno sintasa (véase la Figura 1). Por ejemplo, se han producido mutantes *erg9* de levadura que son incapaces de convertir mevalonato en escualeno, y que acumulan farnesol. Karst y Lacroute, Molec. Gen. Genet., 154, 269-277 (1977); patente de EE.UU. nº 5.589.372. Como se usa en el presente documento, la referencia a mutante o mutación *erg9* designa en general una modificación genética que reduce la acción de la escualeno sintasa, tal como bloqueando o reduciendo la producción de escualeno sintasa, reduciendo la actividad escualeno sintasa o inhibiendo la actividad escualeno sintasa, lo que da como resultado la acumulación de difosfato de farnesilo (FPP) a menos que el FPP se convierta de otra forma en otro compuesto, tal como farnesol mediante actividad fosfatasa. Bloquear o reducir la producción de escualeno sintasa puede incluir disponer el gen *ERG9* bajo el control de un promotor que requiera la presencia de un compuesto inductor en el medio de crecimiento. Al establecer condiciones tales que el inductor se agote en el medio, podría inactivarse la expresión de *ERG9* (y por lo tanto la síntesis de escualeno sintasa). También algunos promotores se inactivan por la presencia de un compuesto represor. Por ejemplo, los promotores de levadura de los genes *CTR3* o *CTR1* pueden reprimirse mediante la adición de cobre. El bloqueo o reducción de la actividad escualeno sintasa podría incluir también usar un enfoque de tecnología de escisión similar al descrito en la patente de EE.UU. nº 4.743.546. En este enfoque, se clona el gen *ERG9* entre las secuencias genéticas específicas que permiten una escisión específica controlada del gen *ERG9* del genoma. La escisión podría incitarse, por ejemplo, por un desplazamiento de la temperatura de cultivo del cultivo, como en la patente de EE.UU. nº 4.743.546, o mediante alguna otra señal física o nutricional. Dicha modificación genética incluye cualquier tipo de modificación e incluye específicamente modificaciones realizadas mediante tecnología recombinante y mediante mutagénesis clásica. Son conocidos inhibidores de escualeno sintasa (véase la patente de EE.UU. nº 4.871.721 y las referencias citadas en la patente de EE.UU. nº 5.475.029) y pueden añadirse a los cultivos celulares. En otra realización, un organismo que tiene la ruta independiente de mevalonato de biosíntesis de isoprenoides (tal como *E. coli*) se modifica genéticamente de modo que acumule FPP y/o farnesol. Por ejemplo, se esperaría que reducir la actividad pirofosfato de octaprenilo sintasa (el producto del gen *ispB*), diera como resultado la acumulación de FPP en *E. coli.* (Asai, y col., Biochem. Biophys. Res. Comm. 202, 340-345 (1994)). La acción de una fosfatasa podría resultar adicionalmente en la acumulación de farnesol en *E. coli*.

**[00024]** Las cepas de levadura necesitan ergosterol para la fluidez de la membrana celular, así que los mutantes con bloqueo de la ruta de ergosterol, tales como mutantes *erg9*, necesitan ergosterol ajeno u otros esteroles añadidos al medio para que las células permanezcan viables. Las células normalmente no pueden utilizar este esterol adicional a menos que crezcan en condiciones anaeróbicas. Por lo tanto, una realización adicional de la presente invención es la utilización de una levadura en la que se reduce la acción de la escualeno sintasa, tal como un mutante *erg9*, y que capta esteroles suministrados exógenamente en condiciones aeróbicas. Las modificaciones genéticas que permiten a la levadura utilizar esteroles en condiciones aeróbicas se muestran a continuación en la sección de ejemplos (véase el Ejemplo 1) y son también conocidas en la técnica. Por ejemplo, dichas modificaciones genéticas incluyen *upc* (mutación de control de la captación que permite a las células captar esteroles en condiciones aeróbicas) y *hem1* (el gen *HEM1* codifica la ácido aminolevulínico sintasa, que es la primera etapa implicada en la ruta biosintética de hemo a partir de FPP, y los mutantes *hem1* son capaces de captar ergosterol en condiciones aeróbicas después de una perturbación de la ruta biosintética del ergosterol, a condición de que los cultivos se complementen con ácidos grasos insaturados). Pueden producirse cepas de levadura que tienen estas mutaciones usando técnicas conocidas y están también disponibles, por ejemplo, por el Dr. Leo Parks, “North Carolina State University”, Raleigh, NC. Las células haploides que contienen estas mutaciones pueden usarse para generar otros mutantes mediante cruces genéticos con otras células haploides. También puede usarse la sobreexpresión del gen *SUT1* (captación de esterol) para permitir la captación de esteroles en condiciones aeróbicas. El gen *SUT1* se ha clonado y secuenciado. Bourot y Karst, Gene, 165: 97-102 (1995).

**[00025]** En una realización adicional, los microorganismos de la presente invención pueden usarse para producir farnesol y/o GG mediante el cultivo de microorganismos en presencia de un inhibidor de escualeno sintasa. De esta manera, se reduce la acción de la escualeno sintasa. Los inhibidores de escualeno sintasa son conocidos

por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5.556.990).

2.1.2 Modificaciones de HMG-CoA reductasa

**[00026]** Una realización de la presente invención es la utilización de un microorganismo que se ha modificado genéticamente para incrementar la acción de la HMG-CoA reductasa. Debe observarse que la referencia a aumentar la acción de la HMG-CoA reductasa y otras enzimas debatidas en el presente documento designa cualquier modificación genética en el microorganismo en cuestión que dé como resultado una funcionalidad aumentada de las enzimas e incluye una mayor actividad de las enzimas, inhibición o degradación reducida de las enzimas y sobreexpresión de las enzimas. Por ejemplo, el número de copias del gen puede aumentarse, los niveles de expresión pueden aumentarse mediante la utilización de un promotor que dé niveles mayores de expresión que la del promotor nativo, o un gen puede alterarse mediante ingeniería genética o mutagénesis clásica para incrementar la actividad de una enzima. Una de las enzimas clave en la ruta biosintética de isoprenoides dependiente de mevalonato es la HMG-CoA reductasa, que cataliza la reducción de 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA). Esta es la etapa primaria limitante de la velocidad y la primera irreversible en la ruta, y aumentar la actividad HMG-CoA reductasa conduce a mayores rendimientos de escualeno y ergosterol en una cepa natural de *S. cerevisiae*, y de farnesol en una cepa *erg9*. Un mecanismo mediante el que puede aumentarse la acción de la HMG-CoA reductasa es reduciendo la inhibición de la enzima, modificando genéticamente la enzima o modificando el sistema para retirar el inhibidor. Por ejemplo, tanto los productos de esterol como no de esterol de la ruta de isoprenoides inhiben por realimentación esta enzima (véase, por ejemplo, Parks y Casey, Annu. Rev. Microbiol. 49: 95-116 (1995). Como alternativa, o además, el gen o genes que codifican HMG-CoA reductasa pueden alterarse mediante técnicas de ingeniería genética o mutagénesis clásica para reducir o evitar la inhibición. También puede aumentarse la acción de la HMG-CoA reductasa aumentando el número de copias del gen, aumentando el nivel de expresión del gen o genes de HMG-CoA reductasa o alterando el gen o genes de HMG-CoA reductasa mediante ingeniería genética o mutagénesis clásica para incrementar la actividad de la enzima. Véase la patente de EE.UU. nº 5.460.949. Por ejemplo, se han producido HMG-CoA reductasas truncadas en que se ha retirado el dominio regulador y la utilización de números de copia del gen de hasta aproximadamente 6 da una actividad aumentada. Id. Véase también Downing y col., Biochem. Biophys. Res. Commun., 94, 974-79 (1980), que describe dos mutantes de levadura que tienen niveles aumentados de HMG-CoA reductasa. Existen en *S. cerevisiae* dos isoenzimas de HMG-CoA reductasa, codificadas por los genes *HMG1* y *HMG2*. La actividad de estas dos isozimas está regulada por varios mecanismos, incluyendo la regulación de la transcripción, la regulación de la traducción y, para Hmg2p, la degradación de la enzima en el retículo endoplasmático (Hampton y Rine, 1994; Donald, y col. 1997). Tanto en Hmg1p como en Hmg2p, el dominio catalítico reside en la porción COOH-terminal de la enzima, mientras que el dominio regulador reside en la región $NH_2$-terminal que atraviesa la membrana. Se ha mostrado que la sobreexpresión de solo el dominio catalítico de Hmg1p en *S. cerevisiae* aumenta el flujo de carbono por la ruta de isoprenoides, dando como resultado la sobreproducción de escualeno (Saunders, y col. 1995; Donald, y col., 1997). Los presentes inventores han expresado el dominio catalítico de Hmg2p de *S. cerevisiae* en cepas que tienen una ruta normal de isoprenoides (concretamente no bloqueada) y han observado un aumento significativo de la producción de escualeno. Además, la sobreexpresión del dominio catalítico de Hmg2p dio como resultado una producción de farnesol aumentada en un mutante *erg9* y una producción aumentada de farnesol y GG en un mutante *erg9* que sobreexpresaba GGPP sintasa, cultivado en fermentadores.

2.1.3 Modificaciones de GGPP sintasa

**[00027]** Una realización adicional de la presente invención es la utilización de un microorganismo que se ha modificado genéticamente para incrementar la acción de la GGPP sintasa. Se han identificado los genes que codifican esta enzima de una variedad de fuentes, incluyendo bacterias, hongos, plantas, mamíferos y arqueobacterias. Véanse Brinkhaus y col., Arch. Biochem. Biophys., 266, 607-612 (1988); Carattoli y col., J. Biol. Chem., 266, 5854-59 (1991); Chen y col., J. Biol. Chem., 268, 11002-11007 (1993); Dogbo y col., Biochim. Biophys. Acta, 920, 140-148 (1987); Jiang y col., J. Biol. Chem., 270, 21793-99 (1995); Kuntz y col., Plant J., 2, 25-34 (1992); Laferriere, y col., Biochim. Biophys. Acta, 1077, 167-72 (1991); Math y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 6761-64 (1992); Ohnuma y col., J. Biol. Chem., 269, 14792-97 (1994); Sagami y col., Arch. Biochem. Biophys., 297, 314-20 (1992); Sagami y col., J. Biol. Chem., 269, 20561-66 (1994); Sandmann y col., J. Photochem, Photobiol. B: Biol., 18, 245-51 (1993); Scolnik y col., Plant Physiol., 104, 1469-70 (1994); Tachibana y col., Biosci. Biotech. Biochem., 7, 1129-33 (1993); Tachibana y col., J. Biochem., 114, 389-92 (1993); Wiedemann y col., Arch. Biochem. Biophys., 306, 152-57 (1993). Algunos organismos tienen una enzima bifuncional que sirve también como FPP sintasa, de modo que está implicada en la conversión global de IPP y DMAPP en FPP y GGPP (véase la Figura 1). Algunas enzimas, tales como las encontradas en plantas, tienen una especificidad relajada, convirtiendo IPP y DMAPP en GGPP (véase la Figura 1). Las modificaciones genéticas de la GGPP sintasa, como se usa en el presente documento, comprenden modificar por ingeniería genética una FPP/GGPP sintasa bifuncional para potenciar el componente de actividad GGPP sintasa de la enzima. Es un gen de GGPP sintasa preferido el gen *BTS1* de *S. cerevisiae*. Se describen el gen *BTS1* y su aislamiento en Jiang y col., J. Biol. Chem., 270, 21793-99 (1995) y la solicitud en tramitación junto con la presente de nº de serie 08/761.344, presentada el 6 de diciembre de 1996. Sin embargo, pueden usarse GGPP sintasas de otros hospedadores, y la utilización de GGPP sintasas bifuncionales puede ser

particularmente ventajoso en términos de canalizar el flujo de carbono a través de FPP a GGPP, evitando así la pérdida de FPP en reacciones competitivas en la célula.

**[00028]** En realizaciones adicionales de la invención, además de las modificaciones de la GGPP sintasa descritas anteriormente, se elimina la GGPP sintasa natural del organismo de producción. Esto serviría, por ejemplo, para eliminar la competición entre la GGPP sintasa modificada y la enzima natural por los sustratos FPP e IPP. La deleción del gen natural que codifica la GGPP sintasa podría mejorar también la estabilidad del gen de GGPP sintasa clonado al retirar regiones de alta homología de secuencia genética, evitando así una recombinación genética potencialmente perjudicial.

2.1.4 Modificaciones de la FPP sintasa

**[00029]** Una realización adicional de la presente invención es la utilización de un microorganismo que se ha modificado por ingeniería genética para incrementar la acción de la FPP sintasa.

**[00030]** Se han identificado genes que codifican esta enzima de una variedad de fuentes. Véanse Anderson y col., J. Biol. Chem., 264, 19176-19184 (1989); Attucci, y col., Arch. Biochem. Biophys., 321, 493-500 (1995); Cane y col., J. Am. Chem. Soc., 105, 122-124 (1983); Chambon y col., Current Genetics, 18, 41-46 (1990); Chambon y col., Lipids, 26, 633-36 (1991); Chen y col., Protein Science, 3, 600-607 (1994); Davisson, y col., J. Am. Chem. Soc., 115, 1235-45 (1993); Ding y col., Biochem. J., 275, 61-65 (1991); Hugueney y col., FEBS Letters, 273, 235-38 (1990); Joly y col., J. Biol. Chem., 268, 26983-89 (1993); Koyama y col., J. Biochem., 113, 355-63 (1993); Sheares, y col., Biochem., 28, 8129-35 (1989); Song y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 3044-48 (1994); Spear y col., J. Biol. Chem., 267, 14662-69 (1992); Apear y col., J. Biol. Chem., 269, 25212-18 (1994). Anderson y col., J. Biol. Chem., 264, 19176-19189 (1989) han notificado una sobreexpresión de 2-3 veces de la FPP sintasa con el gen de *S. cerevisiae* en un vector lanzadera de levadura.

**[00031]** Como se describe en la sección de ejemplos, se ha encontrado sorprendentemente que la sobreexpresión de FPP sintasa no conducía a un aumento de la producción de farnesol, sino que inesperadamente conduce a un aumento de la producción de GG en ausencia de sobreexpresión de la GGPP sintasa.

**[00032]** En realizaciones adicionales de la invención, además de las modificaciones de la FPP sintasa descritas anteriormente, se elimina la FPP sintasa natural del organismo de producción. Esto serviría, por ejemplo, para eliminar la competición entre la FPP sintasa modificada y la enzima natural por los sustratos IPP, DMAPP y GPP. La deleción del gen natural que codifica la FPP sintasa podría mejorar también la estabilidad del gen de FPP sintasa clonado retirando regiones de alta homología de secuencia genética, evitando así una recombinación genética potencialmente perjudicial.

2.1.5 Modificaciones de fosfatasa

**[00033]** Una realización adicional de la presente invención es la utilización de un microorganismo que se ha modificado por ingeniería genética para incrementar la acción de la fosfatasa para incrementar la conversión de FPP en farnesol o de GGPP en GG. Por ejemplo, tanto *S. cerevisiae* como *E. coli* contienen numerosas actividades fosfatasa. Al ensayar con varias fosfatasas la desfosforilación eficaz de FPP o GGPP, podría seleccionarse la fosfatasa apropiada y expresar el gen que codifica esta enzima en un organismo productor para potenciar la producción de farnesol o GG. Además de (o en lugar de) aumentar la acción de una fosfatasa deseada para potenciar la producción de farnesol o GG, podrían eliminarse, por medios genéticos, las actividades fosfatasa indeseables. Por ejemplo, podría eliminarse mediante mutación la actividad de una fosfatasa que actúe específicamente sobre FPP, de modo que el FPP reservado estuviera disponible para la conversión en GGPP y posteriormente GG.

2.1.6 Modificaciones genéticas adicionales

**[00034]** Modificaciones de otras enzimas de la ruta de isoprenoides. Se describen anteriormente las modificaciones que pueden hacerse para incrementar la acción de la HMG-CoA reductasa, GGPP sintasa y fosfatasas. La modificación de la acción de las enzimas de la ruta de isoprenoides no está limitada a estos ejemplos específicos, y pueden aplicarse estrategias similares para modificar la acción de otras enzimas de la ruta de isoprenoides tales como acetoacetil Co-A tiolasa, HMG-CoA sintasa, mevalonato cinasa, fosfomevalonato cinasa, fosfomevalonato descarboxilasa, IPP isomerasa, pirofosfato de farnesilo sintasa, 5-fosfato de D-1-desoxixilulosa sintasa o 5-fosfato de D-1-desoxixilulosa reductoisomerasa.

**[00035]** Modificación por ingeniería genética del metabolismo central para incrementar el suministro de precursor a la ruta de isoprenoides. En organismos que tienen la ruta de isoprenoides dependiente de mevalonato, la biosíntesis de farnesol o GG empieza con acetil CoA (designado en la Figura 1). Una realización de la presente invención es la modificación genética del organismo de producción, de manera que se aumenta el nivel intracelular

de acetil CoA, haciendo que haya más acetil CoA disponible para dirigirse a la ruta de isoprenoides (y por tanto a farnesol y/o GG). Por ejemplo, el suministro de acetil CoA puede aumentarse aumentando la acción del complejo de piruvato deshidrogenasa. El suministro de acetil CoA puede aumentarse adicionalmente aumentando el nivel de piruvato en la célula aumentando la acción de la piruvato cinasa. En organismos que tienen la ruta de isoprenoides independiente de mevalonato, la biosíntesis de isoprenoides empieza por piruvato y 3-fosfato de gliceraldehído. El suministro de piruvato y 3-fosfato de gliceraldehído disponible para la biosíntesis de isoprenoides puede aumentarse aumentando la acción de la piruvato cinasa y la trifosfato isomerasa, respectivamente.

**[00036]** Los ejemplos anteriores se proporcionan solo para ilustrar el concepto de modificación por ingeniería genética del metabolismo central con el fin de aumentar la producción de compuestos isoprenoides, y no son una lista exhaustiva de los enfoques que pueden tomarse. Podrían aplicarse numerosas otras estrategias exitosamente para conseguir este objetivo.

**[00037]** Bloqueo de las rutas que compiten por FPP o GGPP. En levadura, el FPP es un intermedio punto de ramificación que conduce a la biosíntesis de esteroles, hemo, dolicol, ubiquinona, GGPP y proteínas farnesiladas. En *E. coli*, el FPP sirve como sustrato para la pirofosfato de octaprenilo sintasa en la ruta que conduce a la ubiquinona. En bacterias que sintetizan carotenoides, tales como *Erwina uredovora*, el FPP se convierte en GGPP mediante GGPP sintasas en la primera etapa que conduce a los carotenoides. Para incrementar la producción de farnesol o GG, es deseable inactivar los genes que codifican enzimas que usan FPP o GGPP como sustrato, o reducir la actividad de las enzimas mismas, mediante mutación o la utilización de inhibidores enzimáticos específicos (como se debatió anteriormente para la escualeno sintasa). En *S. cerevisiae*, por ejemplo, puede ser ventajoso inactivar la primera etapa de la ruta desde FPP hasta hemo, además inactivar *ERG9.* Como se debatió anteriormente, en *E. coli*, la inactivación parcial o completa de la pirofosfato de octaprenilo sintasa podría aumentar la disponibilidad de FPP para la conversión de farnesol. Finalmente, en bacterias que producen carotenoides, tales como *Erwina uredovora*, la eliminación de la GGPP sintasa puede aumentar el nivel de FPP para conversión en farnesol, mientras que inactivar o reducir la actividad de la fiteno sintasa (el producto del gen *crtB*) puede aumentar el nivel de GGPP disponible para conversión en GG.

**[00038]** Es posible que el bloqueo de rutas que parten de FPP o GGPP pueda tener efectos negativos sobre el crecimiento y la fisiología del organismo productor. Se contempla adicionalmente que puedan hacerse las modificaciones genéticas adicionales necesarias para neutralizar estas complicaciones. El aislamiento de mutantes de *S. cerevisiae* con bloqueo de la ruta de isoprenoides y que captan esteroles en condiciones aeróbicas, como se describe anteriormente, ilustra que pueden obtenerse mutaciones compensatorias que superen los efectos de las modificaciones genéticas primarias.

**[00039]** Aislamiento de cepas productoras que son resistentes a farnesol o GG. En la sección de Ejemplos, se describe la producción de altos niveles de farnesol y GG por cepas modificadas por ingeniería genética de *S. cerevisiae.* Se reconoce que, a medida que se hacen aumentos adicionales de la producción de farnesol o GG, estos compuestos pueden alcanzar niveles que sean tóxicos para el organismo productor. Es más, la toxicidad del producto es un problema común encontrado en procesos de producción biológica. Sin embargo, son igual de comunes las modificaciones genéticas realizadas mediante procedimientos clásicos o de tecnología recombinante que superan la toxicidad del producto. La presente invención prevé encontrar toxicidad de producto. De este modo, una realización adicional de esta invención es el aislamiento de mutantes con una mayor resistencia a farnesol y/o GG.

**[00040]** Aislamiento de organismos de producción con propiedades de crecimiento mejoradas. Un efecto de bloquear la ruta de isoprenoides en *S. cerevisiae* es que los organismos mutantes (en la presente invención, mutantes *erg9*) crecen más lentamente que sus cepas originales (no bloqueadas), a pesar de la adición de ergosterol al medio de cultivo. Que el crecimiento más lento de los mutantes *erg9* es debido al bloqueo en *erg9* se ilustra en el Ejemplo 1.G, que muestra que reparar la mutación *erg9* restaura la velocidad de crecimiento de la cepa a aproximadamente la del original natural. El crecimiento más lento de los mutantes *erg9* podría ser debido a diferencias relacionadas con el crecimiento con ergosterol suministrado exógenamente frente a ergosterol sintetizado en la célula, o podría ser debido a otros factores fisiológicos. Un aspecto de la presente descripción es aislar variantes de las cepas productoras de farnesol o GG con propiedades de crecimiento mejoradas. Esto podría conseguirse, por ejemplo, mediante cultivo continuo seleccionando las variantes de crecimiento más rápido. Dichas variantes podrían aparecer espontáneamente o podrían obtenerse mediante mutagénesis clásica o enfoques de genética molecular.

2.2 Incorporación de prenol e isoprenol

**[00041]** En una realización de la presente invención, se produce farnesol o GG mediante la introducción de isoprenol y/o prenol en un medio de fermentación. Con referencia a la Figura 9, cada uno de estos compuestos, cuando se capta por un organismo, se fosforila con un grupo pirofosfato formando, respectivamente pirofosfato de 3-isopentenilo y pirofosfato de 3,3-dimetilalilo. Estos dos compuestos se interconvierten por la acción de la pirofosfato

de isopentenilo isomerasa. Estos compuestos se convierten entonces en pirofosfato de farnesilo mediante la acción de la FPP sintasa. El farnesol se forma mediante la desfosforilación del pirofosfato de farnesilo. El pirofosfato de farnesilo puede convertirse adicionalmente en pirofosfato de geranilgeranilo. El geranilgeraniol se forma mediante la desfosforilación del pirofosfato de geranilgeranilo. El GG se formaría a partir de FPP mediante la acción combinada de la GGPP sintasa y una fosfatasa. Isoprenol y prenol son compuestos comercialmente disponibles y pueden producirse mediante procedimientos conocidos en la técnica.

**[00042]** En esta realización, el microorganismo usado en la fermentación puede ser cualquier microorganismo como se describe en otro lugar de el presente documento. Además, el microorganismo puede modificarse genéticamente para incrementar la acción de la dimetilalil transferasa para promover la producción de pirofosfato de geranilo y pirofosfato de farnesol. Los genes que codifican esta enzima se han identificado a partir de una variedad de fuentes [Chan y col., Protein Sci., 3, 600-607 (1994)]. Además, puede modificarse genéticamente un microorganismo para incrementar la acción de la isoprenol cinasa o prenol cinasa. Aunque estas enzimas no se han descubierto, se han descrito enzimas similares que fosforilan farnesol y geranilgeraniol [Bentinger y col., Arch. Biochem. Biophys., 353, 191-198 (1998); Ohnuma y col., J. Biochem., 119, 547-547 (1996)].

2.3 Medios y condiciones de fermentación

**[00043]** En el procedimiento para la producción de farnesol o GG, se cultiva un microorganismo que tiene una modificación genética, tal como se ha descrito anteriormente, en un medio de fermentación para la producción de farnesol o GG. Un medio de fermentación apropiado, o eficaz, designa cualquier medio en que un microorganismo modificado genéticamente de la presente invención, cuando se cultiva, es capaz de producir farnesol o GG. Dicho medio es típicamente un medio acuoso que comprende fuentes de carbono, nitrógeno y fosfato asimilables. Dicho medio puede incluir también sales, minerales, metales y otros nutrientes apropiados. Además, cuando un organismo tiene bloqueada la ruta del ergosterol y requiere esteroles exógeno, el medio de fermentación debe contener dicho esteroles exógenos. Los medios ejemplares apropiados se muestran en la discusión siguiente y en la sección de Ejemplos. Sin embargo, debe reconocerse que son adecuadas una variedad de condiciones de fermentación y que pueden seleccionarse por los expertos en la técnica.

**[00044]** Las fuentes de carbono asimilables que pueden usarse en un medio de fermentación adecuado incluyen, pero sin limitación, azúcares y sus polímeros, incluyendo dextrina, sacarosa, maltosa, lactosa, glucosa, fructosa, manosa, sorbosa, arabinosa y xilosa; ácidos grasos; ácidos orgánicos tales como acetato; alcoholes primarios tales como etanol y n-propanol y polialcoholes tales como glicerina. Las fuentes de carbono preferidas incluyen monosacáridos, disacáridos y trisacáridos. La fuente de carbono más preferida es la glucosa.

**[00045]** La concentración de una fuente de carbono, tal como glucosa, en el medio de fermentación debería promover el crecimiento celular, pero no ser tan alta como para reprimir el crecimiento del microorganismo usado. Las fermentaciones se realizan con una fuente de carbono, tal como glucosa, adiéndose a niveles para conseguir el nivel deseado de crecimiento y biomasa, en una cantidad inicial entre aproximadamente 1 gramo por litro y aproximadamente 100 gramos por litro de medio de fermentación. En otras realizaciones, la concentración de la fuente de carbono, tal como glucosa, en el medio de fermentación es preferiblemente mayor de aproximadamente 2 g/l, y más preferiblemente mayor de aproximadamente 5 g/l. Además, la concentración de la fuente de carbono, tal como glucosa, en el medio de fermentación es típicamente menor de aproximadamente 100 g/l, preferiblemente menor de aproximadamente 50 g/l y más preferiblemente menor de aproximadamente 20 g/l. Debería observarse que las referencias a concentraciones de componente de fermentación pueden designar ambas concentraciones de componente inicial y/o continua. En algunos casos, puede ser deseable permitir al medio de fermentación agotar una fuente de carbono durante la fermentación.

**[00046]** Las fuentes de nitrógeno asimilable que pueden usarse en un medio de fermentación adecuado incluyen, pero sin limitación, fuentes de nitrógeno sencillo, fuentes de nitrógeno orgánico y fuentes de nitrógeno complejo. Dichas fuentes de nitrógeno incluyen amoniaco anhidro, sales de amonio y sustancias de origen animal, vegetal y/o microbiano. Las fuentes de nitrógeno adecuadas incluyen, pero sin limitación, hidrolizados de proteína, hidrolizados de biomasa microbiana, peptona, extracto de levadura, sulfato de amonio, urea y aminoácidos. Típicamente, la concentración de las fuentes de nitrógeno en el medio de fermentación es mayor de aproximadamente 0,1 g/l, preferiblemente mayor de aproximadamente 0,25 g/l, y más preferiblemente mayor de aproximadamente 1,0 g/l. Sin embargo, más allá de ciertas concentraciones, la adición de una fuente de nitrógeno al medio de fermentación no es ventajosa para el crecimiento de microorganismos. Como resultado, la concentración de las fuentes de nitrógeno en el medio de fermentación es menor de aproximadamente 20 g/l, preferiblemente menor de aproximadamente 10 g/l y más preferiblemente menor de aproximadamente 5 g/l. Además, en algunos casos puede ser deseable permitir al medio de fermentación agotar las fuentes de nitrógeno durante la fermentación.

**[00047]** El medio de fermentación eficaz puede contener otros compuestos tales como sales inorgánicas, vitaminas, metales traza o promotores del crecimiento. Dichos otros compuestos pueden estar también presentes en las fuentes de carbono, nitrógeno o mineral en el medio eficaz o pueden añadirse específicamente al medio.

**[00048]** El medio de fermentación puede contener también una fuente de fosfato adecuada. Dichas fuentes de fosfato incluyen fuentes de fosfato tanto inorgánico como orgánico. Las fuentes de fosfato preferidas incluyen, pero sin limitación, sales fosfato tales como fosfatos mono- o dibásicos de sodio y potasio, fosfato de amonio y mezclas de las mismas. Típicamente, la concentración de fosfato en el medio de fermentación es mayor de aproximadamente 1,0 g/l, preferiblemente mayor de aproximadamente 2,0 g/l y más preferiblemente mayor de aproximadamente 5,0 g/l. Sin embargo, más allá de ciertas concentraciones, la adición de fosfato al medio de fermentación no es ventajosa para el crecimiento de microorganismos. En consecuencia, la concentración de fosfato en el medio de fermentación es típicamente menor de aproximadamente 20 g/l, preferiblemente menor de aproximadamente 15 g/l y más preferiblemente menor de aproximadamente 10 g/l.

**[00049]** Un medio de fermentación adecuado puede incluir también una fuente de magnesio, preferiblemente en forma de una sal fisiológicamente aceptable tal como sulfato de magnesio heptahidratado, aunque pueden usarse otras fuentes de magnesio a concentraciones que contribuyan con cantidades similares de magnesio. Típicamente, la concentración de magnesio en el medio de fermentación es mayor de aproximadamente 0,5 g/l, preferiblemente mayor de aproximadamente 1,0 g/l y más preferiblemente mayor de aproximadamente 2,0 g/l. Sin embargo, más allá de ciertas concentraciones, la adición de magnesio al medio de fermentación no es ventajosa para el crecimiento de microorganismos. En consecuencia, la concentración de magnesio en el medio de fermentación es típicamente menor de aproximadamente 10 g/l, preferiblemente menor de aproximadamente 5 g/l, y más preferiblemente menor de aproximadamente 3 g/l. Además, en algunos casos puede ser deseable permitir al medio de fermentación agotar una fuente de magnesio durante la fermentación.

**[00050]** El medio de fermentación puede incluir también un agente quelante biológicamente aceptable, tal como citrato trisódico dihidratado. En dicho caso, la concentración de agente quelante en el medio de fermentación es mayor de aproximadamente 0,2 g/l, preferiblemente mayor de aproximadamente 0,5 g/l y más preferiblemente mayor de aproximadamente 1 g/l. Sin embargo, más allá de ciertas concentraciones, la adición de un agente quelante al medio de fermentación no es ventajosa para el crecimiento de microorganismos. En consecuencia, la concentración de agente quelante en el medio de fermentación es típicamente menor de aproximadamente 10 g/l, preferiblemente menor de aproximadamente 5 g/l y más preferiblemente menor de aproximadamente 2 g/l.

**[00051]** El medio de fermentación puede incluir inicialmente también un ácido o base biológicamente aceptable para mantener el pH deseado del medio de fermentación. Los ácidos biológicamente aceptables incluyen, pero sin limitación, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y mezclas de los mismos. Las bases biológicamente aceptables incluyen, pero sin limitación, hidróxido de amonio, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio y mezclas de las mismas. En una realización preferida de la presente invención, la base usada es hidróxido de amonio.

**[00052]** El medio de fermentación puede incluir también una fuente de calcio biológicamente aceptable incluyendo, pero sin limitación, cloruro de calcio. Típicamente, la concentración de la fuente de calcio, tal como cloruro de calcio dihidratado, en el medio de fermentación está dentro del intervalo de aproximadamente 5 mg/l a aproximadamente 2000 mg/l, preferiblemente dentro del intervalo de aproximadamente 20 mg/l a aproximadamente 1000 mg/l y más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 50 mg/l a aproximadamente 500 mg/l.

**[00053]** El medio de fermentación puede incluir también cloruro de sodio. Típicamente, la concentración de cloruro de sodio en el medio de fermentación está dentro del intervalo de aproximadamente 0,1 g/l a aproximadamente 5 g/l, preferiblemente dentro del intervalo de aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 4 g/l, y más preferiblemente dentro del intervalo de aproximadamente 2 g/l a aproximadamente 4 g/l.

**[00054]** Como se describe anteriormente, el medio de fermentación puede incluir también metales traza. Dichos metales traza pueden añadirse al medio de fermentación como una disolución madre que, por conveniencia, puede prepararse separadamente del resto del medio de fermentación. Se muestra a continuación en la Tabla 1 una disolución madre de metales traza adecuada para uso en el medio de fermentación. Típicamente, la cantidad de dicha disolución de metales traza añadida al medio de fermentación es mayor de aproximadamente 1 ml/l, preferiblemente mayor de aproximadamente 5 ml/l y más preferiblemente mayor de aproximadamente 10 ml/l. Sin embargo, más allá de ciertas concentraciones, la adición de un metal traza al medio de fermentación no es ventajosa para el crecimiento de microorganismos. En consecuencia, la cantidad de dicha disolución de metal traza añadida al medio de fermentación es típicamente menor de aproximadamente 100 ml/l, preferiblemente menor de aproximadamente 50 ml/l y más preferiblemente menor de aproximadamente 30 ml/l. Debería observarse que, además de añadir metales traza en una disolución madre, los componentes individuales pueden añadirse separadamente, cada uno dentro de los intervalos correspondientes, independientemente de las cantidades de componentes dictadas por los intervalos anteriores de la disolución de metales traza.

**[00055]** Como se muestra a continuación en la Tabla 1, una disolución de metales traza adecuada para uso en la presente invención puede incluir, pero sin limitación, sulfato ferroso heptahidratado, sulfato cúprico

pentahidratado, sulfato de cinc heptahidratado, molibdato de sodio dihidratado, cloruro cobaltoso hexahidratado y sulfato manganoso monohidratado. Se añade ácido clorhídrico a la disolución madre para mantener la disolución de metal traza en solución.

**TABLA 1**

| DISOLUCIÓN MADRE DE METALES TRAZA | |
|---|---|
| COMPUESTO | CONCENTRACIÓN (mg/l) |
| Sulfato ferroso heptahidratado | 280 |
| Sulfato cúprico pentahidratado | 80 |
| Sulfato de cinc (II) heptahidratado | 290 |
| Molibdato de sodio dihidratado | 240 |
| Cloruro cobaltoso hexahidratado | 240 |
| Sulfato manganoso monohidratado | 170 |
| Ácido clorhídrico | 0,1 ml |

**[00056]** El medio de fermentación puede incluir también vitaminas. Dichas vitaminas puede añadirse al medio de fermentación en forma de una disolución madre que, por conveniencia, puede prepararse separadamente del resto del medio de fermentación. Se muestra a continuación en la Tabla 2 una disolución madre de vitamina adecuada para uso en el medio de fermentación. Típicamente, la cantidad de dicha disolución de vitamina añadida al medio de fermentación es mayor de 1 ml/l, preferiblemente mayor de 5 ml/l y más preferiblemente mayor de 10 ml/l. Sin embargo, más allá de ciertas concentraciones, la adición de vitaminas al medio de fermentación no es ventajosa para el crecimiento de microorganismos. En consecuencia, la cantidad de dicha disolución de vitamina añadida al medio de fermentación es típicamente menor de aproximadamente 50 ml/l, preferiblemente menor de 30 ml/l y más preferiblemente menor de 20 ml/l. Debería observarse que, además de añadir vitaminas en una disolución madre, los componentes individuales pueden añadirse separadamente cada uno dentro de los intervalos correspondientes, independientemente de las cantidades de los componentes dictadas por los intervalos anteriores de la disolución madre de vitamina.

**[00057]** Como se muestra en la Tabla 2, una disolución de vitamina adecuada para uso en la presente invención puede incluir, pero sin limitación, biotina, pantotenato de calcio, inositol, HCl de piridoxina y HCl de tiamina.

**TABLA 2**

| COMPUESTO | CONCENTRACIÓN (mg/l) |
|---|---|
| Biotina | 10 |
| Pantotenato de calcio | 120 |
| Inositol | 600 |
| HCl de piridoxina | 120 |
| HCl de tiamina | 120 |

**[00058]** Como se afirma anteriormente, cuando un organismo tiene bloqueada la ruta del esterol, debe añadirse un esterol exógeno al medio de fermentación. Dichos esteroles incluyen, pero sin limitación, ergosterol y colesterol. Dichos esteroles pueden añadirse al medio de fermentación en forma de una disolución madre que se prepara separadamente del resto del medio de fermentación. Las disoluciones madre de esterol pueden prepararse usando un detergente para ayudar a la solubilización del esterol. Se describe una disolución madre de ergosterol típica en el Ejemplo 1.D. Típicamente, se añade una cantidad de disolución madre de esterol al medio de fermentación tal que la concentración final del esterol en el medio de fermentación esté dentro del intervalo de aproximadamente 1 mg/l a 3000 mg/l, preferiblemente dentro del intervalo de aproximadamente 2 mg/l a 2000 mg/l y más preferiblemente dentro del intervalo de aproximadamente 5 mg/l a 2000 mg/l.

**[00059]** Los microorganismos de la presente invención pueden cultivarse en modos de fermentación convencionales que incluyen, pero sin limitación, por lotes, semicontinuo, con reciclaje de células y continuo. Sin embargo, se prefiere llevar a cabo la fermentación en modo semicontinuo. En dicho caso, durante la fermentación algunos de los componentes del medio se agotan. Es posible iniciar la fermentación con concentraciones relativamente altas de dichos componentes de modo que el crecimiento se soporte durante un periodo de tiempo antes de requerir adiciones. Los intervalos preferidos de estos componentes se mantienen a lo largo de la fermentación haciendo adiciones a medida que se agotan los niveles por la fermentación. Los niveles de componentes en el medio de fermentación pueden monitorizarse, por ejemplo, muestreando el medio de fermentación periódicamente y ensayando las concentraciones. Como alternativa, una vez se desarrolla un procedimiento de fermentación estándar, pueden hacerse adiciones a intervalos regulares correspondientes a los niveles conocidos en momentos particulares a lo largo de la fermentación. Como se reconocerá por los expertos en la técnica, la velocidad de consumo de nutriente aumenta durante la fermentación a medida que aumenta la densidad celular del medio. Además, para evitar la introducción de microorganismos extraños en el medio de fermentación, se efectúa la adición usando procedimientos de adición aséptica, como son conocidos en la técnica. Además, puede añadirse una pequeña cantidad de agente antiespumante durante la fermentación.

**[00060]** La temperatura del medio de fermentación puede ser cualquier temperatura adecuada para el crecimiento y la producción de farnesol o GG. Por ejemplo, antes de la inoculación del medio de fermentación con un inóculo, el medio de fermentación puede llevarse a y mantenerse en una temperatura en el intervalo de aproximadamente 20ºC a aproximadamente 45ºC, preferiblemente a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 25ºC a aproximadamente 40ºC, y más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 28ºC a aproximadamente 32ºC.

**[00061]** El pH del medio de fermentación puede controlarse mediante la adición de ácido o base al medio de fermentación. En aquellos casos en que se usa amoniaco para controlar el pH, sirve también convenientemente como fuente de nitrógeno en el medio de fermentación. Preferiblemente, el pH se mantiene de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 8,0, más preferiblemente de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 7,0 y lo más preferiblemente de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 6,5.

**[00062]** El medio de fermentación puede mantenerse también para tener un contenido de oxígeno disuelto durante el transcurso de la fermentación, para mantener el crecimiento celular y para mantener el metabolismo celular para la producción de farnesol o GG. La concentración de oxígeno del medio de fermentación puede monitorizarse usando procedimientos conocidos, tales como mediante la utilización de un electrodo de oxígeno. Puede añadirse oxígeno al medio de fermentación usando procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante agitación y aireación del medio removiendo, agitando o burbujeando. Preferiblemente, la concentración de oxígeno en el medio de fermentación está en el intervalo de aproximadamente 20% a aproximadamente 100% del valor de saturación de oxígeno en el medio basándose en la solubilidad del oxígeno en el medio de fermentación a presión atmosférica y a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 20ºC a aproximadamente 40ºC. Sin embargo, pueden ocurrir caídas periódicas en la concentración de oxígeno por debajo de este intervalo durante la fermentación sin afectar negativamente a la fermentación.

**[00063]** Aunque se ha descrito en el presente documento la aireación del medio con relación al uso de aire, pueden usarse otras fuentes de oxígeno. Es particularmente útil la utilización de un gas de aireación que contiene una fracción volumétrica de oxígeno mayor que la fracción volumétrica de oxígeno en el aire ambiental. Además, dichos gases de aireación pueden incluir otros gases que no afecten negativamente a la fermentación.

**[00064]** En una realización del proceso de fermentación, se prepara un medio de fermentación como se describe anteriormente y en el Ejemplo 1.H. Este medio de fermentación se inocula con un cultivo de microorganismos en crecimiento activo de la presente invención en una cantidad suficiente para producir, después de un periodo de crecimiento razonable, una alta densidad celular. Las densidades celulares de inoculación típicas están dentro del intervalo de aproximadamente 0,01 g/l a aproximadamente 10 g/l, preferiblemente de aproximadamente 0,2 g/l a aproximadamente 5 g/l y más preferiblemente de aproximadamente 0,05 g/l a aproximadamente 1,0 g/l, basándose en el peso celular seco. Sin embargo, en fermentadores a escala de producción, se prefieren densidades celulares de inóculo mayores. Se cultivan entonces las células hasta una densidad celular en el intervalo de aproximadamente 10 g/l a aproximadamente 100 g/l, preferiblemente de aproximadamente 20 g/l a aproximadamente 80 g/l y más preferiblemente de aproximadamente 50 g/l a aproximadamente 70 g/l. Los tiempos de residencia para que los microorganismos alcancen las densidades celulares deseadas durante la fermentación son típicamente menores de aproximadamente 200 horas, preferiblemente menores de aproximadamente 120 horas, y más preferiblemente menores de aproximadamente 96 horas.

**[00065]** En un modo de operación de la presente invención, la concentración de la fuente de carbono, tal como la concentración de glucosa, del medio de fermentación se monitoriza durante la fermentación. La concentración de glucosa del medio de fermentación puede monitorizarse usando técnicas conocidas tales como, por ejemplo, la utilización de una prueba enzimática de glucosa oxidasa o cromatografía líquida a alta presión, que pueden usarse para monitorizar la concentración de glucosa en el sobrenadante, por ejemplo, un componente exento de células del medio de fermentación. Como se afirmó anteriormente, la concentración de la fuente de carbono debería mantenerse por debajo del nivel al que ocurre la inhibición del crecimiento celular. Aunque dicha concentración puede variar de organismo a organismo, para glucosa como fuente de carbono, ocurre inhibición del crecimiento celular a concentraciones de glucosa mayores de aproximadamente 60 g/l, y puede determinarse fácilmente mediante ensayo. En consecuencia, cuando se usa glucosa como fuente de carbono, se alimenta preferiblemente al fermentador y se mantiene por debajo de los límites de detección. Como alternativa, la concentración de glucosa en el medio de fermentación se mantiene en el intervalo de aproximadamente 1 g/l a aproximadamente 100 g/l, más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 2 g/l a aproximadamente 50 g/l, y aún más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 5 g/l a aproximadamente 20 g/l. Aunque la concentración de la fuente de carbono puede mantenerse dentro de los niveles deseados mediante la adición, por ejemplo, de una disolución de glucosa sustancialmente pura, es aceptable, y puede preferirse, mantener la concentración de la fuente de carbono del medio de fermentación mediante la adición de alícuotas del medio de fermentación original. La utilización de alícuotas del medio de fermentación original puede ser deseable porque las concentraciones de los otros nutrientes

en el medio (por ejemplo, las fuentes de nitrógeno y fosfato) pueden mantenerse simultáneamente. Igualmente, las concentraciones de metales traza pueden mantenerse en el medio de fermentación mediante la adición de alícuotas de la disolución de metales traza.

2.4 Recuperación de farnesol y GG

**[00066]** Una vez se producen farnesol o GG por un sistema biológico, se recuperan o aislan para la posterior conversión química en α-tocoferol o ésteres de α-tocoferilo. Los presentes inventores han mostrado que, tanto para farnesol como para GG, el producto puede estar presente en los sobrenadantes de cultivo y/o asociado a células de levadura. Con respecto a las células, la recuperación de farnesol o GG incluye algún procedimiento de permeabilización o lisis de las células. El farnesol o GG en el cultivo puede recuperarse usando un proceso de recuperación que incluye, pero sin limitación, cromatografía, extracción, extracción con disolvente, separación con membrana, electrodiálisis, ósmosis inversa, destilación, derivatización química y cristalización. Cuando el producto está en forma fosfato, concretamente fosfato de farnesilo o fosfato de geranilgeranilo, aparece solo dentro de células y, por lo tanto, requiere algún procedimiento de permeabilización o lisis de las células.

3.0 Síntesis química de GG y farnesol

3.1 Síntesis química de GG

**[00067]** Como se indica anteriormente, en una realización de la invención, el GG se produce biológicamente, y en realizaciones altedrnativas, el GG puede producirse mediante otros procedimientos. Por ejemplo, el GG puede producirse también a partir de farnesol mediante síntesis química. Son conocidos en la técnica muchos procedimientos adecuados. En uno de dichos procedimientos, se convierte farnesol en bromuro de farnesilo (PBr en éter) y se somete a desplazamiento con acetoacetato de etilo. Se saponifica el cetoéster bruto resultante, se descarboxila y se purifica la cetona resultante por destilación. Siguiendo el procedimiento de Klinge y Demuth (Synlett. 1993, 783), se somete la cetona a la reacción de Wittig-Horner con fosfonoacetato de diisopropiletilo (NaH, Glyme), dando una mezcla aproximadamente 80/20 de geranilgeranoato de t,t,t- y t,t,c-etilo. La reducción del geranilgeranoato de etilo con hidruro de diisobutilaluminio proporciona GG limpiamente. La mezcla de t,t,t y t,t,c puede separarse al nivel de oxidación de éster (por ejemplo mediante destilación) o alcohol (por ejemplo mediante cristalización como se describe en el documento EP 711749). La producción de farnesol como material de partida para la producción química de GG puede realizarse mediante producción biológica, tal como mediante la utilización de un microorganismo modificado que tenga algunas de las características modificadas descritas anteriormente.

3.2 Síntesis química de farnesol

**[00068]** Como se indica anteriormente, en una realización de la invención, el farnesol se produce biológicamente, y en realizaciones alternativas, el farnesol se puede producir mediante otros procedimientos. Por ejemplo, el farnesol también se puede producir mediante síntesis química. Muchos procedimientos adecuados son conocidos en la técnica.

4.0 Producción de tocoferol a partir de GG mediante síntesis química

**[00069]** En una realización adicional de la presente descripción, se proporciona un procedimiento para producir vitamina E a partir de geranilgeraniol. El geranilgeraniol contiene cuatro restos de olefina. Tal como se utiliza en la presente invención, los restos de olefina del geranilgeraniol están numerados consecutivamente partiendo del extremo hidroxilo, concretamente, el primer resto olefínico designa al doble enlace $C_2$-$C_3$, el segundo resto olefínico designa al doble enlace $C_5$-$C_7$, el tercer resto olefínico designa el doble enlace $C_{10}$-$C_{11}$ y el cuarto resto olefínico designa el doble enlace $C_{14}$-$C_{15}$.

**[00070]** El procedimiento de la presente descripción implica reducir al menos un resto olefínico del geranilgeraniol formando un alcohol alílico. Preferiblemente, el alcohol alílico es fitol y/o isofitol. La formación del alcohol alílico puede conseguirse mediante una reducción selectiva de olefinas que reduce al menos uno de los segundo, tercero o cuarto restos olefínicos sin reducir el primer resto olefínico. Preferiblemente, la reducción reduce todos los restos olefínicos excepto el primer resto olefínico. La reducción de un resto olefínico puede realizarse mediante cualquiera de las condiciones de reducción de alqueno conocidas, incluyendo reducción con diimida, reducción con metal disolvente, reducción con hidruro metálico e hidrogenación en presencia de un catalizador metálico tal como paladio, rodio, níquel, platino, rutenio, cobre, cromo o una combinación de los mismos. Preferiblemente, los segundo, tercer y cuarto restos olefínicos se reducen mediante hidrogenación.

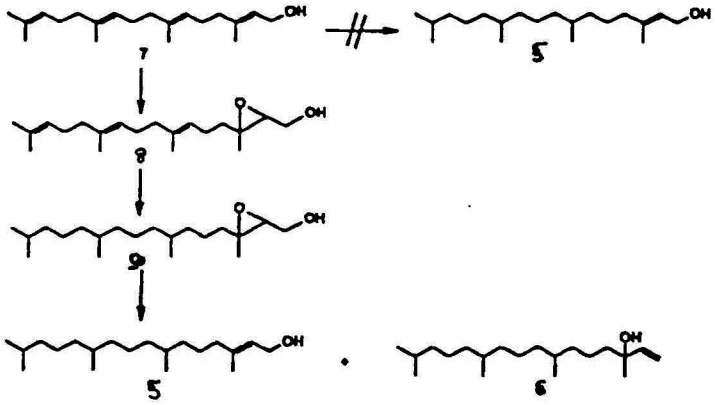
**[00071]** Si se desea una síntesis de vitamina E enriquecida enantioméricamente o enantioméricamente pura, puede efectuarse la reducción del resto olefínico usando un catalizador asimétrico tal como los conocidos en la técnica para reacciones de hidrogenación asimétrica. Como alternativa, puede producirse una mezcla racémica de alcohol alílico y someterse a separación quiral, proporcionando un esteroisómero deseado del alcohol alílico.

**[00072]** En una realización de la presente descripción, se añade un grupo protector al geranilgeraniol antes de reducir el segundo, tercer y/o cuarto restos olefínicos. Tal como se utiliza en el presente documento, un grupo protector designa cualquier compuesto que pueda añadirse a (o combinarse con) geranilgeraniol antes de la reducción de uno o más restos olefínicos, y retirarse después de la reducción proporcionando un alcohol alílico a partir de geranilgeraniol. Preferiblemente, el grupo protector es un grupo protector de hidroxilo. El grupo protector de hidroxilo se selecciona de tal modo que la reducción de los segundo, tercer y cuarto restos olefínicos pueda conseguirse sin reducir el primer resto olefínico. Puede emplearse una variedad de grupos protectores de hidroxilo conocidos en la técnica. Pueden encontrarse ejemplos de muchos de estos grupos posibles en “Protective Groups in Organic Síntesis” de T.W. Green, John Wiley and Sons, 1981, pág. 10-86. Preferiblemente, el grupo protector de hidroxilo es un éster. Más preferiblemente, el éster es un éster con impedimento estérico (concretamente voluminoso) que proporciona una protección suficiente al resto olefínico $C_2$-$C_3$ para reducirse en las condiciones de reducción del geranilgeraniol a un alcohol alílico protegido. Los grupos éster voluminosos ejemplares incluyen isobutirato y pivaloato.

**[00073]** La vitamina E se forma a partir del alcohol alílico y una hidroquinona. Preferiblemente, la hidroquinona es una trimetilhidroquinona, más preferiblemente la hidroquinona es 2,3,5-trimetilhidroquinona. Debería apreciarse que la formación de compuestos relacionados con la vitamina E (concretamente α-tocoferol) puede conseguirse usando la hidroquinona correspondiente para un derivado de tocoferol particular. Por ejemplo, pueden sintetizarse β, γ y δ-tocoferol a partir del alcohol alílico y 2,5-dimetilhidroquinona, 2,3-dimetilhidroquinona y 2-metilhidroquinona, respectivamente. Sin ligarse a teoría alguna, se cree que poner en contacto el alcohol alílico con un ácido genera un ión carbonio que reacciona con la hidroquinona formando vitamina E. Puede generarse un ión carbonio similar a partir de un derivado de halógeno del fitol. Por ejemplo, poner en contacto un fitano halogenado tal como bromo-cloro- o yodofitano con un ácido de Lewis tal como haluro de cinc, incluyendo bromuro de cinc, cloruro de cinc y yoduro de cinc; haluro de aluminio incluyendo bromuro de aluminio y cloruro de aluminio; haluro de boro incluyendo tricloruro de boro y trifluoruro de boro; haluro de plata incluyendo cloruro de plata, bromuro de plata y yoduro de plata; haluro de níquel tal como cloruro de níquel y bromuro y níquel y otros ácidos de Lewis de haluro metálico, puede generar iones carbonio que pueden reaccionar con una hidroquinona formando vitamina E.

**[00074]** La Figura 2 ilustra una realización particularmente preferida de la síntesis de vitamina E a partir de geranilgeraniol. El grupo hidroxilo del geranilgeraniol **2-1** se protege en forma de éster isobutirato u otro éster voluminoso usando el correspondiente ácido o su derivado, tal como anhídrido o cloruro de acilo. Se hidrogena selectivamente entonces el isobutirato de geranilgeranilo **2-2** usando un catalizador metálico tal como paladio sobre carbón, produciendo isobutirato de fitilo **2-3.** La hidrogenación del isobutirato de geranilgeranilo **2-2** reduce los segundo, tercer y cuarto restos olefínicos sin afectar al primer resto olefínico. Se cree que el volumen estérico del isobutirato reduce la velocidad de hidrogenación del primer resto olefínico en el geranilgeraniol protegido, conduciendo así a una hidrogenación selectiva de los restos olefínicos. Se retira entonces el grupo protector de hidroxilo mediante hidrólisis en condiciones básicas, proporcionando el fitol **2-4.** Hacer reaccionar fitol **2-4** con 2,3,5-trimetilhidroquinona **2-5** en presencia de un ácido da como resultado entonces la formación de vitamina E **2-6.** Como alternativa, puede desprotegerse el isobutirato de fitilo **2-3** y hacerse reaccionar con 2,3,5-trimetilhidroquinona **2-5** en una sola etapa mediante un catalizador ácido, formando la vitamina E **2-6.** La vitamina E **2-6** puede transformarse adicionalmente en una vitamina E protegida tal como acetato de vitamina E **2-7** mediante acetilación del resto hidroxilo libre.

**[00075]** Un procedimiento alternativo de síntesis química para convertir GG en α-tocoferol o ésteres de α-tocoferilo incluye las siguientes etapas: (a) oxidar selectivamente el doble enlace 2,3-carbono-carbono el geranilgeraniol **7** produciendo 2,3-epóxido de geranilgeraniol **8;** (b) hidrogenar los tres dobles enlaces carbono-carbono restantes en el epóxido **8** produciendo epoxifitol **9;** (c) desoxigenar el epoxifitol **9** produciendo una mezcla de fitol **5** e isofitol **6** mediante reacción con un aceptor de oxígeno y (d) hacer reaccionar la mezcla de fitol **5** e isofitol **6** con trimetilhidroquinona **4** produciendo alfa-tocoferol **3.**



**[00076]** La etapa de oxidación selectiva del doble enlace 2,3-carbono-carbono en el geranilgeraniol produciendo 2,3-epóxido de geranilgeraniol se lleva a cabo con cualquier reactivo conocido por epoxidar selectivamente la funcionalidad olefínica de alcoholes alílicos, tal como combinaciones de hidroperóxido de *terc*-butilo y catalizadores de vanadio o molibdeno como se enseña por el procedimiento de Sharpless y Michaelson, J. Am. Chem. Soc. 95, 6136 (1973). El peróxido de hidrógeno u otros hidroperóxidos de alquilo podrían reemplazar al hidroperóxido de *terc*-butilo, y pueden usarse disolventes inertes tales como hidrocarburos aromáticos, hidrocarburos alifáticos, hidrocarburos cicloalifáticos o ésteres alifáticos. La expresión "hidrocarburo alifático" se usa para incluir alcanos de cadena lineal o ramificada que tiene de 5 a 8 átomos de carbono. El heptano es el hidrocarburo alifático más preferido. La expresión "hidrocarburo cicloalifático" se usa para incluir cicloalcanos $C_5$-$C_8$ y aquellos sustituidos con uno o más grupos alquilo $C_1$-$C_4$. La expresión "hidrocarburo aromático" se usa para incluir benceno y benceno sustituido con uno a tres grupos $C_1$-$C_4$. El tolueno es el hidrocarburo aromático más preferido. La expresión "ésteres alifáticos" se usa para incluir ésteres alifáticos que tienen de 3 a 9 átomos de carbono que tienen la fórmula $R_1CO_2R_2$, en la que $R_1$ y $R_2$ representan independientemente un grupo alquilo $C_1$-$C_4$ de cadena lineal o ramificada, siendo el éster alifático preferido acetato de etilo.

**[00077]** La etapa de hidrogenación de los tres dobles enlaces carbono-carbono restantes en el epóxido **8** produciendo epoxifitol **9** puede realizarse con cualquier catalizador heterogéneo u homogéneo convencional en atmósfera de hidrógeno. Por tanto, pueden usarse catalizadores soportados tales como paladio sobre carbón, platino sobre carbón, óxido de platino, níquel Raney y similares a un nivel de aproximadamente 0,001 a 0,2 partes en peso con respecto a **8,** con o sin un disolvente inerte tal como ésteres alifáticos, alcanoles, hidrocarburos aromáticos, hidrocarburos alifáticos y cicloalifáticos o éteres, a una presión de aproximadamente 101,3 kPa a aproximadamente 20.265 kPa de presión de hidrógeno a temperaturas de aproximadamente 0ºC a aproximadamente 150ºC. El término "alcanol" se usa para representar alcoholes de fórmula $R_3$-OH y alcoholes sustituidos de fórmula $R_3OCH_2CH_2OH$, en la que $R_3$ representa un grupo alquilo $C_1$-$C_4$ de cadena lineal o ramificada. El término "éter" se usa para representar éteres que tienen la fórmula $R_1$-O-$R_2$, en la que $R_1$ y $R_2$ son como se definen anteriormente, y tetrahidrofurano. La etapa de desoxigenación del epoxifitol **9** produciendo una mezcla de fitol **5** e isofitol **6** mediante reacción con un aceptor de oxígeno puede ser una reacción de transferencia de oxígeno catalizada por renio y puede realizarse sin disolvente o en presencia de un disolvente inerte tal como hidrocarburos aromáticos, hidrocarburos alifáticos, hidrocarburos cicloalifáticos, ésteres alifáticos, alcanoles, éteres o agua. La reacción puede llevarse a cabo también en un sistema de agua-disolvente orgánico bifásico con o sin la adición de un catalizador de transferencia de fase. El catalizador puede ser un trióxido de renio sustituido o una forma soportada en polímero de dicho compuesto de trióxido de renio. El catalizador puede usarse a un nivel de aproximadamente 0,01-5,0% en peso basado en **9.** El aceptor de oxígeno debe estar presente a un nivel de 1,0-3,0 mol por mol de **9** y puede elegirse de triarilfosfinas, trialquil-$C_1$-$C_6$-fosfinas, triarilfosfitos, trialquil $C_1$-$C_8$-fosfitos, hipofosfitos de metal alcalino o ácido hipofosfórico. Pueden usarse otros compuestos capaces de aceptar irreversiblemente oxígeno de **9**, tales como sulfuros de dialquilo $C_1$-$C_6$ y ciertas bases nitrogenadas tales como N-alquil $C_1$-$C_6$-morfolinas. El término "arilo" se usa para incluir fenilo y naftilo y éstos sustituidos con uno a tres grupos alquilo $C_1$-$C_6$. El término "aralquilo" se usa para incluir radicales monovalentes que tienen la estructura aril$(CH_2)_n$-, en la que n= 1 a 4. La expresión "trióxido de renio sustituido" se usa para incluir compuestos de fórmula R-$ReO_5$, en la que R es un grupo hidrocarburo seleccionado del grupo constituido por alquilo $C_1$-$C_{10}$, arilo $C_6$-$C_{10}$, aralquilo, ciclopentadienilo y ciclopentadienilo sustituido con uno a cinco grupos alquilo $C_1$-$C_4$.

**[00078]** Debería observarse que la etapa de desoxigenación del epoxifitol, tal como mediante reacción con trifenilfosfina u otro aceptor de oxígeno adecuado con catálisis por un compuesto de renio tal como trióxido de metilrrenio, es una reacción novedosa e inesperada. Se ha revisado la utilización de trióxido de metilrrenio como catalizador en una variedad de reacciones orgánicas [Schmidt (J. Prakt. Chem./Chem.-Ztg. 339, 493-496 (1997)]. Espenson y Zhu [(J. Molecular Catalysis A: Chemical 103, 87-94 (1995)] han dado 6 ejemplos de uso de MTO para

catalizar la transferencia de oxígeno desde epóxidos a trifenilfosfina con la formación de olefinas. Ha de observarse que todos los ejemplos de Espenson y Zhu de generación de olefinas a partir de epóxidos implicaban hidrocarburos sencillos no funcionales tales como ciclohexeno, estilbeno, ciclododeceno y otros. Estos investigadores no demostraron la factibilidad de llevar a cabo dicha transformación en una molécula que contiene una funcionalidad adicional tal como un grupo hidroxilo primario. De hecho, Espenson y Zhu mostraron posteriormente (J. Org. Chem. 61, 324-328 (1996) que el MTO cataliza la deshidratación de alcoholes primarios con la formación de éteres e hidrocarburos olefínicos. Por lo tanto, es inesperado y sorprendente descubrir que MTO/trifenilfosfina, cuando se aplica a epoxifitol, da un buen rendimiento de productos de alcohol alílico tales como isofitol y fitol.

**[00079]** La etapa de hacer reaccionar la mezcla de fitol **5** e isofitol **6** con trimetilhidroquinona **4** produciendo alfa-tocoferol **3** se realiza en presencia de un catalizador ácido, a menudo un ácido de Lewis tal como cloruro de cinc, como se hace convencionalmente en procesos conocidos. Se ha determinado que puede usarse una mezcla de fitol **5** e isofitol **6** para preparar alfa-tocoferol con el mismo rendimiento que cualquier precursor solo.

**[00080]** Los compuestos ejemplares específicos de los términos genéricos usados en el presente documento que son adecuados para usar en la presente invención son los siguientes. Los disolventes aromáticos típicos incluyen benceno, tolueno y o-, m- o p-xileno o mezclas de los mismos. El tolueno es el disolvente aromático preferido. Los disolventes alifáticos típicos incluyen n-pentano, n-hexano, n-heptano y n-octano e isómeros de los mismos, el n-heptano es el hidrocarburo alifático preferido. Los hidrocarburos cicloalifáticos típicos incluyen ciclopentano, ciclohexano, metilciclohexano y cicloheptano. Los ésteres alifáticos típicos incluyen acetato de metilo, acetato de etilo, acetato de n-propilo, acetato de n-butilo, acetato de isopropilo, propionato de metilo, propionato de etilo, butirato de metilo y butirato de etilo. El acetato de etilo es el éster alifático preferido.

**[00081]** Los alcanoles y alcanoles sustituidos típicos incluyen metanol, etanol, n-propanol, isopropanol, n-butanol, isobutanol, 2-metoxietanol, 2-etoxietanol y 2-isopropoxietanol. Los éteres típicos incluyen dietiléter, diisopropiléter, dibutiléter, n-butilmetiléter, *terc*-butilmetiléter y tetrahidrofurano. Los ácidos de Lewis útiles típicos incluyen cloruro de cinc, cloruro de aluminio, trifluoruro de boro, cloruro férrico y ácido fosfórico. El cloruro de cinc es el ácido de Lewis preferido.

5.0 Farnesol a vitamina E

**[00082]** En aún otra realización de la presente memoria, se proporciona un procedimiento para producir vitamina E a partir de farnesol. Este procedimiento implica en general convertir farnesol en un primer compuesto intermedio que comprende un número suficiente de átomos de carbono para formar al menos un grupo sustituyente de trimetiltridecilo de vitamina E cuando el intermedio se hace reaccionar posteriormente con una hidroquinona apropiada formando vitamina E. El procedimiento incluye adicionalmente hacer reaccionar el compuesto intermedio con una hidroquinona formando vitamina E. Preferiblemente, el compuesto intermedio contiene un número suficiente de átomos de carbono para formar tanto sustituyentes metilo como trimetiltridecilo en la posición 2 del resto de anillo de cromano de la vitamina E. Más preferiblemente, el compuesto intermedio se selecciona del grupo constituido por fitol e isofitol.

**[00083]** El compuesto intermedio puede prepararse oxidando farnesol a farnesal. Pueden encontrarse ejemplos de oxidación de un alcohol a un aldehído en “Advanced Organic Chemistry Part B; Reactions and Síntesis” 2ª Ed., Carey and Sundberg, Plenum Press, 1983, pág. 481-490. Por ejemplo, el farnesol puede oxidarse a farnesal usando dióxido de manganeso, óxidos de cromo tales como trióxido de cromo y dicromatos, óxido de plata, condiciones de oxidación de Swern y condiciones de oxidación de Oppenauer. Además, el farnesol puede oxidarse mediante oxidación catalítica con aire catalizada usando un catalizador como se da a conocer por Marko y col., Science, 1996, 274, 2044. En general, esta oxidación con aire de farnesol a farnesal implica usar cantidades catalíticas de cloruro cuproso, 1,10-fenantrolina, hidrazodicarboxilato de di-*terc*-butilo y carbonato de potasio en exceso en un disolvente relativamente no polar tal como tolueno o benceno aproximadamente a 80ºC.

**[00084]** El procedimiento de producción de vitamina E a partir de farnesol puede incluir adicionalmente formar una metilcetona a partir de farnesal. La metilcetona puede formarse mediante una variedad de procedimientos, incluyendo condensación de aldol con una cetona apropiada tal como acetona o sus equivalentes. Por ejemplo, la condensación de aldol de farnesal con acetoacetato seguida de una reacción de descarboxilación proporciona el mismo producto de metilcetona que una condensación de aldol de farnesal con acetona. La metilcetona puede formarse también usando reactivos de Witting o Horner-Emmons-Wadsworth apropiados. Se da a conocer la utilización de estos reactivos, por ejemplo, en “Advanced Organic Chemistry”, 3ª Ed., J. March, John Wiley & Sons, 1985, pág. 845-854.

**[00085]** El procedimiento de producción de vitamina E a partir de farnesol puede incluir adicionalmente reducir los restos olefínicos en la metilcetona formando una alquilmetilcetona. Se describe anteriormente la reducción de restos olefínicos en la sección respecto a la producción de vitamina E a partir de GG. Preferiblemente, la alquilmetilcetona es 6,10,14-trimetilpentadecan-2-ona. Se convierte entonces la alquilmetilcetona en un alcohol

alílico. El alcohol alílico puede producirse añadiendo un acetiluro tal como acetiluro de litio, acetiluro de sodio y acetiluro de magnesio y reduciendo parcialmente el grupo acetileno resultante hasta un grupo vinilo. Como alternativa, el alcohol alílico puede formarse directamente mediante otros procedimientos bien conocidos en la técnica, tales como haciendo reaccionar la alquilmetilcetona con un anión vinílico tal como haluro de vinilmagnesio, vinil-litio o vinilsodio.

**[00086]** Se describe anteriormente la formación de vitamina a partir de un alcohol alílico con respecto a la producción de vitamina a partir de geranilgeraniol.

**[00087]** Se ilustra en la Figura 3 una realización particularmente preferida para la síntesis de vitamina E a partir de farnesol. Se oxida farnesol **3-8** a farnesal **3-9** en condiciones de oxidación de Oppenauer usando isopropóxido de aluminio y acetona. Se convierte entonces el farnesal **3-9** en deshidrofarnesilacetona **3-10** mediante reacción de condensación de aldol con acetona. La reducción de los restos olefínicos de deshidrofarnesilacetona **3-10** mediante hidrogenación produce entonces 6,10,14-trimetilpentadecan-2-ona **3-11.** La adición de acetiluro a la cetona **3-11** genera entonces alcohol propargílico **3-12**, que se reduce parcialmente usando condiciones de hidrogenación de Lindlar produciendo isofitol **3-13.** La reacción de isofitol **3-13** con 2,3,5-trimetilhidroquinona **3-5** en presencia de un catalizador ácido produce entonces vitamina E.

6.0 Producción biológica de fitol a partir de GGPP o GG.

**[00088]** La presente descripción proporciona procedimientos para la conversión química de GG en fitol o una mezcla de fitol e isofitol. El fitol o la mezcla de fitol más isofitol puede hacerse reaccionar entonces con una hidroquinona en presencia de un ácido formando vitamina E, como se describe en otro lugar de el presente documento.

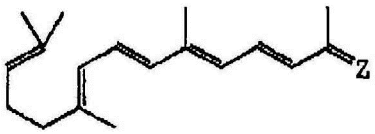
**[00089]** Recientemente, se ha clonado el gen que codifica la enzima geranilgeranil reductasa de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia [Keller y col., Eur. J. Biochem. 251: 413-417 (1998)]. Esta enzima cataliza la reducción por etapas de geranilgeranilclorofila a fitilclorofila así como la reducción de GGPP a difosfato de fitilo. Con respecto a la presente descripción, se utiliza una geranilgeranilo reductasa en un sistema biológico para sustituir la conversión química de GG en fitol. Por ejemplo, la geranilgeranil reductasa se expresa en la cepa mutante *erg9* de *S. cerevisiae*, que expresa también una actividad GGPP sintasa. La reductasa reacciona con el GGPP formado *in vivo* produciendo difosfato de fitilo. Una fosfatasa convierte entonces el difosfato de fitilo en fitol, como ocurre en las cepas productoras de farnesol y GG descritas en secciones anteriores. El microorganismo resultante produce fitol directamente a partir de un sustrato de crecimiento tal como glucosa en una sola fermentación.

**[00090]** Como alternativa, para una geranilgeranilo reductasa capaz de usar GG como sustrato, se proporciona un proceso biológico en que se produce GG mediante fermentación (como se describe en secciones anteriores) y se purifica en la medida necesaria para usarlo como materia prima de un proceso de biotransformación. La biotransformación usa geranilgeranilo reductasa para convertir GG en fitol en una etapa. Esta biotransformación usa geranilgeranilo reductasa aislada o células enteras que contienen actividad geranilgeranilo reductasa. La enzima o células se inmovilizan sobre un soporte o mediante reticulación para potenciar la biotransformación. Se prevé que la geranilgeranilo reductasa se modifique por manipulaciones genéticas para potenciar su actividad para la producción de fitol en un proceso biológico industrial.

**[00091]** El fitol formado en un proceso biológico usando geranilgeranilo reductasa se recupera y se purifica en la medida necesaria para permitir la reacción con una hidroquinona en presencia de un ácido, proporcionando vitamina E.

7.0 Producción química de vitamina A a partir de farnesol

**[00092]** Como se observa anteriormente, el presente procedimiento incluye preparar un compuesto de polienocarbonilo α,β-insaturado a partir de farnesol. Tal como se utiliza en la presente invención, un compuesto de polienocarbonilo α,β-insaturado designa un compuesto que tiene dos o más restos olefínicos, en que al menos uno de los restos olefínicos está conjugado con el grupo carbonilo. Un grupo carbonilo designa la presencia de un resto con doble enlace carbono-oxígeno. Los grupos carbonilo ejemplares incluyen aldehídos, cetonas, ésteres, ácidos, anhídridos y haluros de acilo. Preferiblemente, el compuesto de polienocarbonilo α,β-insaturado es de fórmula:

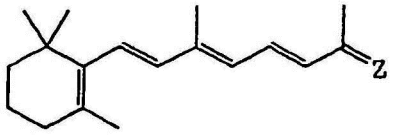



en la que Z es O o $CHCO_2R$, y R es hidrógeno o hidrocarbilo $C_1$-$C_{10}$.

**[00093]** Los grupos hidrocarbilo, según la presente invención, incluyen hidrocarburos alifáticos, cíclicos o aromáticos que tienen de 1 a aproximadamente 10 átomos de carbono. Los grupos hidrocarbilo pueden ser lineales o ramificados. Además, los grupos hidrocarbilo pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes tales como halógeno, arilo, hidroxilo, alcoxilo, carboxilo, oxo y cicloalquilo. Puede haber insertado opcionalmente junto con el grupo hidrocarbilo uno o más átomos de oxígeno, azufre o nitrógeno sustituido o no sustituido. Los grupos hidrocarbilo ejemplares incluyen metilo, etilo, isopropilo, n-butilo, *terc*-butilo, n-pentilo, isopentilo, heptilo y octal.

**[00094]** El compuesto de polienocarbonilo α,β-insaturado puede prepararse a partir de farnesol de una variedad de modos. En una realización particularmente preferida de la presente descripción, el farnesol se oxida a farnesal, que se convierte entonces posteriormente en el compuesto de polienocarbonilo α,β-insaturado. Pueden encontrarse ejemplos de oxidación de un alcohol (por ejemplo farnesol) a un aldehído (por ejemplo farnesal) "Advanced Organic Chemistry Part B: Reactions and Síntesis" 2º Ed., Carey and Sundberg, Plenum Press, 1983, pág. 481-490. Por ejemplo, el farnesol puede oxidase a farnesal usando dióxido de manganeso, óxidos de cromo tales como trióxido de cromo y dicromatos, óxido de plata, condiciones de oxidación de Swern y condiciones de oxidación de Oppenauer. Además, el farnesol puede oxidarse mediante oxidación catalítica con aire usando un catalizador como se da a conocer en Marko y col., Science, 1996, 274, 2044. En general, esta oxidación con aire de farnesol a farnesal implica usar cantidades catalíticas de cloruro cuproso, 1,10-fenantrolina, hidrazodicarboxilato de di-*terc*-butilo y carbonato de potasio en exceso en un disolvente relativamente no polar tal como tolueno o benceno a aproximadamente 80ºC.

**[00095]** El procedimiento para la producción de vitamina A a partir de farnesol puede incluir adicionalmente ciclar el compuesto de polienocarbonilo α,β-insaturado formando un compuesto de polienocarbonilo α,β-insaturado cíclico. Preferiblemente, el compuesto de polienocarbonilo α,β-insaturado cíclico es de fórmula:




en la que Z es O o $CHCO_2R$ y R es hidrocarbilo $C_1$-$C_{10}$. Cuando Z es O, el procedimiento puede incluir transformar O en $CHCO_2R$ o CHCN. Esta transformación puede conseguirse mediante condensación de aldol usando un reactivo apropiado. Por ejemplo, la condensación de aldol del compuesto de polienocarbonilo α,β-insaturado cíclico con $NCCH_2CO_2R$, en la que R es hidrógeno o hidrocarbilo $C_1$-$C_{10}$, seguido de la retirada del resto $CO_2R$, por ejemplo mediante descarboxilación, proporciona un compuesto en que el oxígeno del carbonilo se ha reemplazado por un resto CHCN. Como alternativa, usar $R'O_2CCH_2CO_2R$, en que R y R' son independientemente hidrógeno o hidrocarbilo $C_1$-$C_{10}$, en lugar de $NCCH_2CO_2R$ proporciona un compuesto en que el oxígeno de carbonilo se ha reemplazado por un resto $CO_2R$.

**[00096]** El procedimiento para producir vitamina A a partir de farnesol puede incluir adicionalmente una etapa de reducción del grupo éster ($CHCO_2R$) o el grupo nitrilo (CHCN) a un alcohol.

**[00097]** La figura 10 ilustra una realización particularmente preferida de la síntesis de vitamina A a partir de farnesol **1.** Una condensación de aldol entre acetona y farnesal **2,** que deriva de la oxidación de farnesol **1,** da como resultado la formación de dehidrofarnesilacetona **3.** Están disponibles una variedad de procedimientos para sintetizar deshidrofarnesilacetona **3** a partir de farnesal **2**. En un aspecto, se somete una mezcla que comprende farnesal **2** y acetona en presencia de una base a condiciones de reacción suficientes para producir la deshidrofarnesilacetona **3.** El producto inicial de la reacción de condensación de aldol es β-hidroxicetona, que típicamente experimenta eliminación en las condiciones de reacción produciendo deshidrofarnesilacetona **3**. En algunos casos, sin embargo, pueden obtenerse como producto algunos o todos los intermedios de β-hidroxicetona. Cuando es este el caso, someter simplemente la β-hidroxicetona a condiciones ácidas o básicas puede dar como resultado la eliminación del grupo hidroxilo, produciendo la deshidrofarnesilacetona **3** deseada.

**[00098]** La deshidrofarnesilacetona **3** puede obtenerse también a partir de farnesal **2** sometiendo una mezcla de farnesal **2** y un compuesto de fórmula $R_1CH_2C(=O)CH_2R_2$ a unas condiciones de reacción suficientes para producir deshidrofarnesilacetona **3,** en la que $R_1$ es un resto de fórmula $-CO_2R_3$, $R_2$ es hidrógeno o un resto de fórmula $-CO_2R_3$ y $R_3$ es un hidrocarbilo que tiene de 1 a aproximadamente 10 átomos de carbono. Para obtener la deshidrofarnesilacetona **3** a partir de una reacción entre farnesal **2** y un resto de fórmula $R_1CH_2C(=O)CH_2R_2$, puede ser necesario someter el producto resultante a condiciones de descarboxilación para retirar el grupo o grupos carboxilato de $R_1$ y/o $R_2$. Típicamente, esta descarboxilación requiere la conversión del grupo éster en ácido carboxílico o una sal del mismo, que puede conseguirse mediante saponificación del éster en condiciones ácidas o básicas.

**[00099]** Con referencia de nuevo a la Figura 10, se somete una mezcla que comprende deshidrofarnesilacetona **3** y un compuesto de fórmula $XCH_2CO_2R$ (en la que R es hidrógeno o hidrocarbilo $C_1$-$C_{10}$ y X es haluro) a unas condiciones básicas suficientes para producir éster glicídico $C_{20}$ **4.** Preferiblemente, se selecciona R del grupo constituido por metilo, etilo y *terc*-butilo. Preferiblemente, se selecciona X del grupo constituido por cloro, bromo y yodo. Se somete entonces el éster glicídico $C_{20}$ **4** a unas condiciones suficientes para transposición y deshidratación, produciendo éster de ácido seudorretinoico **5.** En general, la transposición se efectúa poniendo en contacto el éster glicídico $C_{20}$ **4** con un ácido, formando un compuesto hidroxílico $C_{20}$ (no mostrado). Se deshidrata entonces el compuesto hidroxílico $C_{20}$ en las condiciones de reacción o se somete a condiciones de deshidratación separadas, produciendo el éster de ácido seudorretinoico **5** deseado. La deshidratación del compuesto hidroxílico $C_{20}$ puede conseguirse en condiciones ácidas o básicas. Someter el éster de ácido seudorretinoico **5** a condiciones suficientes para la ciclación produce éster de ácido retinoico **6.** Unas condiciones de ciclación típicas implican poner en contacto el éster de ácido seudorretinoico **5** con un ácido. El ácido debería ser suficientemente fuerte para protonar un resto olefínico, generando así un ión carbonio, concretamente un carbocatión que puede experimentar ciclación. Puede añadirse también un nucleófilo relativamente débil, tal como un haluro y/o un ácido carboxílico, para atrapar el carbocatión ciclado resultante. Cuando está presente un nucleófilo débil, el producto ciclado resultante puede contener un nucleófilo que puede experimentar eliminación en las condiciones de reacción o que puede retirarse mediante eliminación en una reacción separada. Preferiblemente, el ácido se selecciona del grupo constituido por ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido fluorosulfónico, ácido sulfúrico y ácidos carboxílicos tales como ácido fórmico y ácido acético y una mezcla de los mismos. Las condiciones de reacción para la ciclación de un 1,5-dieno, tal como acetato de farnesilo, usando un ácido se dan a conocer en Muntyan y col., Izev. Akad. Nauk SSSR, Ser. Khim., 1973, 633 y Stork y Burgstahler, J. Amer. Chem. Soc., 1955, 77, 5068.

**[0100]** Como alternativa, el éster de ácido seudorretinoico **5** puede ciclarse usando una enzima. Por ejemplo, es bien conocido que la licopeno ciclasa cicla cadenas $C_{40}$ apropiadas produciendo carotenoides. De forma similar, puede usarse una enzima ciclasa para ciclar éster del ácido seudorretonoico o su derivado, produciendo éster de ácido retinoico o su derivado.

**[0101]** Con referencia de nuevo a la figura 10, en una realización particular, el éster de ácido retinoico **6** se reduce a vitamina A (retinol). Esta reducción puede conseguirse mediante cualquiera de las reacciones de reducción de éster conocidas tales como reducción con hidruro usando un compuesto que incluye, pero sin limitación, $LiAlH_4$, hidruro de sodio y bis-(2-metoxietoxi)aluminio e hidruro de diisobutilaluminio. Como alternativa, el éster de ácido retinoico **6** puede saponificarse o hidrolizarse en condiciones ácidas o básicas produciendo ácido retinoico, que puede reducirse entonces usando un compuesto que incluye, pero sin limitación, borano ($B_2H_6$) para reducir selectivamente el grupo ácido carboxílico en presencia de olefinas produciendo vitamina A (retinol) **8.**

**[0102]** Como se muestra en la figura 10, el éster de ácido retinoico **6** se reduce en primer lugar hasta retinal **7** poniendo en contacto el éster de ácido retinoico **6** con un primer agente reductor. Se pone en contacto entonces el retinal **7** con un segundo agente reductor produciendo vitamina A (**6**). El primer agente reductor reduce un éster a un aldehído. Hay una variedad de procedimientos y agentes de reducción actualmente disponibles para reducir un éster a un aldehído. Dichos agentes reductores incluyen, pero sin limitación, hidruro de diisobutilaluminio. El segundo agente reductor reduce típicamente un aldehído a un alcohol, pero algunos de estos agentes reductores puede reducir también un éster directamente a un alcohol. Los segundos agentes reductores ejemplares incluyen, pero sin limitación, $LiAlH_4$, hidruro de diisobutilaluminio, hidruro de sodio y bis-(2-metoxietoxi)aluminio y borohidruro de sodio.

**[0103]** Puede obtenerse un acetato **9** u otro derivado éster de vitamina A poniendo en contacto vitamina A con un agente de acetilación u otros agentes de transferencia de acilo en condiciones suficientes para producir acetato de vitamina A u otros derivados éster de vitamina A, respectivamente. El agente acetilante y agente de transferencia de acilo ejemplares incluyen, pero sin limitación, anhídridos o cloruros de acilo de ácido acético, ácido propanoico, ácido fórmico, ácido butanoico y anhídridos mixtos. Típicamente, se usa también un catalizador o una base en reacciones de transferencia de acilo. Las bases ejemplares útiles en la transferencia de acilo incluyen, pero sin limitación, hidróxidos, carbonatos y bicarbonatos de sodio, litio y potasio y aminas tales como piridina y trietilamina. Puede usarse también un catalizador de transferencia de acilo para facilitar la reacción y/o acortar el tiempo de reacción. Los catalizadores de transferencia de acilo ejemplares incluyen, pero sin limitación, dimetilaminopiridina (DMAP).

**[0104]** Otra realización particularmente preferida de producir vitamina A a partir de farnesal se muestra en la figura 11. Se somete deshidrofarnesilacetona **3** (producción descrita anteriormente) a unas condiciones de deshidrogenación suficientes para producir una bis(deshidro)cetona $C_{18}$ **10.** La deshidrogenación de la deshidrofarnesilacetona **3** puede conseguirse poniendo en contacto deshidrofarnesilacetona 3 con un agente deshidrogenante. Los agentes deshidrogenantes ejemplares incluyen, pero sin limitación, quinonas tales como 2,3-dicloro-5,6-diciano-1,4-benzoquinona (D17Q); catalizadores metálicos tales como paladio, platino y níquel y otros agentes de deshidrogenación adecuados.

**[0105]** Se somete entonces la bis(deshidro)cetona $C_{19}$ **10** a unas condiciones suficientes para experimentar ciclación, formando una cetona $C_{18}$ cíclica **11.** Las condiciones de ciclación típicas implican poner en contacto la bis(deshidro)cetona $C_{18}$ **10** con un ácido. Se describen anteriormente las condiciones de reacción típicas para la ciclación de un 1,5-dieno, tal como acetato de farnesilo, y pueden usarse para esta ciclación. La ciclación puede efectuarse también mediante un catalizador metálico que sea conocido por un experto en la técnica, incluyendo níquel y rodio. La bis(deshidro)cetona $C_{18}$ **10** puede ciclarse también usando una enzima. Dichas enzimas útiles se describen anteriormente.

**[0106]** Con referencia de nuevo a la figura 11, se somete una mezcla que comprende la cetona $C_{16}$ cíclica **11** y un compuesto de fórmula $NCCH_2CO_2R$ a unas condiciones de reacción suficientes para formar un nitrilo $C_{20}$ **12,** en el que R es hidrógeno o hidrocarbilo $C_1$-$C_{10}$. Cuando R es hidrógeno, se pone en contacto ácido α-nitrilacético con una base para desprotonar el protón carboxílico así como el protón α del grupo carbonilo. Estos dos protones pueden retirarse usando dos bases diferentes, una para el protón carboxílico y la otra para el protón α, o pueden retirarse ambos protones usando una base que sea suficientemente fuerte para desprotonar ambos protones. Si R es hidrocarbilo $C_1$-$C_{10}$, entonces se usa una base que sea suficientemente fuerte para desprotonar el acetato de α-nitrilo. Puesto que $NCCH_2CO_2R$ contiene dos grupos aceptores de electrones, puede usarse una base relativamente débil, tal como un hidróxido o una amina, para desprotonar un protón α. El acetato de α-nitrilo desprotonado experimenta entonces una reacción de condensación con la cetona $C_{18}$ cíclica **11,** seguido de procesos de deshidratación y descarboxilación, produciendo el compuesto de nitrilo $C_{20}$ **12.** La deshidratación puede ocurrir en las condiciones de la reacción de condensación o puede efectuarse en unas condiciones de reacción separadas. Si R es hidrocarbilo $C_1$-$C_{10}$, es necesario saponificar, concretamente hidrolizar, el grupo alquilo formando un ácido carboxílico o un anión carboxilato antes de someter el producto condensado a unas condiciones de descarboxilación. Las condiciones de descarboxilación del producto condensado requieren generalmente someter el producto condensado a una temperatura elevada.

**[0107]** Se pone entonces en contacto el nitrilo $C_{20}$ **12** con un primer agente reductor en unas condiciones suficientes para producir retinal **7,** o puede reducirse con un agente reductor suficientemente fuerte para producir vitamina A **(8).** El retinal **7** puede reducirse usando un segundo agente de reducción proporcionando vitamina A. Las condiciones y agentes de reducción adecuados para estas reducciones son aquellos descritos anteriormente. La vitamina A puede convertirse adicionalmente en un derivado éster de vitamina A haciendo reaccionar la vitamina A con un agente esterificante apropiado, como se describe anteriormente.

**[0108]** En otra realización, el retinal **7** que se produce mediante cualquiera de los procesos anteriormente descritos se somete a unas condiciones suficientes para producir β-caroteno **13.** Por ejemplo, como se muestra en la Figura 12, dos moléculas de retinal **7** experimentan una reacción de acoplamiento cuando se someten a lo que se conoce comúnmente en la técnica como las condiciones de reacción de acoplamiento de McMurry. La reacción de acoplamiento de McMurry es bien conocida en la técnica de la química orgánica y se describe por John McMurry en la patente de EE.UU. nº 4.225.734. Brevemente, la reacción de acoplamiento de McMurry implica la producción de olefinas a partir de un acoplamiento reductivo de grupos carbonilo tales como cetonas y aldehídos con especies de Ti (II) y/o Ti (0) reactivas. En general, las especies reactivas se generan *in situ* mediante la reducción de Ti (III) o Ti (IV) con un agente reductor seleccionado del grupo constituido por $LiAlH_4$, Na, K, Zn, Mg, $NaBH_4$, $CaH_2$ y $LiBH_4$. Las especies de Ti (III) y Ti (IV) son típicamente haluros de titanio tales como $TiCl_3$ y $TiCl_4$, respectivamente.

**[0109]** En otra realización, el β-caroteno **13** se produce a partir de vitamina A, que se produce mediante cualquiera de los procedimientos anteriormente descritos. Como se muestra en la Figura 13, el procedimiento implica en general hacer reaccionar un haluro de retinilo **15** con retinilfenilsulfona **14.** Puede producirse un haluro de retinilo **15** poniendo en contacto la vitamina A que se produce mediante el proceso descrito anteriormente con una mezcla de reacción seleccionada del grupo que comprende HX, $P(X)_3$ y una mezcla de $P(R_4)_3$ y $X_2$ en condiciones suficientes para producir el haluro de retinilo, en las que X es un haluro, $X_2$ es un halógeno y $R_4$ es hidrocarbilo $C_1$-$C_{10}$. El haluro de retinilo **15** se pone entonces en contacto con un anión de retinilfenilsulfona **14** en unas condiciones suficientes para producir la sulfona $C_{40}$ **16.** En casos en que la retinilfenilsulfona **14** se desprotona con la base antes de ponerse en contacto con el haluro de retinilo **15,** la base es suficientemente fuerte para desprotonar sustancialmente toda la retinilfenilsulfona **14**. Las bases ejemplares para desprotonar sustancialmente toda la retinilsulfona **14** antes de ponerla en contacto con el haluro de retinilo **15** incluyen, pero sin limitación, diisopropilamiduro de litio (LDA), hexametildisilazida de sodio (NaHMDS), metil-litio, butil-litio, *terc*-butil-litio, *sec*-butil-litio, hidruro de potasio, hidruro y *terc*-butóxido de sodio. Como alternativa, el haluro de retinilo **15**, la retinilfenilsulfona **14** y la base se combinan todos en un aparato de reacción y se deja que la base desprotone algunas moléculas de retinilfenilsulfona que pueden reaccionar con el haluro de retinilo **15**, formando la sulfona $C_{40}$ **16,** concretamente, la especie aniónica reactiva de retinilfenilsulfona **14** se genera *in situ*.

**[0110]** Con referencia de nuevo a la figura 13, la retinilfenilsulfona **14** puede producirse haciendo reaccionar un éster de retinilo tal como acetato de retinilo **9** o un haluro de retinilo **15** con una mezcla de reacción que comprende ácido fenilsulfínico en unas condiciones suficientes para producir la retinilfenilsulfona **14.** Puede usarse

una base para desprotonar ácido fenilsulfínico, que experimenta entonces una reacción de sustitución nucleofílica con acetato de retinilo o haluro de retinilo **15,** produciendo retinilfenilsulfona **14.** El ácido fenilsulfínico puede desprotonarse de forma sustancialmente completa antes de poner en contacto con acetato de retinilo o haluro de retinilo **15** usando una base tal como LDA, metil-litio, NaHMDS, *terc*-butil-litio, *sec*-butil-litio, NaH, KH o *terc*-butóxido. Como alternativa, el ácido fenilsulfínico desprotonado puede generarse *in situ* usando una base, tal como hidróxidos, bicarbonatos y carbonatos de litio, sodio y calcio, aminas tales como trietilamina y diisopropiletilamina y alcóxidos tales como metóxido, etóxido y *terc*-butóxido.

**[0111]** Se somete entonces la sulfona $C_{40}$ **16**, que se produce mediante reacción entre haluro de retinilo **15** y retinilfenilsulfona **14**, a unas condiciones suficientes para eliminar el ácido fenilsulfínico produciendo β-caroteno **13**. La eliminación de ácido fenilsulfínico a partir de la sulfona $C_{40}$ **16** puede conseguirse poniendo en contacto la sulfona $C_{10}$ **16** con una base. Las bases ejemplares útiles para la reacción de eliminación incluyen, pero sin limitación, LDA, metil-litio, diisopropiletilamina, hidróxidos y alcóxidos tales como metóxido, etóxido y *terc*-butóxido.

**[0112]** Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar realizaciones de la presente invención y no pretenden limitar el alcance de la presente invención establecido en las reivindicaciones.

**EJEMPLOS**

Ejemplo 1

**[0113]** Este ejemplo describe la creación de mutantes *erg9* mediante mutagénesis química de la cepa de *S. cerevisiae* ATCC 28383 usando ácido nitroso.

**[0114]** Como se observa anteriormente, un modo de aumentar los rendimientos de farnesol o GG es reducir o eliminar la actividad escualeno sintasa. En *S. cerevisiae*, la escualeno sintasa está codificada por el gen *ERG9*.

A. Mutagénesis

**[0115]** Se obtuvo la cepa 28383 a partir de la ATCC. Es el original de la cepa 60431 usada a continuación en algunos experimentos con fines comparativos (también obtenida de la ATCC). La cepa 60431 es un mutante *erg9-1* que produce farnesol.

**[0116]** Se efectuó una curva de inactivación usando ácido nitroso con la ATCC 28383. Usando la información derivada de la curva de inactivación, se efectuó una mutagénesis de la ATCC 28383 con ácido nitroso como se indica a continuación. Se incubaron las células 28383 durante una noche a 30ºC en medio YPD (1% de extracto de levadura Bacto, 2% de peptona Bacto y 2% de glucosa) con agitación. Se lavaron las células y se mutagenizaron. Después de la mutagénesis, se dejaron recuperar las células cultivándolas en YPDC (YPD más colesterol 4 mg/l) a 22ºC durante una noche. Se lavó entonces el cultivo y se sembró sobre agar YPDC (YPDC más 2% de Bactoagar) que contenía diversos niveles de nistatina (20, 30, 40, 50 mg/l). Se incubaron estos cultivos durante 2 semanas a 22ºC.

**[0117]** El antibiótico de polieno antifúngico nistatina inhibe la síntesis de pared celular en células en crecimiento al unirse específicamente a ergosterol, lo que, a su vez, da como resultado la alteración de la permeabilidad selectiva. Se ha mostrado que algunas cepas que son resistentes a nistatina tienen una producción reducida de ergosterol. La nistatina tiene poca, o ninguna, afinidad por el colesterol que, cuando se suministra exógenamente, puede usarse por auxótrofos de esterol tan eficazmente como el ergosterol.

**[0118]** Se obtuvieron aproximadamente 3.000 colonias resistentes a nistatina. Se cribó la sensibilidad a la temperatura (ts) y auxotrofia de esterol. Para determinar la sensibilidad a la temperatura, se cultivaron células mutagenizadas en YPDC a temperatura permisiva (22ºC) y posteriormente se replicaron en placa de agar YPD y se incubaron a temperatura restrictiva (37ºC). Cualquiera célula que no consiguiera crecer a la temperatura mayor incluiría tanto aquellas con un defecto condicionalmente letal como constitutivamente letal en la ruta de esteroles. En los mutantes sensibles a la temperatura se cribó la auxotrofia de esterol mediante réplica en placa de agar YPD (exento de colesterol) e incubación durante una noche a 28ºC. De las 3.000 colonias resistentes a la nistatina, se apartaron 170 después de la confirmación de ts y auxotrofia de esterol.

B. Ensayos en tubo

**[0119]** En las 170 cepas, se evaluó inicialmente en tubos de ensayo la producción de farnesol y otros intermedios de la ruta de isoprenoides como sigue. Se cultivaron las células en 10 ml de YPDC en tubos con tapones a rosca durante 48 horas a 28ºC con agitación. Se centrifugaron las células durante 5-10 minutos a 2800 rpm y se transfirió el sobrenadante a otro tubo. Se lavaron las células una vez con 5 ml de agua destilada y se centrifugaron de nuevo durante 5-10 minutos a 2800 rpm.

**[0120]** Se extrajo el sedimento celular añadiendo 2,5 ml de pirogalol al 0,2% (en metanol) y 1,25 ml de KOH al 60% (en $H_2O$ destilada), agitando con vórtex para mezclar e incubando en un baño de agua a 70-75ºC durante 1,5 horas. Después de esta saponificación, se añadieron 5 ml de hexano, se volvió a tapar el tubo y se agitó con vórtex durante 15-30 s. Se centrifugó el tubo a 2800 rpm durante 5 minutos para separar las fases. Se recuperó la fase de hexano. En caso necesario, la muestra puede concentrarse evaporando el disolvente en atmósfera de nitrógeno y añadiendo de nuevo una cantidad apropiada de hexano para análisis.

**[0121]** Para extraer el sobrenadante, se añadieron 5 ml de hexano al sobrenadante, se volvió a tapar el tubo y se agitó con vórtex durante 15-30 s. Se centrifugó el tubo a 2800 rpm durante 25 minutos para separar las fases. Se recuperó la fase de hexano y se concentró la muestra evaporando en atmósfera de nitrógeno y añadiendo de nuevo una cantidad apropiada de hexano para análisis.

**[0122]** Se analizaron los extractos de hexano de este cribado primario mediante cromatografía en capa fina (TLC) con confirmación mediante cromatografía de gases (CG)/espectrometría de masas (EM) de la presencia de farnesol y otros intermedios de la ruta de isoprenoides. Se efectuó la TLC en placas de gel de sílice C18 en fase inversa usando acetato de etilo/acetonitrilo 6:4 (v/v) (AcOEt/MeCN) como fase móvil y ácido fosfomolíbdico (PMA) al 2% (p/v) en etanol para detección. Se efectuó la CG/EM usando un CG Hewlett Packard 5890 y un detector selectivo de masas de serie 5970. La columna usada era una Restek Rtx-5MS (15 m de longitud, 0,25 mm de DI, sistema de película de 1 µm). Se identificaron 13 mutantes como productores de farnesol u otros intermedios.

C. Análisis de matraz agitado

**[0123]** Se cribaron estos 13 mutantes en matraces agitados, junto con la cepa original 28383 y la cepa productora de farnesol, 64031. Se inocularon 50 ml de medio YPDC en matraces Erlenmeyer con deflectores de 250 ml con cultivos de una noche hasta una DO a 600 nm inicial de 0,05 y se incubaron con agitación a 28ºC. Se muestrearon los matraces y se determinaron la DO a 600 nm, el peso seco y el contenido de esterol. Para medir el peso seco, se centrifugaron 5 ml del cultivo a 8.000 rpm. Se lavaron las células dos veces con $H_2O$ destilada, se resuspendió el sedimento celular en 3-5 ml de $H_2O$ destilada y se transfirió a una cubeta de pesada seca prepesada. Se colocó la cubeta en estufa a 100ºC durante 24 horas, se enfrió entonces en un desecador, se pesó en una balanza analítica y se determinó el peso seco en g/l a partir de la fórmula:

[peso total (cubeta + células) – peso de cubeta] x 200 = peso seco en g/l

Para la determinación de esterol, se procesaron 20 ml de cultivo, se extrajeron el sedimento celular y el sobrenadante y se midieron el farnesol y otros esteroles como se describe anteriormente.

**[0124]** 7 de los 13 mutantes parecían producir intermedios en la ruta del ergosterol y se evaluaron adicionalmente en otros experimentos de matraz agitado (véase a continuación). Los 13 mutantes se habían seleccionado por resistencia a los niveles máximos de nistatina.

**[0125]** Se usaron cultivos de una noche para inocular 50 ml de medio YPDC en matraces agitados por triplicado para cada una de las 7 cepas mutantes (MBNA1-1, MBNA1-5, MBNA1-9, MBNA1-10, MBNA1-11, MBNA1-13, MBNA1-14,), la cepa original 28383 y la cepa mutante 64031. Se extrajeron separadamente las células y el medio a las 24, 48 y 72 horas con hexano, como se describe anteriormente. Se efectuó un análisis del peso seco (efectuado como se describe anteriormente) en cada uno de estos puntos temporales para determinar la densidad celular. Se analizaron en los extractos de hexano por CG/EM sus niveles de farnesol, escualeno, colesterol y ergosterol. Los resultados de farnesol se presentan en la Tabla 3 siguiente.

**[0126]** Se encontraron bajos niveles de farnesol en los sobrenadantes de cultivo, con niveles mucho más altos acumulados en las células. La cepa MBNA1-1 producía 1% de farnesol y también 0,1% de ergosterol a las 72 horas. La cepa MBNA1-5 no producía farnesol, sino 0,3% de escualeno. La cepa MBNA1-9 producía 0,64% de farnesol a las 48 horas. MBNA1-10, MBNAl-11 y MBNA1-14 producían niveles muy bajos de farnesol en las células y parecían producir ergosterol. MBNA1-13 mostraba la más alta producción de farnesol (2,5%) basada en el peso celular seco (42,187 ng/ml de cultivo) y no mostraba producción de ergosterol. Por tanto, entre las cepas productoras de farnesol (MBNA1-1, MBNA1-9 y MBNA1-13) parecía haber diferentes grados de bloqueo de la ruta del ergosterol, puesto que MBNA1-1 y MBNA1-9 producían niveles menores de farnesol y no requerían ergosterol para crecer, y MBNA1-13 producía el máximo nivel de farnesol y tenía un estricto requisito de complemento de esterol para crecer. La cepa original 28383 mostraba una producción de ergosterol de hasta un 0,4% (sin producción de farnesol) y la cepa mutante *erg9* 64031 mostraba una acumulación de farnesol de aproximadamente un 0,4%.

**TABLA 3**

| Caracterización de nuevos mutantes en el experimento de matraz agitado | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Nombre de cepa | Horas de crecimiento | Peso seco mg/ml | Farnesol (ng/ml de cultivo) | Farnesol (% del peso celular |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| MBNA1-1 | 24 | 0,16 | 0 | 0,00 |
| | 48 | 1,12 | 1793 | 0,16 |
| | 72 | 1,26 | 13187 | 1,05 |
| MBNA1-5 | 24 | 2,46 | 0 | 0,00 |
| | 48 | 1,6 | 0 | 0,00 |
| | 72 | 1,06 | 0 | 0,00 |
| MBNA1-9 | 24 | 1,32 | 1122 | 0,00 |
| | 48 | 2,96 | 19062 | 0,64 |
| | 72 | 4,34 | 70625 | 0,00 |
| MBNA1-10 | 24 | 4,76 | 4636 | 0,10 |
| | 48 | 9,44 | 444 | 0,00 |
| | 72 | 7,9 | 166 | 0,00 |
| MBNA1-11 | 24 | 1,82 | 0 | 0,00 |
| | 48 | 3,58 | 258 | 0,01 |
| | 72 | 2,36 | 281 | 0,01 |
| MBNA1-13 | 24 | 0,18 | 0 | 0,00 |
| | 48 | 3,12 | 3657 | 0,12 |
| | 72 | 1,66 | 42187 | 2,54 |
| MBNA1-14 | 24 | 2,42 | 0 | 0,00 |
| | 48 | 8,98 | 0 | 0,00 |
| | 72 | 7,36 | 0 | 0,00 |
| ATCC28383 | 24 | 7,36 | 0 | 0,00 |
| | 48 | 8,52 | 0 | 0,00 |
| | 72 | 8,84 | 0 | 0,00 |
| ATCC64031 | 24 | 1,58 | 90 | 0,01 |
| | 48 | 1,84 | 6845 | 0,37 |
| | 72 | 1,28 | 4874 | 0,38 |

D. Análisis enzimático

**[0127]** Se cultivaron las células para todos los ensayos enzimáticos en medio YPDE (medio YPD que contiene ergosterol 5 mg/l). Se recogieron las células mediante centrifugación. Se suspendió 1 g de células (peso húmedo) en 4 ml de Tris·HCl 0,1 M, pH 7,0. Se disgregó entonces la suspensión celular mediante pase a través de una prensa French (137,9 MPa). Se centrifugó entonces la suspensión celular resultante (lisada) (15.000 x g) y se usó directamente el sobrenadante (extracto exento de células) para ensayos enzimáticos a menos que se indique otra cosa.

**[0128]** Se ensayó en los mutantes la actividad escualeno sintasa. El ensayo de escualeno sintasa implicaba la incubación de un extracto exento de células con FPP en presencia de la forma reducida de dinucleótido fosfato de nicotinamida y adenina (NADPH), la extracción con acetato de etilo y la detección de escualeno por CG. Específicamente, se combinaron Tris/HCl 0,1 M pH 7 (X µl), DTT 0,1 M (2 µl), $MgCl_2$ 0,1 M (10 µl), NADPH 0,1 M (4 µl), FPP 1 mg/ml (6 µl) y extracto exento de células (7000 x g de sobrenadante) (Y µl), en que X + Y = 178 µl para dar 200 µl totales. Se incubó esta mezcla en tubos de vidrio a 37ºC durante 40 min. Se extrajo entonces con 0,15 ml de acetato de etilo. Se transfirió el extracto a viales de plástico y se centrifugó a 15.000 x g durante 5 min. Se analizó el extracto de acetato de etilo usando CG/EM.

**[0129]** La Tabla 4 muestra los niveles de escualeno sintasa para los mutantes MBNA1-1, MBNA1-9, MBNA1-13 y las cepas ATCC 64031 y 28383. La actividad escualeno sintasa era 0,12 pg de escualeno formado/min x mg de proteína para el organismo natural 28383. Los niveles de actividad para las otras 4 cepas eran menores que los límites detectables de este ensayo. Se esperarían niveles de síntesis de escualeno reducidos para MBNA1-1, MBNA1-9 y 64031, puesto que se han caracterizado por ser mutantes parcialmente bloqueados que producen farnesol y bajas cantidades de ergosterol. El MBNA1-13 es un mutante productor de farnesol que no puede crecer sin esterol añadido, así que este mutante bloqueado se esperaría que no tuviera un nivel detectable de escualeno sintasa. Se volvieron a ensayar los extractos de estas cepas con mayores concentraciones de extracto exento de células y tiempos de incubación más largos. De nuevo, no se detectó escualeno sintasa en ninguno de los mutantes.

**TABLA 4**

| Cepa | Ensayo de escualeno sintasa (µg/min x mg de proteína) |
|---|---|
| MBNA1-1 | ND |
| MBNA1-9 | ND |
| MBNA1-13 | ND |
| ATCC 64031 | ND |
| ATCC 28383 | 0,12 |

ND: no detectado

**[0130]** Se efectuó un análisis enzimático para las cepas productoras de farnesol (MBNA1-1, MBNA1-9 y MBNA1-13) y su cepa original 28283. Se compararon los niveles enzimáticos con los de acetoacetil CoA tiolasa, HMG-CoA sintasa, HMG-CoA reductasa, FPP sintasa y una fosfatasa. Se prepararon los extractos exentos de células como se describe anteriormente.

**[0131]** Para el ensayo de FPP sintasa, se combinaron DTT 0,1 M (2 µl), $MgCl_2$ 0,1 M (2 µl), IPP 1 mg/ml (6 µl), GPP 1 mg/ml (6 µl), extracto exento de células (Y) y Tris/HCl 0,1 M (pH 7,0) (X µl), en la que X + Y = 84 µL, y se incubó a 37ºC durante 15 min. Se extrajo entonces esta mezcla dos veces con 0,3 ml de hexano para retirar el farnesol preexistente. A continuación, se añadieron 0,1 ml de tampón 2 x glicina (glicina 0,2 M, $MgCl_2$ 2 mM, $ZnCl_2$ 2 mM), pH 10,4 y 33 unidades de fosfatasa alcalina y se incubó la mezcla a 37ºC durante 1 hora. Se extrajo la mezcla con 0,1 ml de acetato de etilo y se secó con sulfato de sodio. Se determinó el farnesol con CG. Se incluyó un control sin fosfatasa en cada ensayo.

**[0132]** La HMG-CoA reductasa cataliza la reacción de HMG-CoA con NADPH formando mevalonato, dinucleótido fosfato de nicotinamida y adenina (NADP) y CoA (véase la Figura 1). Para estos ensayos, se prepararon extractos exentos de células como se describe anteriormente, excepto porque las suspensiones celulares disgregadas se centrifugaron a 7.000 x g en lugar de a 15.000 x g. Se siguió la reacción monitorizando el consumo de HMG-CoA mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Para el ensayo, se incubó a 37ºC durante 15 minutos una mezcla de reacción que contenía (en un volumen final de 0,1 ml) $Na_2H_2P_2O_7$ 0,1 M, pH 6,5, DTT 2 mM, NADPH 1 mM, HMG-CoA 0,4 mM y extracto exento de células (el volumen de extracto variaba, completando el resto de los 0,1 ml de reacción con $Na_2H_2P_2O_7$ 0,1 M, pH 6,5). Se monitorizó la reacción con HPLC (columna en fase inversa Luna C18 (Phenomenex) usando un gradiente de 0% de disolvente B durante 1 min, seguido de 0-11% de B durante 42 min. El disolvente A era fosfato de potasio 40 mM (pH 6,0)/metanol 86:14 (v/v). El disolvente B era metanol. La longitud de onda para detección era 260 nm).

**[0133]** La HMG-CoA sintasa convierte acetoacetil CoA y acetil CoA en HMG-CoA y CoA. El ensayo monitoriza la producción de HMG-CoA por HPLC. Para el ensayo, se combinaron $Na_2H_2P_2O_7$ 0,1 M, pH 6,5, (X µl), acetoacetil CoA 20 mM (4 µl), acetil CoA 20 mM (2 µl) y extracto exento de células (Y µl), en que X + Y es 94 µl (volumen total 100 µl) y se incubaron a 37ºC durante 5 minutos. Se calentó entonces la mezcla de reacción a 60ºC durante 5 minutos para inactivar la enzima, seguido de centrifugación en una microcentrífuga a velocidad máxima durante 5 minutos. Se analizó el sobrenadante mediante HPLC.

**[0134]** La acetoacetil CoA tiolasa cataliza una reacción reversible, con lo que, en la dirección directa, reaccionan dos moléculas de acetil CoA formando acetoacetil CoA y CoA. El ensayo monitoriza la formación de acetil CoA (reacción inversa) por HPLC. Para el ensayo, se combinaron $Na_2H_2P_2O_7$ 0,1 M, pH 6,5, (X µl), acetoacetil CoA 20 mM (2 µl), CoA 20 mM (3 µl) y extracto exento de células (Y µl), en que X + Y es 95 µl (volumen total 100 µl) y se incubaron a 37ºC durante 5 minutos. Se centrifugó entonces la mezcla de reacción en una centrífuga Microcon-10 (Amicon) para separar la enzima del producto. Se analizó el sobrenadante por HPLC.

**[0135]** El ensayo de fosfatasa cuantifica la actividad fosfatasa midiendo la formación de p-nitrofenol (absorbancia aumentada a 400 nm). Para el ensayo de fosfatasa, se combinaron Tris-HCl 0,1 M, pH 7 (X µl), $MgCl_2$ 1 M (2 µl), fosfato de p-nitrofenilo 50 mM (10 µl) y extracto exento de células (Y µl), en que X + Y = 1 ml, y se incubaron a 37ºC durante 15 minutos, después de lo cual se midió la absorbancia a 400 nm.

**[0136]** La Tabla 5 muestra los niveles para cada una de las 5 enzimas en estas 4 cepas. Los niveles de acetoacetil CoA tiolasa eran comparables en todas estas cepas. Los niveles de HMG-CoA sintasa y HMG-CoA reductasa parecían ser de 2 a 3 veces mayores en las cepas mutantes. Los niveles de FPP sintasa eran iguales o menores en los mutantes que en 28383. Los niveles de fosfatasa parecían estar elevados 3 a 4 veces en las cepas mutantes en comparación con la original. Puesto que todas estas cepas se aislaron mediante mutagénesis clásica, es posible que existan otras mutaciones en estas cepas además de la mutación *erg9*.

**TABLA 5**

| | MBNA1-1 | MBNA1-9 | MBNA1-13 | ATCC 28383 |
|---|---|---|---|---|
| Acetoacetil-CoA tiolasa (nmol de AcCoA/min x mg de proteína) | $2,4 \times 10^2$ | $2,7 \times 10^2$ | $1,6 \times 10^2$ | $2,0 \times 10^2$ |
| HMG-CoA sintasa (nmol de HMG-CoA/min x mg de proteína) | 5,7 | 7,2 | 7,1 | 2,7 |
| HMG-CoA reductasa (nmol de CoA/min x mg de proteína) | 0,35 | 0,55 | 0,36 | 0,15 |
| FPP sintasa (nmol de farnesol/min x mg de proteína) | 1,3 | 2,0 | 1,6 | 2,2 |
| Fosfatasa genérica (nmol de p-nitrofenol/min x mg de proteína) | 82 | 83 | 91 | 24 |

E. Análisis genético de ERG9

**[0137]** Se preparó ADN cromosómico a partir de las cepas ATCC 28383, MBNA1-1, MBNA1-9 y MBNA1-13 según el procedimiento descrito en Sherman y col. (Sherman, F., G.R. Fink y J.B. Hicks, 1989, "Methods in Yeast Genetics", Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, NY). Se digirió el ADN genómico con las enzimas de restricción *ApaI* y *NsiI*, y se sometió a análisis de transferencia Southern usando un fragmento de ADN de *ERG9* biotinilado como sonda. La sonda de *ERG9* consistía en un fragmento de ADN de *ERG9* de 2044 pb aislado a partir de un gel de agarosa después de digestión del plásmido pTWM103 con *ApaI* y *NsiI*. El pTWM103 consiste en el gen *ERG9* y secuencias flanqueantes que se extienden desde la posición nº 10916 a la nº 13868 de la secuencia de acceso a GenBank nº U00030. Se construyó este plásmido mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen *ERG9* y las regiones flanqueantes usando los dos siguientes oligonucleótidos:

5'-oligo = VE107-5 CTC AGT ACG CTG GTA CCC GTC AC
(denotado en el presente documento como SEQ ID NO:1)

3'-oligo = VE105-3 gat gga TCC CAA TAT GTG TAG CTC AGG (denotado en el presente documento como SEQ ID NO:2).

**[0138]** Las letras mayúsculas indican secuencias de ADN de la región flanqueante de *ERG9*, mientras que las letras minúsculas designan bases añadidas para crear sitios de restricción. VE107-5 contiene secuencias desde la posición nº 10905 a la posición nº 10928 de la secuencia de acceso a GenBank nº U00030. VE105-3 contiene el complemento inverso de las secuencias desde la posición nº 13868 a la posición nº 13847.

**[0139]** Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: El ADN molde era ADN genómico aislado de la cepa S288C (Yeast Genetic Stock Center, Berkeley, CA)

2 min. 94°C/1 ciclo
1 min. 94°C, 1 min. 52ºC, 1,5 min. 74ºC/30 ciclos
5 min. 74ºC/1 ciclo.

**[0140]** Se digirió el ADN de *ERG9* de 2969 pb generado a partir de esta reacción de PCR con *KpnI* y *BamHI*, se ligó entonces con YEp352 digerido con *KpnI, BamHI* generando el plásmido pTWM103. YEp352 es un vector lanzadera de levadura/*E. coli* (Hill, J.E., Myers, A.M., Koerner, T.J. y Tzagaloff, A., 1986, "Yeast/E. coli Shuttle Vectors with Multiple Unique Restriction Sites", Yeast 2: 163-167).

**[0141]** Se obtuvo ADN para la sonda de *ERG9* descrita anteriormente mediante digestión de TWM103 con *ApaI* y *NsiI*, y purificando el fragmento de 2044 pb que contenía el gen *ERG9* y secuencias flanqueantes. Se biotiniló entonces el ADN de *ERG9* usando extensión por cebador aleatorio (kit NEBlot Phototope, New England BioLabs, Beverly, MA).

**[0142]** Se hibridó aproximadamente 1 µg de sonda de *ERG9* biotinilada con la transferencia Southern de ADN genómico digerido con *ApaI, NsiI* de las cepas ATCC 28383, MBNA1-1, MBNA1-9 y MBNA1-13. La transferencia reveló que las cuatro cepas contenían una sola secuencia de hibridación localizada en un fragmento de 2044 pb.

**[0143]** Para clonar los genes *ERG9* de estas cuatro cepas, se digirió de nuevo ADN genómico de cada una con *ApaI* y *NsiI*. Se digirió el vector lanzadera de levadura/*E. coli* pRS315 (Sikorski, R.S. y P. Hieter, 1989, "A System of Shuttle Vectors and Yeast Host Strains Designed for Efficient Manipulation of DNA in Saccharomyces cerevisiae", Genetics, 122: 19-27) con *ApaI* y *PstI* (*NsiI* y *PstI* tienen extremos cohesivos compatibles). Se separaron los ADN digeridos en un gel de agarosa y se cortaron del gel los fragmentos de ADN cromosómico en el intervalo de tamaño de aproximadamente 1,6 kb a aproximadamente 3 kb, así como la banda de 3895 pb correspondiente a pRS316 digerido, y se purificaron usando GeneClean (BIO 101, Inc., Visa, CA). Se ligaron los fragmentos de ADN genómico purificado de cada una de las cuatro cepas con pRS316, y se transformaron en *E. coli*. Se identificaron los transformantes que contenían clones pRS316/*ERG9* mediante hibridación de colonia usando la sonda de *ERG9* descrita anteriormente. Se aislaron de esta manera los clones de *ERG9* derivados de cada una de las cuatro cepas. Se secuenciaron los genes *ERG9* clonados de cada cepa por ACGT, Inc., Northbrook, IL, usando un secuenciador de ADN automatizado de Applied Biosystems, Inc., modelo ABI 100.

**[0144]** La secuencia del gen *ERG9* de ATCC 28383 era idéntica a la secuencia depositada en GenBank (nº de acceso U00030). Se encontró que los genes *erg9* de MBNA1-2 y MBNA1-9 tienen la misma mutación, a saber, un cambio de G a A en la posición nº 12386 del nº de acceso a GenBank U00030, que cambia un codón TGG a un codón de terminación TGA. Esto causa la terminación de la proteína ERG9 a los 237 aminoácidos en lugar de a los 444 aminoácidos normales encontrados en la proteína ERG9 natural.

**[0145]** Se encontró que el gen *erg9* de MBNA1-13 contenía una deleción de C en la posición nº 12017 del nº de acceso a GenBank U00030, que causa un desplazamiento de fase y la terminación temprana de la proteína ERG9 a los 116 aminoácidos, siendo los dos últimos aminoácidos diferentes de la proteína ERG9 natural (debido al

desplazamiento de fase). Los alelos *erg*9 de MBNA1-1 y MBNA1-9 retienen bajos niveles de actividad. Se determinó ésta transformando un mutante de deleción *erg9* que requiere ergosterol con plásmidos que portan los genes *erg9* mutantes de MBNA1-1 y MBNA1-9. La presencia de los genes clonados en las cepas de deleción de *erg9* permitió crecer a estos transformantes, aunque lentamente, en medio que carece de ergosterol. El alelo *erg9* de MBNA1-13 no mostró actividad residual cuando se ensayó de esta manera. La cepa de deleción de *erg9* creció a niveles naturales cuando se transformó con el alelo *ERG9* de la ATCC 28383.

F. Descripción de mutaciones secundarias

**[0146]** *Saccharomyces cerevisiae* normalmente no importa ergosterol de su entorno en condiciones aeróbicas. Sin embargo, los mutantes de *erg9* aislados fueron capaces de crecer aeróbicamente cuando se complementaron con ergosterol o colesterol y, por lo tanto, deben contener mutaciones secundarias que permitan que ocurra la captación aeróbica de esterol. Los procedimientos usados para aislar mutantes de la ruta del ergosterol, tales como el mutante de *erg9* de MBNA1-13, incluían no solo una selección de mutantes de la ruta del ergosterol, sino una selección de células que importan esteroles en condiciones aeróbicas también, puesto que solo los mutantes con mutaciones tanto en un gen de la ruta del esterol como en un gen de captación de esterol habrían sobrevivido.

**[0147]** En el ejemplo 3 siguiente, se describe la dificultad encontrada cuando se intenta obtener mutaciones por inactivación génica de *erg9* mediante procedimientos moleculares, incluso en una cepa que porta la mutación *upc2*, que se ha notificado que permite la captación de esteroles en condiciones aeróbicas (Lewis, T.L., G.A. Keesler, G.P. Fenner y L.W. Parks, 1988, "Pleiotropic mutations in Saccharomyces cerevisiae affecting sterol uptake and metabolism", Yeast 4: 93-106). Parece que la mutación *upc2* no confiere una captación aeróbica de esterol eficaz a un mutante de *erg9*, y que las cepas descritas en el Ejemplo 3 adquirieron mutaciones espontáneas adicionales (a una tasa de frecuencia baja) que mejoran su capacidad de captar aeróbicamente esteroles.

**[0148]** Tener las mutaciones apropiadas que potencian la captación aeróbica de ergosterol y colesterol a una cepa por lo demás natural permite aislar mutaciones de *erg9* en esa cepa a una frecuencia mucho mayor que la que se obtendría con una cepa mutante sin captación de esterol. Para demostrar que la cepa mutante de *erg9* MBNA1-13 (y derivados de esta cepa) había adquirido una o unas mutaciones que potencian la captación de esteroles en condiciones aeróbicas (designado como potenciación de la captación de esterol o mutaciones *sue*), se comparó la frecuencia de creación de una inactivación génica de *erg9* en el trasfondo de MBNA1-13, que contiene la mutación de captación de esterol, con la frecuencia de obtención de la mutación de inactivación génica de *erg9* en el trasfondo original de ATCC 28383, que presuntamente carece de la mutación de captación de esterol. Esto se hizo con las dos siguientes cepas que representan el trasfondo de cada cepa. SWE23-ΔHE9 (*ura3, his3, sue*) derivaba de MBNA1-13 y contiene un gen *ERG9* reparado. SWY5-ΔH1 (*ura3, his3*) es un mutante auxotrófico derivado de la cepa ATCC 28383. Se describe con detalle la construcción de SWE23-ΔHE9 y SWY5-ΔH1 en la Sección G a continuación. Puesto que SWE29-ΔHE9 derivaba de MBNA1-13, esta cepa servía como hospedador que portaba la mutación *sue*, mientras que SWY5-ΔH, que derivaba de ATCC 28383, servía como hospedador sin la mutación *sue*. Se transformaron ambas cepas con cantidades iguales (aproximadamente 1 µg) del fragmento de ADN *erg9:: ΔHIS3* obtenido mediante digestión de pKML19-41 (construcción plasmídica descrita en el Ejemplo 3) con *BamHI* y *XmaI* y purificación del fragmento de 2,1 kb resultante. Se transformaron las células con este fragmento de 2,1 kb usando el procedimiento de transformación con LiAc (Gietz, R.D., R.H. Schiestl, A.R. Willems y R.A. Woods, 1995, "Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure", Yeast 11: 355-360), y se seleccionaron los transformantes en medio SCE-ura. El medio SCE contiene 0,67% de base nitrogenada de levadura Bacto (sin aminoácidos), 2% de dextrosa, sulfato de adenina 20 mg/l, uracilo 20 mg/l, L-triptófano 20 mg/l, L-histidina 20 mg/l, L-arginina 20 mg/l, L-metionina 20 mg/l, L-tirosina 30 mg/l, L-leucina 30 mg/l, L-isoleucina 30 mg/l, L-lisina 30 mg/l, L-fenilalanina 50 mg/l, L-ácido glutámico 100 mg/l, L-ácido aspártico 100 mg/l, L-valina 150 mg/l, L-treonina 200 mg/l, L-serina 400 mg/l y ergosterol 5 mg/l. Para placas de agar, se añade un 2% de agar Bacto al medio SCE. El medio SCE-ura es SCE que carece de uracilo.

**[0149]** Se obtuvieron un total de 24 colonias $HIS^+$ surgidas de la transformación de SWY5-ΔH1, mientras que se obtuvieron 401 colonias $HIS^+$ a partir de SWE23-ΔHE9. Puesto que era posible que el gen *erg9Δ::HIS3* se integrara en loci distintos del locus de *ERG9* (y permitiendo por lo tanto a las células permanecer prototróficas de ergosterol), se ensayó en 20 de cada tipo de transformante el requisito de ergosterol sembrando en medio YPD (carece de ergosterol). Las 20 colonias $HIS^+$ derivadas de SWY5-ΔH eran capaces de crecer en YPD, lo que indicaba que seguían conteniendo un gen *ERG9* funcional y sugería que el gen *erg9Δ::HIS3* no estaba integrado en el locus de *ERG9*. Por otro lado, ninguna de las 20 colonias $HIS^+$ derivadas de SWE23-ΔHE9 era capaz de crecer en YPD, indicando que el ADN de *erg9Δ::HIS3* había reemplazado al gen *ERG9* natural en este trasfondo de cepa a una frecuencia relativamente alta. Para verificar esto, se analizaron por HPLC 9 colonias $HIS^+$ de cada cepa para determinar los tipos de alelos de *ERG9* presentes en sus genomas. Se preparó el ADN genómico como se describe en Sherman y col. (1989). Los oligonucleótidos usados para el análisis se dan a continuación.

5' oligo = 250 UpBam gcgcatCCACGGGCTATATAAA (SEQ ID NO:3)

3' oligo = 1764 LoBam gcggatCCTATTATGTAAGTACTTAG (SEQ ID NO:4)

Las condiciones de PCR fueron las siguientes:

94ºC, 3 min.

94ºC, 30 s.; 50ºC, 30 s.; 72ºC, 3 min.; 30 ciclos 72ºC, 7 min.

**[0150]** Los oligonucleótidos 250 UpBam contienen las secuencias correspondientes a la posición nº 11555 a la nº 11570 de la secuencia de nº de acceso a GenBank J05091. Oligo 1764LoBam contiene el complemento inverso de las secuencias desde la posición nº 13049 a la nº 13068 del mismo fichero de secuencias de GenBank. En los 9 transformantes $HIS^+$ de SWE23-ΔHE9, el producto de PCR era de 2,1 kpb, indicando que el gen *ERG9* se había reemplazado por el gen *erg9Δ::HIS3*. En 8 de los 9 transformantes $HIS^+$ de SWY5-ΔH1, los productos de PCR eran de 2,1 kpb y 1,5 kpb, indicando que el gen *ERG9* natural permanecía intacto y que el ADN de *erg9Δ::HIS3* se había integrado en otro lugar del genoma. El noveno transformante $HIS^+$ mostró solo el producto de PCR de 1,4 kpb, indicando también que el gen *ERG9* estaba intacto en esta cepa. En este caso, se cree que el gen *HIS3* se ha integrado en el genoma sin portar todas las secuencias de *erg9* con él.

**[0151]** Estos resultados muestran que, durante el transcurso del aislamiento de la cepa MBNA1-13, surgieron en la cepa una o unas mutaciones adicionales, designadas en el presente documento como *sue*. Basándose en los resultados descritos en el Ejemplo 3 siguiente, la mutación *sue* parece ser diferente de la mutación *upc2* anteriormente notificada y confiere una incorporación más eficaz de esteroles.

G. Derivación de nuevas cepas de MBNA1-13

**[0152]** Para usar la cepa mutante de *erg9* de MBNA1-13 para manipulaciones genéticas moleculares, se desarrolló adicionalmente la cepa de modo que portara marcadores auxotróficos adecuados con este fin. Se mutagenizó MBNA1-13 usando metanosulfonato de etilo usando procedimientos estándar, y se obtuvieron mutantes resistentes al ácido 5-fluoroorótico (5-FOA) sembrando las células mutagenizadas en medio que contenía 5-FOA. Se ha descrito la utilización de selección por 5-FOA en Sikorski y Boeke, 1991 (Sikorski, R.S. y Boeke, J.D., 1991, "In Vitro Mutagenesis and Plasmid Shuffling: From Cloned Gene to Mutant Yeast, Methods in Enzymology" 194: 302-318). Este procedimiento de selección permitía el aislamiento de cepas que contenían mutaciones en el gen *URA3*, que codifica la 5'-fosfato de orotidina descarboxilasa. Se aislaron varias cepas resistentes que exhibían resistencia a 5-FOA (concretamente, un fenotipo ura-). Para determinar cuáles de estas cepas contenían una mutación específicamente en el gen URA3, se transformaron las cepas ura- con pRS316 (Sikorski y Hieter, 1989), que contiene el gen URA3 intacto, usando el procedimiento de transformación con LiOAc (Gietz y col., 1995). Se identificaron varias cepas cuya falta de crecimiento en medio que carece de uracilo se restauró por pRS316, indicando que esas cepas portaban la mutación *ura3*. Se eligió una de estas cepas, EMS9-23 (*ura3, erg9*), para modificación adicional.

**[0153]** Se alteró genéticamente la cepa EMS9-23 para contener deleciones en los genes *leu2, trp1* o *his3* usando plásmidos de transposición génica descritos en Sikorski y Hieter 91989 y el procedimiento de reemplazo génico de inserción/escisión descrito en Rothstein (1991) (Rothstein, R., 1991, "Targeting, Disruption, Replacement, and Allele Rescue: Integrative DNA Transformation in Yeast", Methods in Enzymology 194: 281-301). Los mutantes *leu2, trp1* e *his3* derivados de MBNA 1-13 se denominaron SWE23-ΔL1, SWE23-ΔT1 y SWE23-ΔH1, respectivamente. La cepa SWE23-ΔH1 se manipuló adicionalmente para intercambiar la mutación de desplazamiento de fase de *erg9* original (véase la Sección E) por el alelo *erg9Δ::HIS3*. Esto se realizó transformando SWE23-ΔH1 (usando el procedimiento de LiOAc) con aproximadamente 5 µg de un fragmento de ADN lineal que contenía el módulo *erg9Δ::HIS3* (se describe la construcción del módulo *erg9Δ::HIS3* con detalle en el Ejemplo 3). Se obtuvo el módulo *erg9Δ::HIS3* mediante la digestión de pKML19-40 con *BamHI* y *XmaI*, y purificando el fragmento de ADN de 2,1 kpb que contiene el fragmento *erg9Δ::HIS3*. Los transformantes de SWE23-ΔH1 en que se había reemplazado el alelo de desplazamiento de fase de *erg9* por el alelo *erg9Δ::HIS3* se seleccionaron sembrando los transformantes en medio SCE que carece de histidina. Una de las cepas resultantes se designa como SWE23-ΔE91.

**[0154]** Se modificó adicionalmente la cepa SWE23-DH1 para contener mutaciones en los genes *leu2* y *trp1*. Se introdujeron estas mutaciones usando plásmidos de transposición génica (Sikorski y Hieter, 1981) y el procedimiento de reemplazo por inserción/escisión (Rothstein 1991) descrito anteriormente. Una de las cepas resultantes se designa como SW23-DH1#42, y contiene mutaciones *erg9, ura3, his3, leu2, trp1* y *sue*. Se modificó adicionalmente la cepa SW23-DH1#42 para intercambiar la mutación de desplazamiento de fase de *erg9* original por el alelo *erg9D::HIS3*. Se realizó esto transformando SW23-DH1#42 (usando el procedimiento de LiOAc) con aproximadamente 5 mg de un fragmento de ADN lineal que contenía el módulo *erg9D::HIS3* como se describe anteriormente. Se seleccionaron los transformantes $HIS^+$ en que la mutación por desplazamiento de fase de *erg9* se había reemplazado por el alelo *erg9D::HIS3* en medio SCE-his. Una de las cepas resultantes se designa como SW23B, y porta mutaciones en los siguientes genes: *ura3, leu2, trp1, his3, erg9::HIS3, sue*.

**[0155]** Se da en la Tabla 6 un resumen de las cepas derivadas de MBNA1-13 y su producción de farnesol

respectiva en cultivos de matraz agitado. Se cultivaron las cepas durante una noche en medio YPDE (30ºC con agitación a 180 rpm). Se usaron estos cultivos para inocular 25 ml de medio YPDE en un matraz de 250 ml de tal modo que la $DO_{600}$ inicial fuera de 0,05. Se cultivaron las células durante 72 horas a 30ºC (con agitación a 180 rpm). Se analizaron en muestras del caldo entero (concretamente, células más medio de cultivo) el peso celular seco y el farnesol como se describe en la Sección C anterior.

**TABLA 6**

| **Crecimiento y producción de farnesol en cepas derivadas de MBNA1-13** | | |
|---|---|---|
| Cepa | Genotipo | Farnesol (% en peso celular seco) |
| MBNA-1-13 | *erg9, sue* | 7,9 |
| EMS9-23 | *erg9, ura3, sue* | 8,0 |
| SWE23-ΔH1 | *erg9, ura3, his3-Δ200, sue* | 7,9 |
| SWE23-ΔL1 | *erg9, ura3, leu2-Δ1, sue* | 9,3 |
| SWE23-ΔT1 | *erg9, ura3, trp1-Δ63, sue* | 10,8 |
| SWE23-ΔE91 | *erg9Δ::HIS3, ura3, his3, sue* | 8,0 |

**[0156]** Se evaluaron adicionalmente en las cepas MBNA1-13, EMS9-23 y SWE23-ΔE91 el crecimiento y la producción de farnesol en fermentadores de 1 l usando el procedimiento descrito en la Sección H siguiente. Se transformaron EMS9-23 y SWE23-ΔE91 cada una con el plásmido YEp352, que contiene el gen *URA3* clonado. Eso obvió la necesidad de añadir uracilo al medio de fermentación para estas dos cepas. La Figura 4 y la Tabla 7 resumen los resultados de estas fermentaciones. MBNA1-13 y EMS9-23/YEp352 actuaron de forma similar. Aunque el crecimiento de SWE23-ΔE91/YEp352 quedó por detrás de las otras dos cepas, alcanzó una densidad celular y un nivel de producción de farnesol comparable a las demás cepas.

**TABLA 7**

| Comparación de MBNA1-13 y cepas derivadas de ella en fermentadores de 1 l | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Cepa/plásmido | Tiempo (h) | Peso celular seco (g/l) | Farnesol | |
| | | | (g/l) | (% en peso celular seco) |
| MBNA1-13 | 191 | 40,08 | 2,25 | 5,5 |
| EMS9-23/YEp352 | 191 | 42,6 | 2,46 | 5,8 |
| SWE23-ΔE91/YEp352 | 239 | 37,2 | 2,23 | 6,0 |

**[0157]** Se manipularon adicionalmente las cepas EMS9-23 y SWE23-ΔH1 reparando las mutaciones *erg9* de nuevo a la función natural. Esto se realizó transformando las dos cepas (usando el procedimiento de transformación con LiOAc) con aproximadamente 5 µg de un fragmento de ADN que contenía el gen *ERG9* intacto. Se obtuvo el fragmento de ADN del gen *ERG9* mediante la digestión de pTWM103 (véase la Sección E anterior) con *SacI* y *BamHI*, y purificando el fragmento de ADN de 2,5 kb que contenía el gen *ERG9*. Se obtuvieron los transformantes de EMS9-23 y SWE23-ΔH1, en que se había reemplazado la mutación de desplazamiento de fase *erg9* por el gen *ERG9* natural, de cada cepa mediante la selección de células que podían crecer en medio YPD carente de ergosterol. Se eligieron para estudio adicional una cepa con *erg9* reparado derivada de EMS9-23, designada SWE23-E9, y una cepa con *erg9* reparado derivada de SWE23-ΔH1, designada SWE23-ΔHE9. En experimentos separados, se introdujeron mutaciones auxotróficas en la cepa original ATCC 28383. Se obtuvo una mutación *ura3* espontánea de ATCC 28383 después de sembrar células en medio que contenía 5-FOA como se describe anteriormente. Se transformaron los mutantes resistentes a 5-FOA con pRS316 (descrito anteriormente) para identificar a aquellos que habían adquirido espontáneamente una mutación en su gen *URA3*. Una cepa, SWY5, exhibía un fenotipo ura- estable (baja frecuencia de reversión) y se eligió para estudio adicional. Se manipuló adicionalmente SWY5 para portar la mutación *his3* usando el plásmido de transposición génica YRp14/*his3*-Δ200 descrito por Sikorski y Hieter (Sikorski y Hieter, 1989) y el procedimiento de reemplazo de inserción/escisión descrito por Rothstein (Rothstein, 1991). Se eligió un mutante *his3* derivado de SWY5, designado como SWY5-ΔH, para estudio adicional.

**[0158]** La Tabla 8 enumera las cepas reparadas y auxotróficas descritas y sus genotipos.

**TABLA 8**

| Cepas reparadas y auxotróficas relacionadas con ATCC 28383 y MBNA1-13 | | |
|---|---|---|
| Cepa | Genotipo | Original |
| SWE23-E9 | *ura3, sue* | EMS9-23 |
| SWE23-ΔHE9 | *ura3, his3, sue* | SWE23-ΔH1 |
| SWY5 | *ura3* | ATCC 28383 |
| SWY5-ΔH | *ura3, his3* | SWY5 |

**[0159]** Para ensayar si el mutante *erg9* de MBNA1-13 había adquirido algún requisito nutricional adicional durante el curso de su aislamiento, se realizó un experimento de crecimiento en matraces agitados para comparar la

cepa original ATCC 28383, la cepa mutante *erg9* de EMS9-23 y la cepa con *erg9* reparado SWE23-E9. Se cultivaron los cultivos en medio YPD a 30ºC con agitación a 180 rpm. Se complementó también el cultivo de EMS9-23 con ergosterol 5 mg/l. Se monitorizó el crecimiento mediante la $DO_{600}$.

**[0160]** Los resultados de este experimento, presentados en la Figura 5, muestran que se redujo el crecimiento del mutante *erg9*, pero que el crecimiento de la cepa original natural 28383 y la cepa con *erg9* reparado SWE23-E9 fue similar. La $DO_{600}$ final ligeramente menor en el cultivo de SWE23-E9 fue debida probablemente al hecho de que esta cepa es auxótrofa de uracilo, y la concentración de uracilo en el medio YPD no era óptima. Estos resultados indican que la causa principal de falta de crecimiento en los mutantes *erg9* es la mutación *erg9* misma. Otras mutaciones en los mutantes *erg9*, tales como la mutación o mutaciones *sue*, no tienen un efecto significativo sobre el crecimiento.

H. Fermentación de un litro

**[0161]** Se cultivaron las cepas MBNA1-13, EMS9-23/YEp352 y SWE23-ΔE91/YEp352 en fermentadores de un litro en condiciones semicontinuas como se describen a continuación. En estas condiciones, la producción de farnesol por estas cepas estaba en el intervalo de 5,5-6,0% de peso celular seco (datos mostrados en la Sección G anterior) a las 191-239 horas.

Condiciones y materiales de fermentación:

**[0162]** Se efectuó la fermentación de un litro sometiendo primero a autoclave durante 45 min a 121ºC en el fermentador a la siguiente disolución:

| | |
|---|---|
| $(NH_4)_2SO_4$ | 10,0 g/l |
| $KH_2PO_4$ | 10,0 g/l |
| $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 0,5 g/l |
| NaCl | 0,5 g/l |
| $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ | 3,0 g/l |
| Extracto de levadura (Difco) | 2,0 g/l |
| Disolución salina | 20,0 ml |
| Antiespumante (Dow 1520) | 4,0 gotas |
| Agua desionizada | 500 ml |

Después del autoclave, se añadieron las siguientes disoluciones estériles:

| | |
|---|---|
| Disolución de glucosa (50%, p/v) | 5,0 ml |
| Disolución de vitamina | 15,0 ml |
| Disolución de ergosterol | 0,2 ml |

Se esterilizaron las disoluciones de glucosa y vitamina mediante pasada a través de un filtro de 0,45 µm. La disolución de ergosterol se considera estéril (véase a continuación).
Disolución de alimentación de glucosa (completada con agua desionizada)

**[0163]**

| | |
|---|---|
| Disolución de glucosa (60%, p/v) | 360 ml |
| Disolución de extracto de levadura (12,5% p/v) | 80 ml |
| Disolución de ergosterol | 5,8 ml |

Glucosa y extracto de levadura esterilizados por autoclave; ergosterol considerado estéril.

*Inóculo*

**[0164]** 1 ml de suspensión celular congelada en glicerol al 10% inoculado en 250 ml de medio YPDE en un matraz con deflectores de 1000 ml, incubado durante 48 horas a 29ºC y 150 rpm; se usan 30 ml de inóculo por fermentador.

*Condiciones de fermentación*

**[0165]** 28ºC, pH 4,5

Agitación a 300-1000 rpm, aireación a 50-200 ml/min según sea necesario para mantener el oxígeno disuelto a un 10-60% de saturación de aire. Disolución de alimentación de glucosa añadida después de agotarse la glucosa inicial. Velocidad de adición para conseguir una velocidad de crecimiento de 0,04 $h^{-1}$, considerando que el rendimiento celular en glucosa es de un 0,25. Velocidad máxima de alimentación: 3,5 ml/h.
Disolución salina (dada por l en agua desionizada)

**[0166]**

| | |
|---|---|
| $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0,28 g |
| $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0,29 g |
| $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ | 0,08 g |
| $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ | 0,29 g |
| $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ | 0,24 g |
| $MnSO_4 \cdot H_2O$ | 0,17 g |
| HCl | 0,10 ml |

Disolución de vitamina (dada por l de agua desionizada)

**[0167]**

| | |
|---|---|
| biotina | 10 mg |
| pantotenato | 120 mg |
| inositol | 600 mg |
| HCl de piridoxina | 120 mg |

HCl de tiamina 120 mg

Disolución de ergosterol

**[0168]**

| | |
|---|---|
| etanol | 20 ml |
| IGEPAL | 20 ml |
| ergosterol | 0,4 g |

Se calienta a 50ºC con mezclado hasta disolución y se almacena a -20ºC. IGEPAL es 1,3,3-tetrametilbutilfenoxi(etoxi)$_8$etanol (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, producto IGEPAL CA-630, nº de cat. I 3021).

Ejemplo 2

**[0169]** Este ejemplo describe la producción de mutantes *erg9* mediante la mutagénesis química de *S. cerevisiae* cepa 64031 usando metanosulfonato de etilo (EMS). La cepa 64031(obtenida de la ATCC) es un mutante *erg9-1* que produce bajos niveles de farnesol (véase el Ejemplo 1), y la mutagénesis adicional producía mutantes que exhibían rendimientos mejorados de farnesol.

**[0170]** Se efectuó una curva de inactivación usando EMS, y se efectuó una mutagénesis de 64031 como se describe en el Ejemplo 1. Se efectuó también la selección como se describe en el Ejemplo 1.

**[0171]** Se encontró que un total de 163 cepas eran resistentes a nistatina, ts y auxótrofas de esterol. Se cultivaron en tubos y matraces agitados, y se determinó la producción de farnesol como se describe en el Ejemplo 1. Se presentan en la Tabla 9 las cantidades de farnesol producidas en los cultivos de matraz agitado.

**TABLA 9**

| Cepa | Farnesol (mg/ml) | | Farnesol (% de peso seco) | |
|---|---|---|---|---|
| | Célula | Medio | Extractos celulares | Extractos del medio |
| MBEMS8-1 | 0,038 | 0,019 | 1,7 | 0,8 |
| MBEMS8-2 | 0,048 | 0,008 | 3,6 | 0,6 |
| MBEMS8-5 | 0,013 | 0,022 | 0,5 | 1,0 |
| MBEMS8-6 | 0,045 | 0,016 | 5,6 | 2,0 |
| MBEMS8-11 | 0,024 | 0,003 | 2,0 | 0,2 |
| MBEMS8-12 | 0,043 | 0,006 | 6,9 | 1,0 |
| MBEMS8-16 | 0,026 | 0,001 | 3,5 | 0,2 |
| MBEMS8-18 | 0,040 | 0,009 | 1,4 | 0,3 |
| MBEMS8-19 | 0,023 | 0,003 | 2,8 | 0,4 |
| MBEMS8-21 | 0,021 | 0,009 | 1,5 | 0,7 |
| MBEMS8-23 | 0,025 | 0,008 | 2,9 | 0,9 |
| MBEMS8-25 | 0,018 | 0,007 | 1,3 | 0,5 |
| MBEMS8-26 | 0,028 | 0,011 | 3,7 | 1,5 |
| MBEMS8-27 | 0,035 | 0,010 | 5,5 | 1,5 |
| MBEMSB-31 | 0,020 | 0,011 | 1,1 | 0,6 |
| MBEMS8-32 | 0,016 | 0,009 | 0,5 | 0,3 |
| MBEMS8-33 | 0,000 | 0,000 | 0 | 0 |
| MBEMS8-34 | 0,000 | 0,000 | 0 | 0 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| MBEMS8-35 | 0,000 | 0,000 | 0 | 0 |
| ATCC64031 | 0,018 | 0,005 | 0,9 | 0,3 |
| ATCC28383 | 0,000 | 0,000 | 0 | 0 |

Ejemplo 3

**[0172]** En el Ejemplo 1.G. anterior, se describió la creación de un mutante *erg9Δ::HIS3* de MBNA1-13. En este ejemplo, se describe la construcción de otras cepas haploides de *S. cerevisiae* (no derivadas de MBNA1-13) que contienen un alelo de deleción/inserción de erg9::HIS3.

**[0173]** Se amplificó por PCR el gen *ERG9* usando ADN genómico aislado de la cepa S288C (según el procedimiento de Sherman y col.) como molde y los dos siguientes cebadores:

5' oligo = gag cat CCA CGG GCT ATA TAAA (SEQ ID NO:5); 250 BamUp

3' oligo = tcc ccc cg GGC GCA GAC TTC ACG CTC (SEQ ID NO:6); 1712 XmaLo

**[0174]** Se digirió con *BamHI* y *XmaI* ADN de *ERG9* amplificado por PCR, y se ligó entonces a pRS316 digerido con *BamHI, XmaI* (vector lanzadera de levadura/*E. coli*, Sikorski y Hieter, 1989). Las condiciones de PCR fueron:

| | |
|---|---|
| 94ºC durante 1 min- | 1 ciclo |
| 94ºC durante 30 s<br>58ºC durante 1 min<br>72ºC durante 1 min | 30 ciclos |
| 72ºC durante 2 min- | 1 ciclo |

**[0175]** El gen ERG9 clonado de esta manera se extiende desde la posición nº 11555 a la posición nº 13047 del nº de acceso a GenBank U00030, y el clon resultante se denominó pJMB98-12. La construcción de la deleción de *ERG9* y la inserción de ADN de *HIS3* se realizó como sigue:

Se obtuvo el gen *HIS3* mediante digestión del plásmido pRS403 que contiene *HIS3* (Stratagene, LaJolla, CA) con *Eco47III* y *SspI*, y purificación del fragmento de 1226 pb que contiene el gen *HIS3*.

**[0176]** Se digirió el plásmido pJMB98-12 con *Van91I* y se trató entonces con ADN polimerasa T4 para hacerlo de extremos romos. Se digirió adicionalmente el plásmido con *HpaI* de modo que se eliminara un fragmento interno de 589 pb en *ERG9*. Se ligó en este sitio el fragmento *Eco47111*, *SspI* de 1226 pb que contenía el gen *HIS3*. El plásmido resultante, pKML19-41, tiene el gen *HIS3* clonado en el gen *ERG9* eliminado, con la secuencia de codificación de *HIS3* en la misma orientación que la secuencia de codificación de *ERG9*.

**[0177]** Para transformar levadura con este ADN de *erg9Δ::HIS3*, se digirió el plásmido pKML19-41 con *SmaI* y *XbaI*, y se aisló el fragmento de 2141 pb que contenía el gen *erg9Δ::HIS3*. Se purificó el ADN de cortes de gel de agarosa usando GeneClean.

**[0178]** Se usaron aproximadamente 5 µg de ADN de *erg9Δ::HIS3* purificado para transformar la cepa diploide CJ3A X CJ3B (a/α, *ura3/ura3, his3/his3, leu2/leu2, trp1/trp1, upc2/upc2*, obtenida del Dr. L. Parks, "N.C. State University", Raleigh, NC) usando el procedimiento de transformación con acetato de litio descrito en Gietz, y col. (1995). CJ3A X CJ3B es homocigótico de la mutación *upc2*. Esta mutación permite la captación de esterol en condiciones aeróbicas (Lewis, y col., 1988). Se creía que la mutación *upc2* permitiría la fácil producción de una cepa haploide que portara una mutación en el gen *erg9*. La auxotrofia de histidina era necesaria para seleccionar las cepas que portan los plásmidos que contienen el gen *HIS3* funcional.

**[0179]** Se sembraron células transformadas en medio SCE (descrito en el Ejemplo 1.F.) carente de histidina (SC-His) para seleccionar los transformantes $HIS^+$.

**[0180]** Se obtuvieron cientos de transformantes. Se inocularon zonalmente entonces estas células $HIS^+$ sobre SC-HIS y se dejaron crecer durante dos días más. Se inocularon zonalmente entonces los transformantes sobre el medio de esporulación (Sherman, y col., 1986). El medio de esporulación contiene (por litro de agua destilada): 1% de acetato de potasio, 0,1% de extracto de levadura Bacto, 0,05% de dextrosa y 2% de agar Bacto. Se dejaron entonces crecer y esporular las zonas durante 3-5 días. Se retiró una porción de las células y se dispuso en una disolución de liticasa para digerir la pared celular del asca. Se extendieron entonces las células en una línea fina sobre una placa de YPD + ergosterol 2 mg/l (YPDE). Las células diploides esporuladas forman tétradas que contienen cuatro esporas, y se separaron las esporas individuales usando un micromanipulador. Estas esporas haploides individuales germinarán, conteniendo cada una una sola copia de los cromosomas.

**[0181]** Se esperaba una segregación 2:2 para inactivaciones génicas *erg9Δ::HIS3* en esta cepa. Dos esporas deberían ser viables en YPD, puesto que contendrían la copia del cromosoma que no se había perturbado (lo que significa que no necesitarían ergosterol puesto que tienen un gen ERG9 *funcional* y serían capaces de crecer en

YPD debido a que está presente histidina en el medio). Las otras dos esporas deberían crecer en SC-His + ergosterol 2 mg/l (SCE-His) puesto que, si el ADN de *erg9Δ::HIS3* se integraba en el sitio de *ERG9*, las células requerirían ergosterol, pero crecerían sin histidina.

**[0182]** Se analizaron tétradas de algunos de los transformantes pKML19-41 para la determinación fenotípica de la inactivación génica de *erg9*. Los resultados mostraron que solo dos de las cuatro esporas eran viables cuando se cultivaban aeróbicamente. Cuando se sembraron mediante réplica en YPD, estas dos esporas sobrevivieron, pero no sobrevivieron en SC-His o SCE-His. Esto indicaba una segregación 2:2 y que las dos esporas supervivientes eran de tipo original o auxotróficas de histidina. Esto indicaba que las dos que no sobrevivieron aeróbicamente contenían probablemente la inactivación génica *erg9:HIS3*.

**[0183]** El análisis de PCR confirmó los resultados de la inactivación génica *erg9Δ::HIS3* en varias de las cepas. Se aisló el ADN total usando un procedimiento de aislamiento de ADN rápido a partir de varios de los transformantes diploides que mostraron la segregación 2:2. Se usó entonces el ADN total como molde para la amplificación por PCR con cebadores complementarios de la secuencia 5' y 3' del gen *ERG9* en el cromosoma.

**[0184]** Los oligonucleótidos usados para este análisis fueron los siguientes:

5'-oligo= 250 Bam Up (descrito anteriormente)

3'-oligo= 3ERG9-1= gat ccg cg GCT CAA GCT AGC GGT ATT ATG CC (SEQ ID NO: 7)

3ERG9-1 contiene secuencias correspondientes al complemento inverso de las secuencias desde la posición nº 14812 a la posición nº 19790 de la secuencia de nº de acceso a GenBank U00030.

**[0185]** El oligonucleótido 250 Bam Up se encuentra en la secuencia del clon *ERG9* usado para construir el alelo *erg9Δ::HIS3*, mientras que el oligonucleótido *3ERG9-1* se encuentra en la dirección 3' del límite del ADN de *ERG9* clonado. Las secuencias de *ERG9* amplificadas a partir de ADN genómico por estos dos cebadores deben representar genes *ERG9* localizados en el locus cromosómico real de *ERG9*, y no amplificarán secuencias de *erg9Δ::HIS3* que se integren en otras localizaciones cromosómicas.

**[0186]** Los resultados mostraron dos bandas a 3,271 y 3,908 kb, indicando la presencia en las cepas diploides de una copia funcional del gen *ERG9* y una copia interrumpida que es 637 kb más grande debido a la inserción del gen *HIS3*.

**[0187]** Se efectuó también un análisis de transferencia Southern para verificar la interrupción de *erg9Δ::HIS3* en los diploides. Se comparó el ADN genómico de una cepa diploide original que porta dos copias normales del gen *ERG9* con tres transformantes diferentes que se cree que portan un gen *ERG9* normal y un gen *ERG9* perturbado. Se digirió el ADN con *AccI* o *XbaI*, se separó por electroforesis en gel, se transfirió a una membrana de Immobilon S y se sondeó con sondas específicas para examinar los genes *ERG9* presentes. La sonda en este caso era un fragmento de 1,4 kb que contenía una porción del gen *ERG9*.

**[0188]** Se preparó la sonda de ADN genómico usada para el análisis de transferencia Southern a partir del gen *ERG9* amplificado por PCR usando los oligonucleótidos 250 Bam Up y 1712 Xma Lo (descritos anteriormente). Se usó el plásmido pJMB98-12 como molde. Las condiciones de PCR fueron:

| | |
|---|---|
| 94ºC durante 1 min- | 1 ciclo |
| 94ºC durante 30 s<br>58ºC durante 1 min<br>72ºC durante 1 min | 30 ciclos |
| 72ºC durante 2 min- | 1 ciclo |

Se purificó el ADN de *ERG9* amplificado y se biotiniló, como se describe anteriormente. Se usó aproximadamente 1 µg de sonda biotinilada para hibridar con la transferencia.

**[0189]** La hibridación de la sonda con las bandas de ADN específico en condiciones rigurosas identificó que la secuencia complementaria estaba presente. Para el diploide original, CJ3AxCJ3B, ase observó una sola banda a 2,1 kb para la digestión con *AccI,* y se observó una sola banda a 2,8 kb con la digestión con *XbaI*. Las presuntas inactivaciones génicas *erg9Δ::HIS3* contenían cada una dos bandas: bandas a 2,1 kb y 1,3 kb para la digestión con *AccI* y bandas a 2,8 kb y 3,4 kb para la digestión con *XbaI*. Estos resultados indicaban la presencia de una copia del gen *ERG9* natural junto con una perturbación *erg9Δ::HIS3* en los diploides transformados.

**[0190]** Se hicieron entonces intentos por cultivar las células haploides anaeróbicamente en agar YPDE. Las cepas con bloqueo en la ruta del ergosterol pueden captar esteroles en condiciones anaeróbicas. Dos de las esporas crecieron rápidamente en condiciones anaeróbicas (*ERG9, his-*) y dos crecieron muy lentamente (*erg9Δ::HIS3*). Las esporas de tres de las cepas *erg9Δ::HIS3* (KML505, KML510 y KML521) que crecieron anaeróbicamente en placas se cultivaron en medio líquido en condiciones anaeróbicas y mostraron producción de farnesol. Tras la incubación aeróbica adicional de las placas de YPDE originales, parecía que crecían unas pocas de

las cepas haploides que se probaron positivas para la producción de farnesol con crecimiento anaeróbico. Tres de dichas esporas viables (derivadas de KML505) surgieron después de una incubación aeróbica prolongada. Estas cepas de crecimiento aeróbico, designadas como BKY1-2D, BKY1-7C y BKY1-8D, producían todas farnesol en condiciones aeróbicas.

**[0191]** Se esporuló la cepa original KML510 (a/α, *ura3/ura3, his3/his3, trp1/trp1, leu2/leu2, upc2/upc2, ERG9/erg9Δ::HIS3*) que contenía pJMB98-12 o pRS316 y se disecaron las tétradas sobre placas de YPDE. Se incubaron las placas en condiciones aeróbicas y se observaron los siguientes patrones de crecimiento de espora.

**[0192]** Se realizaron los análisis de tétrada de KML510/pJMB98-12 cpm con 20 tétradas. 16 tétradas dieron lugar a dos esporas viables de crecimiento rápido y dos esporas no viables. Todas las esporas viables eran $his^-$, $erg^+$. Tres tétradas dieron lugar a dos esporas viables de crecimiento rápido, una espora viable de crecimiento lento y una espora no viable. Las viables de crecimiento rápido eran todas $his^-$, $erg^+$. Las esporas viables de crecimiento lento eran todas $his^+$, $erg^-$. Una tétrada no dio lugar a ninguna espora viable. Todas las esporas $his^+$, $erg^-$ eran también $ura^-$, indicando que pJMB98-12 no segregaba en estas esporas durante la meiosis. Se usó una de estas esporas $his^+$, $erg^-$ para estudios adicionales, y se denominó BTY19-9C.

**[0193]** Se realizó el análisis de tétrada de KML510/pRS316 con 20 tétradas. 18 tétradas dieron lugar a dos esporas viables de crecimiento rápido y dos esporas no viables. Dos tétradas dieron lugar a dos esporas viables de crecimiento rápido, una espora viable de crecimiento lento y una espora no viable. Todas las esporas de crecimiento rápido eran $his^-$, $erg^+$. Todas las esporas de crecimiento lento eran $his^+$, $erg^-$. Todas las esporas $his^+$, $erg^-$ eran también $ura^-$, indicando que pRS316 no segregaba en estas esporas durante la meiosis. Se estudió adicionalmente una de las esporas $his^+$, $erg^-$, y se denominó BTY20-2A.

**[0194]** Para confirmar que BTY19-9C y BTY20-2A no portaban el gen *ERG9* natural, se realizó un experimento de PCR usando ADN genómico aislado de las dos cepas y los oligonucleótidos VE104-5 y VE105-3.

5'oligo = VE104-5 = gac tct AGA AGC GGA AAA CGT ATA CAC

3'oligo = VE105-3 = descrito anteriormente

VE104-5 contiene secuencias correspondientes a la posición nº 11631 a 116541 de la secuencia de nº de acceso a GenBank U00030.

**[0195]** El tamaño de producto de PCR predicho para un gen *ERG9* funcional era de 2,23 kb, y para la perturbación *erg9Δ::HIS3*, de 2,87 kb. Las cepas BTY19-9C y BTY20-2A tenían un producto de PCR de aproximadamente 2,87 kb, que indicaba la presencia de la perturbación *erg9Δ::HIS3*.

**[0196]** Se evaluó en cinco cepas (BKY1-2D, BKY1-7C, BKY1-8D, BTY19-9C y BTY20-2A) la producción de farnesol en matraces agitados. Las cepas BKY1-7C y BTY20-2A dieron la mejor producción de farnesol de las cinco cepas, pero BKY1-7C crecía muy lentamente.

**[0197]** Se transfirieron los transformantes KML505, KML510 y KML521 a medio de esporulación. Se disecaron tétradas sobre YPDE y se dejaron crecer durante periodos prolongados de tiempo en condiciones aeróbicas para buscar el crecimiento de esporas adicionales más allá de la segregación 2:2 anticipada (viable:no viable). Dos esporas adicionales fueron viables después de incubación adicional en condiciones aeróbicas. Estas dos cepas, BJY7-5D y BJY8-1A, producían farnesol en un cribado en tubo.

**[0198]** Se evaluaron las cepas BJY7-5D y BJY8-1A en matraces agitados. BJY8-1A dio la mejor producción de farnesol (0,29 mg/ml, 4,7% basado en el peso celular seco) después de 72 horas de incubación. BJY7-5D dio 0,18 mg de farnesol/ml, (3,5% basado en el peso celular seco).

Ejemplo 4

**[0199]** Este ejemplo muestra la sobreexpresión de HMG-CoA reductasa en cepas con y sin un gen *ERG9* funcional.

**[0200]** La HMG-CoA reductasa se ha propuesto que es la enzima clave que regula el flujo de carbono a través de la ruta de isoprenoides. En *S. cerevisiae*, dos genes, *HMG1* y *HMG2*, codifican las dos isozimas de la HMG-CoA reductasa, designadas HMGlp y HMG2p. Se consigue la regulación de la HMG-CoA reductasa mediante una combinación de regulación transcripcional y traduccional así como degradación de proteína. Los segmentos de los genes *HMG1* y *HMG2* que codifican los dominios catalíticos de las isozimas HMGlp y HMG2p se han clonado bajo el control transcripcional del promotor fuerte del gen GPD (3-fosfato de gliceraldehído deshidrogenasa). Se obtuvieron los plásmidos que contienen estas construcciones (pRH127-3 y pRH124-31, que contienen los dominios catalíticos de HMGlp y HMG2p, respectivamente) de R. Hampton, U.C. San Diego. Se ha notificado que las cepas de *S. cerevisiae* que sobreexpresan el dominio catalítico de HMGlp tienen un flujo elevado de carbono a través de la ruta de isoprenoides. Este flujo aumentado de carbono se manifestó como sobreproducción de escualeno y

ergosterol (Donald, K.A.G., Hampton, R.Y. y Fritz, I.B., 1997, "Effects of Overproduction of the Catalytic Domain of 3-Hydroxy-3Methylglutaryl Coenzyme A Reductase on Squalene Synthesis in Saccharomyces cerevisiae". Applied and Environmental Microbiology 63: 3341-3344).

A. Sobreexpresión de HMG-CoA reductasa en cepas con un gen *ERG9* funcional

**[0201]** Para confirmar que la sobreexpresión de HMG-CoA reductasa daría como resultado un flujo de carbono aumentado a través de la ruta de isoprenoides en las cepas derivadas de ATCC 28383, similar a otras cepas de *S. cerevisiae* (Donald, y col., 1997), se transformaron la cepa SWY5, un mutante *ura3* de la cepa original ATCC 28383 y SWE23-E9, la versión con *erg9* reparado de EMS9-23 (cepas descritas en el Ejemplo 1.G. anterior) con los plásmidos pRH127-3 y pRH124-31. Se efectuaron las transformaciones usando el procedimiento de LiOAc (Gietz, y col., 1995). Se construyeron también cepas de control que portaban el vector vacío YEp352. Se ensayó en los transformantes representativos la producción de escualeno y ergosterol en un experimento de matraz agitado. Se cultivaron las células en 50 ml de medio SCE-ura a 30ºC, con agitación a 180 rpm durante 48 horas. A las 24 horas, se extrajeron 10 ml del cultivo y se recogieron las células para ensayos de HMG-CoA reductasa como se describe en el Ejemplo 1.D. Al final del periodo de crecimiento de 48 horas, se usó una alícuota de los cultivos para inocular matraces que contenían 50 ml de medio YPD de tal modo que la $DO_{600}$ de partida de los cultivos fuera de 0,1. Se cultivaron los cultivos en medio YPD durante 72 horas a 30ºC con agitación a 180 rpm, y se analizaron después el peso celular seco y la acumulación de escualeno y ergosterol. El procedimiento de extracción usado para este análisis fue el siguiente. Se sedimentaron 10 ml de cultivo mediante centrifugación a 1.500 x g durante 10 minutos. Se resuspendió el sedimento celular en 1 ml de agua desionizada y se volvieron a sedimentar las células. Se resuspendieron los sedimentos celulares en 1 ml de agua desionizada y se disgregaron mediante agitación con perlas de silicato de circonio (0,5 mm de diámetro). Se saponificó la suspensión de células degradadas con 2,5 ml de una disolución de pirogalol al 0,2% (en metanol) y 1,25 ml de una disolución de hidróxido de potasio al 60% a 75ºC durante 1,5 horas. Se extrajeron entonces las muestras con 5 ml de hexano, se agitaron con vórtex durante 3 minutos y se centrifugaron a 1.000 x g durante 20 minutos para separar las fases. Se analizó entonces la capa de hexano mediante CG-EM como se describe en el Ejemplo 1.B.

**[0202]** Se muestran en la Tabla 10 los datos de este experimento. En comparación con las cepas de control que portan solo el vector Yep352, las cepas que sobreexpresan los dominios catalíticos de HMGlp o HMG2p contenían altos niveles de actividad HMG-CoA reductasa y elevados niveles de escualeno. Sin embargo, ninguna de las cepas que sobreexpresan HMG1p o HMG2p contenía niveles significativamente aumentados de ergosterol. No obstante, estos datos muestran que aumentar la actividad de la HMG-CoA reductasa en el linaje de la cepa MBNA1-13 aumenta el flujo de carbono a través de la ruta de isoprenoides.

**TABLA 10**

**Efecto de una actividad HMG-CoA reductasa amplificada sobre la producción de escualeno y ergosterol en cepas que tienen una ruta de isoprenoides normal**

| Cepa/plásmido | Peso celular seco (g/l) | Escualeno | | Ergosterol | | Actividad HMG-CoA reductasa (nmol/ min/mg) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | µg/ml | % de peso seco | µg/ml | % de peso seco | |
| SWY5/YEp352 | 7,68 | 0,18 | 0,003 | 2,9 | 0,038 | 2,4 |
| SWY5/pRH127-3 | 6,82 | 3,50 | 0,051 | 5,2 | 0,076 | 52 |
| SWY5/pRH124-31 | 7,49 | 4,15 | 0,055 | 2,9 | 0,039 | 27 |
| SWE23-E9/YEp352 | 6,96 | 0,33 | 0,005 | 5,5 | 0,079 | 2,7 |
| SWE23-E9/pRH127-3 | 6,89 | 6,78 | 0,099 | 8,3 | 0,121 | 55 |
| SWE23-E9/pRH124-31 | 6,90 | 4,90 | 0,071 | 6,1 | 0,088 | 29 |

B. Sobreexpresión de HMG-CoA reductasa en un mutante *erg9*

**[0203]** Habiendo mostrado que la amplificación de HMGlp o HMG2p aumentaba el flujo de carbono hasta escualeno, se ensayó si la sobreexpresión de *HMG1* o *HMG2* aumentaría la producción de farnesol en una cepa portadora de la mutación *erg9*. Se transformó la cepa SWE23-ΔE91 (descrita en el Ejemplo 1.G.) con los plásmidos pRH127-3 o pRH124-31. Se realizó la transformación de SWE23-ΔE91 usando el procedimiento de transformación con LiOAc (Gietz y col., 1996). Se usaron aproximadamente 2,5 µg de ADN de pRH127-3 o pRH124-31 en cada transformación. Se seleccionaron los transformantes en placas SCE-ura, se eligieron varias y se reinocularon por estrías para purificación en placas SCE-ura. Para ensayar el efecto de la HMG-CoA reductasa amplificada sobre la producción de farnesol, se cultivaron transformantes representativos durante 48 horas en medio SCE-ura líquido. Se incluyó también en el experimento una cepa de control, SWE23-ΔE91/YEp352. Al final del periodo de crecimiento de 48 horas, se usaron alícuotas de los cultivos para inocular matraces que contenían 50 ml de medio YPDE de tal modo que la $DO_{600}$ inicial fuera de 0,5. Se cultivaron estos cultivos durante 72 horas a 30ºC, con agitación a 180 rpm. Al final del periodo de incubación, se analizaron en las muestras el peso celular seco y la concentración de farnesol. Para confirmar que los genes de HMG-CoA reductasa se estaban sobreexpresando en los transformantes, se recogieron 20 ml de los cultivos cultivados en SCE-ura mediante centrifugación a 1500 x g durante 10 minutos y

se midió la actividad HMG-CoA reductasa usando el procedimiento de célula permeabilizada descrito en el ejemplo 1.D. Se muestran en la Tabla 11 los datos de este experimento.

**TABLA 11. Efecto de una actividad HMG-CoA reductasa elevada sobre la producción de farnesol en un mutante *erg9::-HIS3* cultivado en cultivos de matraz agitado.**

| Cepa/plásmido | Peso celular seco (g/l) | Farnesol | | Actividad HMG-CoA reductasa (nmol/min/mg) |
|---|---|---|---|---|
| SWE23-AE91/YEp352 | 3,31 | 222 | 6,7 | 7,5 |
| SWE23-AE91/pRH127-3 | 3,87 | 104 | 2,7 | 47,0 |
| SWE23-AE91/pRH124-31 | 3,48 | 104 | 3,0 | 36,0 |

**[0204]** En ambas SWE23-ΔE91/pRH127-3 y SWE23-ΔE91/pRH124-31, los niveles de actividad HMG-CoA reductasa eran elevados. Sin embargo, la producción de farnesol en estas cepas era menor que en la cepa de control SWE23-ΔE91/YEp352. Este resultado inesperado se observó varias veces en experimentos independientes.

**[0205]** A pesar de la incapacidad de la actividad HMG-CoA reductasa amplificada de aumentar la producción de farnesol en una cepa *erg9Δ::HIS3* cultivada en cultivos de matraz agitado, se ensayó en las cepas enumerados en la Tabla 12 la producción de farnesol en fermentadores de 1 l usando el protocolo descrito en el Ejemplo 1.H. En estas condiciones, se observó el resultado esperado: las cepas que sobreexpresan HMG-CoA reductasa producían significativamente más farnesol que la cepa de control. Los datos se resumen en la Figura 6 y la Tabla 12. La elevación de la actividad HMG-CoA reductasa en las cepas SWE23-ΔE91/pRH127-3 y SWE23-ΔE91 /pRH124-31 se confirmó mediante ensayo enzimático directo usando el procedimiento de célula permeabilizada. Esto se ilustra mediante las actividades reductasa en puntos temporales específicos durante la fermentación (mostrado en la Tabla 12).

**TABLA 12. Efecto de una actividad HMG-CoA reductasa elevada sobre la producción de farnesol en un mutante *erg9Δ::HIS3* cultivado en fermentadores de 1 l**

| Cepa/plásmido | Tiempo (h) | Peso celular seco (g/l) | Farnesol | | Actividad HMG-CoA reductasa (nmol/min/mg) |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | g/l | % de peso celular seco | |
| SWE23-ΔE91/ YEp352 | 239 | 37,2 | 2,23 | 6,0 | 4,1 |
| SWE23-ΔE91/ pRH127-3 | 310 | 35,0 | 3,06 | 8,7 | 20 |
| SWE23-ΔE91/ pRH124-31 | 261 | 31,7 | 3,05 | 9,6 | 14 |

Ejemplo 5

**[0206]** Este ejemplo describe la sobreexpresión de diversas GGPP sintasas en mutantes *erg9*.

**[0207]** Para convertir el FPP producido en cepas mutantes *erg9* en GGPP (el precursor del producto deseado, GG), se sobreexpresaron los genes que codifican diversas GGPP sintasas en mutantes *erg9*. Los genes clonados con este fin fueron el gen *BTS1* de *Saccharomyces cerevisiae*, el gen *crtE* de *Erwinia uredovora*, el gen *a1-3* de *Neurospora crassa* y el gen *ggs* de *Gibberella fujikuroi*. Se construyeron plásmidos que portan estos genes como sigue.

**[0208]** Para clonar el gen *BTSI1*, se preparó ADN genómico a partir de *S. cerevisiae* cepa S288C según el procedimiento descrito en Sherman y col. (1986). Se amplificó el gen mediante PCR usando los dos siguientes oligonucleótidos.

5'oligo = VE100-5 gactctAGAGTTTACGAGTCTGGAAAATC (SEQ ID NO:8)

3'oligo = VE101-3 gtaggATCCATGGAATTGAGCAATAGAG (SEQ ID NO:9)

Las condiciones de PCR fueron: 94ºC, 3 minutos; 94ºC, 1 minuto; 52ºC, 1 minuto; 74ºC, 1,5 minutos; 30 ciclos; y entonces 74ºC, 7 minutos (1 ciclo). Se digirió el producto de PCR con *XbaI* y *BamHI* y se ligó en pPGK315 digerido con *Xbal, BamHI* generando pTWM101. El plásmido pPGK315 contiene el promotor y terminador PGK de *S. cerevisiae* separados por un sitio de clonación múltiple. La clonación del gen *BST1* en pPGK315 como se describe anteriormente dispuso el gen *BTS1* bajo el control del promotor PGK fuerte. Se construyó el plásmido pPGK315 digiriendo el plásmido pRS315 con *SacII* y *SmaI*, y tratando entonces con ADN polimerasa T4 para crear extremos romos. Se religó el plásmido para generar pRS315-DSS. Se digirió entonces el plásmido pRS315DSS con *XhoI* y se ligó con un fragmento *SalI*, *XhoI* de 994 pb obtenido a partir del plásmido pPGKMCS que contenía el promotor y terminador PGK separados por un sitio de clonación múltiple. Se construyó el plásmido pPGKMCS digiriendo pPGK (Kang y col., 1990, Mol. Cell. Biol., 10: 2582) con *EcoRI* y *BamHI*, y ligando entonces con los dos siguientes oligonucleótidos asociados.

5'oligo = AATTCCAAGCTTGCGGCCGCTCTAGAACGCGTG (SEQ ID NO:10)

3'oligo = GATCCACGCGTTCTAGAGCGGCCGCAAGCTTG (SEQ ID NO:11)

Se construyó el plásmido pTWM110-11 ligando un fragmento *KpnI-SalI* de 2397 pb que contenía el promotor PGK/*BTS1*/terminador PGK (obtenido mediante digestión de PTWM110 con *KpnI* y *SalI*) en YEp352 digerido con

*KpnI-SalI*.

**[0209]** Para clonar el gen *crtE*, se aisló ADN genómico de *E. uredovora* cepa 2OD3 usando el kit de aislamiento de ADN genómico PureGene (Gentra Systems, Inc., Minneapolis, MN). Se amplificó el gen *crtE* usando ADN genómico y los dos siguientes oligonucleótidos.

5'oligo = 20D3Up gaattcGTTTATAAGGACAGCCCGA (SEQ ID NO:12)

3'oligo = 20D3Lo ctgcagTCCTTAACTGACGGCAGCGA (SEQ ID NO:13)

El oligo 20D3Up contiene las secuencias correspondientes a la posición nº 206 a la nº 224 de la secuencia de acceso a GenBank nº D90087. El oligo 20D3Lo contiene el complemento inverso de las secuencias de la posición nº 1117 a la nº 1136 del mismo fichero de secuencia de Genbank. Se ligó el ADN amplificado en el sitio *SrfI* de pCR-Script SK(+) (Stratagene, La Jolla, CA) generando el plásmido pSW1-B. Se digirió entonces este plásmido con *EcoRI* y *SacI*, se purificó el fragmento de 973 pb que contenía el gen *crtE* y se ligó con pAD314-956 digerido con *EcoRI-SacI* generando el plásmido pSW2B. Se digirió el plásmido pSW2-B con *BamHI* generando un fragmento de 2199 pb que contiene el promotor *ADH1*, la secuencia de codificación de *crtE* y el terminador *ADH1*, y se ligó este fragmento en YEp352 digerido con *BamHI* generando pSW4A, que dispuso el gen *crtE* en la orientación opuesta a la del gen *URA3* en el plásmido, y pSW4B, que dispuso el gen *crtE* en la misma orientación que el gen *URA3*.

**[0210]** Se generó el plásmido pADH313-956 de la siguiente manera. Se digirió el plásmido pRS313 (Sikorski y Hieter, 1989) con *SacI* y *XbaI*, se trató con ADN polimerasa T4 para crear extremos romos y se religó entonces generando el plásmido pDSX313. Se digirió este plásmido con *SmaI* y *ApaI*, se trató con ADN polimerasa T4 creando extremos romos y se religó entonces generando pDSXSA313. El plásmido pAAH5 (Ammerer, G., 1983, Meth. Enzymol. 101: 192-201), que porta el promotor y terminador *ADH1* separados por un sitio *HindIII*, se digirió con *HindIII* y se ligó entonces con los dos siguientes oligonucleótidos asociados para introducir un sitio de clonación múltiple y crear pAAH5-MCS.

5' oligo =MCS1 AGCTGAATTCGAGCTCGGTACCCGGGCTCTAGAGTC GACCTGCAGGCATGCA (SEQ ID NO:14)

3' oligo = MCS2 AGCTTGCATGCCTCCAGGTCGACTCTAGAGCC CG GGTACCGAGCTCGAATTC (SEQ ID NO:15)

**[0211]** Se efectuó una reacción de PCR que contenía pADH313-MCS como molde y los dos siguientes oligonucleótidos, y se obtuvo un producto de PCR de 1231 pb que contenía el promotor *ADH1*, el sitio de clonación múltiple y el terminador *ADH1*.

5' oligo = ADH1A gacggatCCGTGGAATATTTCGGATATCC (SEQ ID NO:16)

3' oligo = ADH1B ctcggatccGGACGGATTACAACAGGTATTGTCC (SEQ ID NO:17)

**[0212]** El oligo ADH1A contiene las secuencias correspondientes a la posición nº 16 a la nº 37 de la secuencia de nº de acceso a Genbank V01292. El oligo ADH1B contiene el complemento inverso de las secuencias de la posición nº 2092 a la nº 2116 del mismo fichero de secuencia de Genbank. Se digirió el producto de PCR de 1232 pb con *BamHI* y se ligó con pDSXSA313 digerido con *BamHI*, generando el plásmido pADH313-956.

**[0213]** Para clonar el gen *a1-3* de *N. crassa*, se aisló ADN genómico de *N. crassa* cepa ATCC 14692 usando el procedimiento descrito por Borges y col. en la sección de procedimientos del sitio web del "Fungal Genetics Stock Center" (www.kumc.edu/research/fgsc/fgn37/borges.html). Se amplificó el gen mediante PCR usando los dos siguientes oligonucleótidos.

5' oligo = VE118-5 cagaatTCACCATGGCCGTGACTTCCTCCTC (SEQ ID NO:18)

3' oligo = VE119-3 caagatctCATACATTCAATCCTCATGGACAC (SEQ ID NO:19)

**[0214]** El oligo VE118-5 contiene las secuencias correspondientes a la posición nº 1216 a la nº 1240 de la secuencia de nº de acceso a Genbank U20940. El oligo VE119-3 contiene el complemento inverso de las secuencias de la posición nº 2576 a la nº 2599 del mismo fichero de secuencia de Genbank. Se ligó el ADN amplificado en el sitio *SrfI* de pCR-Script SK(+) (Stratagene, La Jolla, CA) generando pSW7-1 y pSW7-2, dos clones de PCR independientes del gen *a1-3*. Se digirieron entonces estos dos plásmidos con *EcoRI* y *BglII*, se purificó el fragmento de 1393 pb que contiene el gen *a1-3* y se ligó en pPGK digerido con *EcoRI*, *BamHI* (Kang y col., 1990) generando pSW9-1 y pSW9-2, con la secuencia *al-3* en cada uno derivada de pSW7-1 y pSW7-2, respectivamente.

**[0215]** Para clonar el gen *ggs*, se preparó ADN genómico a partir de *Gibberella fujikuoi* cepa ATCC 12617, usando el mismo procedimiento descrito anteriormente para *Neurospora*. Se amplificó el gen *ggs* mediante PCR usando los dos siguientes oligonucleótidos.

5' oligo = VE120-5 gagaattCTTAACACGCATGATCCCCACGGC (SEQ ID NO:20)

3' oligo = VE121-3 ctggatcCGTCAAATCCGTGAATCGTAACGAG (SEQ ID NO:21)

**[0216]** El oligo VE120-5 contiene las secuencias correspondientes a la posición nº 607 a la nº 630 de la secuencia de acceso a Genbank VX96943. El oligo VE121-3 contiene el complemento inverso de las secuencias de la posición nº 1908 a la nº 1932 del mismo fichero de secuencia de Genbank. Se ligó el ADN amplificado en el sitio

*SrfI* de pCR-Script SK(+) generando pSW8-1 y pSW8-2, dos clones de PCR independientes del gen *ggs*. Se digirieron entonces estos dos plásmidos con *EcoRI* y *BamHI*, se purificó el fragmento de 1335 pb que contenía el gen *ggs* y se ligó en pPGK digerido con *EcoRI, BamHI* generando pSW10-1 y pSW10-2, con la secuencia *ggs* en cada uno derivada de pSW8-1 y pSW8-2, respectivamente.

**[0217]** Se transformó la cepa EMS9-23 (*ura3, erg9*, descrita en el Ejemplo 1.G.) con los plásmidos descritos anteriormente usando el procedimiento de LiOAc, y se seleccionaron los transformantes en placas SCE-ura. Se recogieron los transformantes y se reinocularon por estrías en placas SCE-ura para purificación. Se ensayó en transformantes representativos la producción de GG. Se cultivaron las células a 30ºC durante 48 horas en medio SCE-ura líquido, y se usaron entonces para inocular matraces que contenían medio YPDE, de tal modo que la $DO_{600}$ inicial fuera de 0,5. Se incubaron estos cultivos a 30ºC con agitación durante 72 horas y se analizaron el peso celular seco y los niveles de farnesol y GG. Se inoculó también un segundo conjunto de matraces que contenían 20 ml de medio SCE-ura a partir de los mismos cultivos de partida y se cultivó durante 48 horas. Se recogieron las células de estos matraces, se lavaron con 10 ml de tampón bistrispropano 50 mM, pH 7,0, y se resedimentaron. Se usaron entonces los sedimentos celulares para preparar suspensiones celulares permeabilizadas para ensayos de GGPP sintasa. Se permeabilizaron las células resuspendiendo en 1 ml de tampón bistrispropano 50 mM, pH 7,0, que contenía 0,1% de Triton X100, y se congeló a -80ºC hasta que fuera necesario. Después de descongelar, se usaron las células permeabilizadas para ensayos de GGPP sintasa. La mezcla de ensayo de GGPP sintasa contenía tampón bistrispropano 0,05 M, pH 7.0 (X µl), ditiotreitol 0,1 M (1 µl), FPP 1 mg/ml (5 µl), IPP 1 mg/ml (5 µl) y células permeabilizadas (Y µl), en que X + Y = 87 µl. Se incluyó una reacción de control en que se omitieron FPP e IPP. Se incubaron las mezclas de ensayo a 37ºC durante 20 minutos. Se añadieron 0,1 ml de tampón de glicina 2X (glicina 0,2 M, $MgCl_2$ 2 mM, $ZnCl_2$ 2 mM, pH 10,4) y 63 unidades de fosfatasa alcalina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) y se incubaron las mezclas durante 60 minutos a 37ºC. Se extrajeron entonces las mezclas con 0,2 ml de hexano:acetato de etilo 1:1 y se analizó el GG por CG/EM. La actividad GGPP sintasa se expresa como nmol de GGPP formados/min/mg de proteína.

**[0218]** Se resumen los pesos celulares secos, producción de farnesol, producción de GG y actividades GGPP sintasa para las cepas en la Tabla 13. La cepa de control, EMS923/YEp352, que carece de una GGPP sintasa clonada, producía un 8,7% de farnesol (basado en el peso celular seco) y esencialmente nada de GG. Las otras 4 cepas, cada una de las cuales sobreexpresaba una GGPP sintasa clonada diferente, producían aproximadamente la misma cantidad de farnesol que el control (8,0-9,74%) y producían niveles de GG en el intervalo de 0,62-1,73%.

**TABLA 13. Producción de GG en cultivos de matraz agitado de cepas que sobreexpresan cuatro genes de GGPP sintasa clonados diferentes**

| Cepa | Clon del gen de GGPP sintasa | Peso celular seco (g/l) | FOH (% del peso celular seco) | GC (% del peso celular seco) | Actividad GGPP sintasa (nmol/ min/mg) |
|---|---|---|---|---|---|
| EMS9-23/ YEp352 | - | 3,38 | 8,7 | 0,01 | ND |
| EMS9-23/ pTWM110-11 | *BTS1* | 3,12 | 8,98 | 1,73 | 0,065 |
| EMS9-23/ pSW4B | *crtE* | 2,02 | 9,74 | 1,68 | 0,094 |
| EMS9-23/ pSW9-1 | *al3* | 3,38 | 8,0 | 0,62 | 0,032 |
| EMS9-23/ pSW10-2 | *ggs* | 3,16 | 9,3 | 1,0 | 0,03 |

**[0219]** Se evaluó adicionalmente el efecto de la amplificación de la actividad GGPP sintasa sobre la producción de GG en fermentadores de 1 l. Se transformó la cepa EMS9-23 con el plásmido pTWMI10-11, que porta el gen *BST1* clonado de *S. cerevisiae*. Se transformó la cepa SWE23-ΔE91 (descrita en el Ejemplo 1.G. anterior) con Yep352 (control de vector) o pSW4A-3 (un aislamiento individual del plásmido pSW4A que porta el gen *crtE* clonado). Se cultivaron las cepas SWE23-ΔE91/YEp352, EMS9-23/pTWM110-11 y SWE23-ΔE91/pSW4A-3 en fermentadores de 1 l usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 1.H., y se compararon crecimiento, producción de farnesol y producción de GG.

**[0220]** Se muestran los resultados en la Figura 7 y la Tabla 14. El crecimiento de las tres cepas era similar. La cepa SWE23-ΔE91/YEp352 producía 2,32 g/l de farnesol en 236 horas, y no producía GG detectable. La EMS9-23/pTWM110-11 producía 2,1 g/l de farnesol en 239 horas y producía también 0,42 g/l de GG en el mismo periodo de tiempo. La cepa SWE23-ΔE91/pSW4A-3 producía 2,47 g/l de farnesol en 236 horas y producía también 0,59 g/l de GG en el mismo periodo. La actividad GGPP sintasa en la cepa de control estaba por debajo de los límites detectables. La producción de GG por las cepas EMS9-23/pTWM110-11 y SWE23-ΔE91/pSW4A-3 se correlacionaba con la actividad de GGPP sintasa aumentada.

**TABLA 14. Crecimiento, producción de farnesol y GG en cepas que sobreexpresan GGP sintasas y**

**cultivadas en fermentadores de 1 l**

| Cepa/ plásmido | Tiempo (h) | Peso celular seco (g/l) | Farnesol | | GG | | Actividad GGPP sintasa (nmol/ min/mg) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | g/l | % en peso celular seco | g/l | % en peso celular seco | |
| SWE23-ΔE91/ YEp352 | 236 | 43,9 | 2,32 | 5,3 | 0 | 0 | No detectada |
| EMS9-23/ pTWM110-11 | 239 | 41,9 | 2,10 | 5,0 | 0,42 | 1,0 | 0,2 |
| SWE23-ΔE91/ pSW4A-3 | 236 | 43,5 | 2,47 | 5,7 | 0,59 | 1,4 | 1,1 |

Ejemplo 6

**[0221]** Este ejemplo ilustra el efecto de la sobreexpresión del gen *ERG20* que codifica la FPP sintasa.

**[0222]** Para determinar los efectos de elevar los niveles de FPP sintasa en mutantes *erg9*, se clonó para sobreexpresión el gen *ERG20* que codifica la FPP sintasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Se amplificó el gen *ERG20* mediante PCR usando ADN genómico de *S. cerevisiae* cepa S288C (preparado según el procedimiento descrito en Sherman y col., 1986) y los dos siguientes oligonucleótidos.

5' oligo = BamFPPUp ggccggatccATATTACGTAGAAATGGCTTCAG (SEQ ID NO:22)

3' oligo = XhoFPPLo gccgctcgagGGTCCTTATCTAGTTTG (SEQ ID NO:23)

**[0223]** El oligo BamFPPUp contiene las secuencias correspondientes a la posición nº 790 a la nº 810 de la secuencia de acceso a Genbank nº J05091. El oligo XhoFPPLo contiene el complemento inverso de las secuencias de la posición nº 1891 a la nº 1907 del mismo fichero de secuencia de Genbank. Se digirió el producto de PCR con *BamHI* y *XhoI* y se ligó con un vector que contenía el promotor GPD de *S. cerevisiae* (3-fosfato de gliceraldehído deshidrogenasa) y el terminador PGK. Se obtuvo el vector con promotor/terminador digiriendo un plásmido que contenía el dominio catalítico del gen *HMG2* de *S. cerevisiae* clonado entre el promotor GPD y el terminador PGK, a saber pRH124-31 (descrito en el Ejemplo 4), con *BamHI* y *SalI* para retirar el ADN de *HMG2*. Se purificó la banda de 6,3 kb correspondiente al vector con promotor/terminador y se ligó con el fragmento de 1129 pb que contenía *ERG20*, generando pJMB1931 y pJMB19-32. Se usaron los plásmidos pJMB19-31 y pJMB19-32 para transformar la cepa SWE23-ΔE91 (*ura3, his3, erg9Δ::HIS3*) usando el procedimiento de LiOAc, y se seleccionaron transformantes en placas SCE-ura. Se recogieron los transformantes y se reinocularon por estrías en placas SCE-ura para purificación.

**[0224]** Para determinar los efectos de la sobreexpresión de FPP sintasa en cepas mutantes *erg9*, se cultivaron transformantes representativos construidos como se describe anteriormente en cultivos de matraz agitado y se compararon crecimiento, producción de farnesol, producción de GG y actividades FPP sintasa y GGPP sintasa. Se cultivaron las cepas con agitación a 30ºC durante 48 horas en medio SCE-ura líquido, y se usaron entonces para inocular matraces que contenían medio YPDE, de tal modo que la $DO_{600}$ inicial fuera de 0,5. Se incubaron estos cultivos a 30ºC con agitación durante 72 horas adicionales y se analizaron el peso celular seco y los niveles de farnesol y GG. Se inoculó también un segundo conjunto de matraces que contenían 20 ml de medio SCE-ura de los mismos cultivos de partida y se cultivó durante 48 horas. Se recogieron las células de estos matraces, se lavaron con 10 ml de tampón bistrispropano 50 mM, pH 7,0, y se resedimentaron. Se usaron entonces los sedimentos celulares para preparar suspensiones de células permeabilizadas para ensayos de FPP y GGPP sintasa. Se permeabilizaron las células mediante resuspensión en 1 ml de tampón bistrispropano 50 mM, pH 7,0, que contenía un 0,1% de Triton X100, y se congelaron a -80ºC hasta que fue necesario. Después de descongelar, se usaron las células permeabilizadas para ensayos. La mezcla de ensayo de GGPP sintasa era la misma que se describe en el Ejemplo 5. La mezcla de ensayo de FPP sintasa contenía tampón bistrispropano 0,05 M, pH 7,0 (X µl), ditiotreitol 0,1 M (1 µl), $MgCl_2$ 0,5 M (2 µl), IPP 1 mg/ml (6 µl), difosfato de geranilo (GPP) 1 mg/ml (6 µl) y células permeabilizadas (Y µl), en que X + Y = 85 µl. Se incluyó una reacción de control en que se omitieron IPP y GPP. Se incubaron las mezclas de ensayo a 37ºC durante 15 minutos. Se añadieron 0,1 ml de tampón de glicina 2x (glicina 0,2 M, $MgCl_2$ 2 mM, $ZnCl_2$ 2 mM, pH 10,4) y 63 unidades de fosfatasa alcalina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), y se incubaron las mezclas durante 60 minutos a 37ºC. Se extrajeron entonces las mezclas con 0,2 ml de hexano:acetato de etilo 1:1 y se analizó el farnesol por CG/EM. La actividad FPP sintasa se expresa como nmol de FPP formados/min/mg de proteína.

**[0225]** Los datos presentados en la Tabla 15 muestran que la sobreexpresión de FPP sintasa no aumentaba la producción de farnesol sino que, inesperadamente, aumenta la producción de GG en estos cultivos en matraz agitado. El nivel de GG producido por SWE23-ΔE91/pJMB19-31 o SWE23-ΔE91/pJMB19-32 era incluso mayor que el observado para la cepa (EMS923/pTWM110-11) que sobreexpresa el gen *BTS1* de *S. cerevisiae* (GGPP sintasa).

**TABLA 15. Producción de GG en mutantes *erg9* que sobreexpresan FPP sintasa y GGPP sintasa**

| Cepa/ plásmido | Gen clonado (enzima codificada) | Peso celular seco (g/l) | FOH (% de peso celular seco) | GG (% de peso celular seco) | Actividad FPP sintasa (nmol/ min/mg) | Actividad GGPP sintasa (nmol/ min/mg) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| EMS9-23/ YEp352 | - | 3,32 | 9,24 | 0,17 | 2,3 | No detectada |
| EMS9-23/ pTWM110-11 | *BTS1* (GGPP sintasa) | 3,12 | 8,98 | 1,73 | No ensayado | 0,19 |
| SWE23-ΔE-91/pJMB19-31 | *ERG20* (FPP sintasa) | 3,11 | 7,85 | 2,28 | 53,0 | No ensayada |
| SWE23-ΔE-91/pJMB19-32 | *ERG20* (FPP sintasa) | 3,28 | 8,08 | 2,29 | 51,0 | No ensayada |

**[0226]** Se evaluó adicionalmente el efecto de la amplificación de la actividad FPP sintasa sobre la producción de GG en fermentadores de 1 l. Se cultivaron las cepas SWE23-ΔE91/YEp352 (control), EMS9-23/pSW4A3 (*crtE*, GGPP sintasa) y SWE23-ΔE91/pJMB19-32 (*ERG20*, FPP sintasa) en fermentadores de 1 l usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 1.H., y se compararon crecimiento, producción de farnesol, producción de GG y actividad GGPP sintasa (Figura 8 y Tabla 16). El crecimiento de las tres cepas era similar, aunque SWE23-ΔE91/pJMB19-32 se quedaba atrás antes de crecer a una velocidad similar a las demás cepas. La cepa SWE23-ΔE91/YEp352 producía 2,31 g/l de farnesol en 258 horas, y no producía GG detectable. La EMS9-23/pSW4A3 producía farnesol 2,52 g/l y GG 0,57 g/l en 258 horas. La cepa SWE23-ΔE91/pJMB19-32 producía farnesol 1,95 g/l en 258 horas y producía también GG 0,59 g/l en el mismo periodo. La producción de GG inesperada por SWE23-ΔE91/pJMB19-32 se correlacionaba con la actividad GGPP sintasa aumentada en esta cepa (véase a continuación).

**[0227]** No se detectó actividad GGPP sintasa en la cepa de control SWE23-ΔE91/YEp352. La cepa EMS9-23/pSW4A3, que expresa el gen *crtE* de *E. uredovora* (GGPP sintasa) mostraba una actividad GGPP sintasa relativamente alta (1,7 nmol/min/mg en células del punto temporal de 258 h). Como se esperaba, la cepa SWE23-ΔE91/pJMB19-32, que sobreexpresa FPP sintasa de *S. cerevisiae*, contenía FPP sintasa que estaba elevada más de 10 veces en todos los puntos temporales a lo largo de la fermentación, en comparación con un control que tiene solo niveles normales de FPP sintasa (datos no mostrados). Sorprendentemente, sin embargo, la cepa SWE23-ΔE91/pJMB19-32 tenía también una actividad GGPP sintasa elevada (Tabla 16). Esta actividad indudablemente da cuenta de la inesperada producción de GG por esta cepa.

**[0228]** La elevada actividad GGPP sintasa detectada en la cepa SWE23-ΔE91/pJMB19-32 podría ser el resultado de la sobreexpresión de FPP sintasa que induce la actividad GGPP sintasa (el producto del gen *BTS1*). Sin embargo, es también posible que la FPP sintasa tenga un bajo nivel de actividad GGPP sintasa que se revela en esta cepa debido al alto grado de sobreproducción de FPP sintasa.

**TABLA 16. Efecto de la FPP sintasa amplificada sobre el crecimiento, la producción de farnesol y GG de cepas cultivadas en fermentadores de 1 l**

| Cepa/plásmido | Tiempo (h) | Peso celular seco (g/l) | Farnesol | | GG | | Actividad GGPP sintasa (nmol/ min/mg) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | g/l | % de peso celular seco | g/l | % de peso celular seco | |
| SWF23-ΔE91/ Yep352 | 258 | 42,2 | 2,31 | 5,5 | 0 | 0 | No detectada |
| EMS9-23/ pSW4A3 | 258 | 44,3 | 2,52 | 5,3 | 0,57 | 1,28 | 1,7 |
| SWE23-ΔE91/ pJMB19-32 | 258 | 41,1 | 1,95 | 4,7 | 0,55 | 1,34 | 1,0 |

Ejemplo 7

**[0229]** Este ejemplo evalúa varios procedimientos de extracción de farnesol.

**[0230]** En el primer experimento, se hizo una comparación entre la extracción del caldo completo (células más medio) y extracciones separadas del sedimento celular y el medio en diversas condiciones para MBNA1-13 (productos de farnesol) y ATCC 28383 (productor de ergosterol) (véase el Ejemplo 1). Se extrajo una muestra de 10 ml de cultivo en general como se describe en el Ejemplo 1, pero con los cambios indicados en la Tabla 17 a continuación. El procedimiento 1 en la Tabla 17 es el mismo que el procedimiento de extracción descrito en el Ejemplo 1. Se encontró que, para la extracción de farnesol, la extracción del caldo completo era tan eficaz como la extracción separada de célula y medio para los procedimientos 1, 2, 3, 5 y 7. Se extrajo más farnesol mediante el procedimiento 5, que es simplemente la adición de 2 ml de pirogalol al 0,2% en metanol antes de extraer el caldo

completo con hexano. La segunda mayor extracción fue el procedimiento 1.

**TABLA 17**

| Procedimiento de extracción | Pirogalol al 0,2% en MeOH | KOH al 60% en $H_2Od$ | Incubación a 75ºC, 1,5 h | Hexano |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 2 ml | 1 ml | Sí | 5 ml |
| 2 | 2 ml | 1 ml | No | 5 ml |
| 3 | 2 ml | 0 | Sí | 5 ml |
| 4 | 0 | 1 ml | Sí | 5 ml |
| 5 | 2 ml | 0 | No | 5 ml |
| 6 | 0 | 1 ml | No | 5 ml |
| 7 | 0 | 0 | No | 5 ml |

**[0231]** A continuación, se realizaron experimentos para determinar los efectos del tipo de disolvente de extracción (procedimiento 1, caldo completo), los tiempos usados para extracción (procedimiento 1, extracción con hexano, caldo completo) y la cantidad de metanol añadida antes de la extracción (procedimiento 1, extracción con hexano, caldo completo). Los resultados se presentan en las Tablas 17-19 siguientes

**TABLA 17**

| Disolvente | Farnesol (ng) |
|---|---|
| Hexano | 3273 |
| Cloroformo | 2262 |
| Acetato de etilo | 3549 |
| N-Heptano | 3560 |
| Hexadecano | No determinado* |
| Dodecano | 3529 |
| Tolueno | 1055 |
| Tetracloruro de carbono | 2023 |
| Alcohol isobutílico | 2892 |
| 1-Octanol | 1814 |
| *El pico de disolvente coeluyó con el de farnesol, haciendo imposible la cuantificación del farnesol usando este procedimiento | |

**TABLA 18**

| Tiempo de vórtex (min) | Farnesol (ng) |
|---|---|
| 0 | 204 |
| 0,25 | 2794 |
| 0,5 | 2691 |
| 1,0 | 2894 |
| 1,5 | 3302 |
| 2,0 | 3348 |
| 2,5 | 3357 |
| 3,0 | 3545 |
| 3,5 | 3535 |

**TABLA 19**

| Volumen de metanol (ml) | Farnesol (ng) |
|---|---|
| 0 | 3440 |
| 0,2 | 2820 |
| 0,4 | 3000 |
| 0,6 | 3440 |
| 0,8 | 3690 |
| 1,0 | 3730 |
| 1,2 | 4580 |
| 1,4 | 4350 |
| 1,6 | 4020 |
| 1,8 | 3880 |

**[0232]** Se realizó un trabajo adicional para optimizar y simplificar el procedimiento de extracción de farnesol, y para adaptar el procedimiento a la extracción de GG a partir de caldos de fermentación. Este trabajo dio como resultado el protocolo de extracción final descrito a continuación.

1. Se usa el caldo de fermentación completo no diluido o diluido apropiadamente con agua hasta un volumen final de 2,0 ml en un tubo de ensayo de vidrio tapado con teflón de 15 ml.
2. Se añaden 2,0 ml de hexano.
3. Se añaden 2,0 ml de metanol.
4. Se agita con vórtex el tubo a alta velocidad durante 3,5 minutos.
5. Se centrifuga la muestra a 2.800 rpm en una centrífuga de mesa durante 25-30 minutos para separar las fases.
6. Se retira el sobrenadante (fase orgánica) y se dispone en un vial de CG/EM de vidrio tapado con teflón de 2,0 ml para la determinación de farnesol y GG por CG/EM.

Ejemplo 8

**[0233]** El siguiente ejemplo demuestra el efecto de la amplificación de HMG-CoA reductasa sobre la producción de GG por una cepa que sobreexpresa GGPP sintasa.

**[0234]** En este experimento, se construyó una cepa que contenía una sola copia de un plásmido integrado en su genoma que permita a las células sobreexpresar la GGPP sintasa. El plásmido integrante es conocido como pSW35-42, y se construyó como sigue. Se digirió el plásmido pSW4A (véase el Ejemplo 5) con *BamHI* generando un fragmento de 2199 pb que contenía una fusión del promotor *ADH1*, la secuencia de codificación de *crtE* y el terminador *ADH1*. Se ligó entonces este fragmento en YIp351 digerido con *BamHI* (Hill y col., 1986, "Yeast/E. coli Shuttle Vectors with Multiple Unique Restriction Sites", YEAST 2:163-167) generando pSW35-42.

**[0235]** Para construir una cepa que contiene pSW35-42, se digirió este plásmido con la endonucleasa de restricción *BstEII* para introducir un solo corte en el gen *LEU2*. Se purificó el plásmido linealizado y se usó para transformar la cepa SWE23-DL1 usando el procedimiento de LiOAc. Se seleccionaron los transformantes en que pSW35-42 se había integrado en el locus *LEU2* en medio exento de leucina. Una de las cepas transformadas resultantes se designa como SWE23-DL1::pSW35-42. Se transformó entonces esta cepa con YEp352 (un vector de control vacío, Hill y col., 1986, YEAST 2: 163-167) o con pRH124-31 (contiene el dominio catalítico del gen *HMG2*, véase el Ejemplo 4), que dio como resultado las cepas SWE23-DL1::pSW35-42/YEp352 y SWE23-DL1::pSW35-42/pRH124, respectivamente. La cepa SWE23-DL1::pSW35-42/YEp352 sobreexpresa GGPP sintasa, mientras que la SWE23-DL1::pSW35-42/pRH124 sobreexpresa GGPP sintasa y HMG-CoA reductasa.

**[0236]** Se realizaron experimentos de fermentación de las cepas SWE23-DL1::pSW35-42/pRH124 y SWE23-DL1::pSW35-42/Yep352 para comparar la producción de GG por estas dos cepas. Se ensayó en las cepas la producción de GG en fermentadores de 1 l usando el protocolo descrito en el Ejemplo 1.H. Se presentan los datos de fermentación en la Tabla 20. Este experimento muestra que la fermentación de SWE23-DL1::pSW35-42/pRH124 acumulaba más GG que la fermentación de SWE23-DL1::pSW35-42/Yep352, y demuestra que la elevación de la actividad HMG-CoA reductasa en una cepa diseñada para producir GG daba como resultado una elevación adicional de los niveles de GG en comparación con una cepa similar con HMG-CoA reductasa no amplificada.

**TABLA 20**

| Cepa | Peso celular seco a las 192 h | Farnesol a las 192 h | | GG a las 192 h | |
|---|---|---|---|---|---|
| | g/l | g/l | % de peso seco | g/l | % de peso seco |
| SWE23-ΔL1::pSW35-42/Yep352 | 41,4 | 2,04 | 4,9 | 0,30 | 0,72 |
| SWE23-ΔL1::pSW35-42/pRH124 | 44,0 | 3,27 | 7,4 | 0,60 | 1,36 |

**[0237]** Se realizó un segundo enfoque para conseguir la sobreexpresión de HMG-CoA reductasa y GGPP sintasa en la misma cepa clonando ambos genes en un vector de levadura de alto número de copias y transformando este plásmido en una cepa mutante *erg9*. El plásmido usado con este fin se designa como pSW46-1, y se construyó éste como sigue. Se digirió el plásmido pSW4A (véase el Ejemplo 5) con *EcoRI* y *SacI*, se purificó el fragmento de 0,9 kb que contenía el gen *crtE* y se ligó con pADH313-956 digerido con *EcoRI*, *SacI* generando pSW38-10. Se eliminaron dos regiones de este plásmido mediante digestión con enzimas de restricción, rellenando los extremos del ADN usando polimerasa *Pfu* y ligando para volver a formar el plásmido circular. Las regiones eliminadas de esta manera estaban entre sitios *NdeI* y *SpeI* y entre sitios *HindIII* y *PstI*. El plásmido resultante se designa como pSW43-5. Se digirió el plásmido pSW43-5 con *BamHI*, se purificó el fragmento de 2199 pb resultante que contenía el promotor *ADH1*, el gen *crtE* y el terminador *ADH1* (designado fragmento *ADHp/crtE/ADHt*) y se ligó en el sitio *BamHI* de YEp352. El plásmido resultante se designa como pSW44-17, y difiere de pSW4A en que contiene uno en lugar de dos sitios *PstI*.

**[0238]** Se digirió el plásmido pRH124-31 con *XbaI* y *PstI* y se clonó el fragmento de 3,2 kb que contiene el promotor *GPD*, el gen del dominio catalítico de *HMG2* y el terminador *PGK* (designado fragmento

GPDp/HMG2cat/PGKt) en pSW44-17 digerido con *XbaI, PstI*, generando pSW46-1. Este plásmido se replica a un alto número de copias en levadura y contiene ambos genes *HMG2* y *crtE*, proporcionando la sobreexpresión de HMG-CoA reductasa y GGPP sintasa. Se transformó el plásmido pSW46-1 en la cepa mutante *erg9* SWE-DE91, y se aislaron los transformantes URA+. Se ensayaron varios de los transformantes resultantes en un experimento de matraz agitado y se compararon con una cepa que sobreexpresa solo GGPP sintasa (EMS9-23/pSW4A). Se presentan en la Tabla 21 los resultados de ese experimento, y demuestran que se acumulan mayores niveles de GG en cepas que sobreexpresan tanto HMG-CoA reductasa como GGPP sintasa cuando se compara con una cepa que sobreexpresa solo GGPP sintasa.

**TABLA 21**

| Cepa | Genes sobre-expresados | Peso celular seco | GG | |
|---|---|---|---|---|
| | | mg/ml | mg/ml | % de peso seco |
| SWE23-ΔE91/ YEp352 | Control | 4,35 | 0,0007 | 0,02 |
| EMS9-23/ pSW4A | GGPP sintasa | 2,82 | 0,0469 | 1,66 |
| SWE23-ΔE91/ pSW46-1 | GGPP sintasa<br>HMG-CoA reductasa | 3,45 | 0,0866 | 2,45 |

**[0239]** Estos datos apoyan la idea de que la sobreexpresión de HMG-CoA reductasa en una cepa que es capaz de producir niveles elevados de GG conduce a un aumento adicional de la cantidad de GG producido.

Ejemplo 9

**[0240]** El siguiente ejemplo describe la producción de cepas más estables que sobreexpresan HMG-CoA reductasa.

**[0241]** Como se describe en el Ejemplo 4, se construyeron cepas que sobreexpresan HMG-CoA reductasa debido a la presencia de plásmidos replicantes de alto número de copias que contienen los genes *HMG1cat* o *HMG2cat*. Puesto que los plásmidos replicantes pueden perderse frecuentemente durante la división celular, esta inestabilidad mitótica de los plásmidos replicantes puede conducir dado el caso a cultivos con una alta proporción de células que contienen solo niveles normales de HMG-CoA reductasa. Para obtener cepas más estables que sobreexpresen HMG-CoA reductasa, se integraron copias del gen que codifica el dominio catalítico de HMG2p en el genoma de la cepa SW23B. Esto se realizó construyendo en primer lugar un plásmido que permitiera integraciones múltiples del gen *HMG2* en la región espaciadora del gen *rRNA*. Este enfoque se modeliza según el procedimiento de integración de ADNr descrito por Lopes y col., 1989 (Lopes, T. S., Klootwijk, J., Veenstra, A. E., van der Aar, P. C., van Heerikhuizen, H., Raue, H. A. y Planta, R. J. 1989. “High-copy-number integration into the ribosomal DNA of Saccharomyces cerevisiae: a new vector for high-level expression”. Gene 79:199-206).

**[0242]** Se usó PCR para amplificar dos regiones del locus de ADNr que se encuentran en la región intergénica entre el gen que codifica el ARNr de 35S y el gen que codifica ADNr de 5S, designada aquí como región espaciadora de ADNr. Los oligonucleótidos usados para amplificar el primero de los dos fragmentos de la región espaciadora de ADNr contenía secuencias correspondientes a las bases nº 11161 a la nº 1130 y al complemento inverso de la nº 10311 a la nº 10330 del número de acceso a GeneBank Z73326. Se enumeran a continuación las secuencias oligonucleotídicas. Las letras minúsculas se usan para indicar las bases que se alteraron o añadieron para crear sitios de reconocimiento de endonucleasa de restricción, que se indican entre paréntesis después de la secuencia oligonucleotídica.

SEQ ID NO:24:
R6XbaI Lo 5’-tctagaGGCACCTGTCACTTTGGAAAAAAAATATACGC-3’ (XbaI)
SEQ ID NO:25:
R7SacII Up 5’-ccgcggGCCGGAAATGCTCTCTGTTC-3’ (SacII)

**[0243]** El fragmento de ADN generado a partir de la amplificación por PCR usando estos dos oligonucleótidos se designa en el presente documento como el fragmento R6/R7. Se clonó inicialmente el fragmento R6/7 generado por PCR en el plásmido pCR-Script generando pSW48-1, se cortó entonces de este plásmido mediante digestión con *XbaI* y *SacII*. Se clonó entonces el fragmento de 750 pb resultante en pBluescript SK digerido con *XbaI, SacII* (Stratagene) generando pSW49-1.

**[0244]** Los oligonucleótidos usados para amplificar el segundo fragmento de la región espaciadora de ADNr contenía las secuencias correspondientes a las bases nº 11247 a la nº 11272 y el complemento inverso de la nº 12054 a la nº 12072 del acceso a GeneBank nº Z73326. Se enumeran las secuencias de estos oligonucleótidos a continuación.

SEQ ID NO:26:
R5SalI UpB 5’CACgtCgACCATTCAAACTTTACTAC-3’ (*SalI*)
SEQ ID NO:27:
R4ApaI LoB 5’-GAGGGCccGGTCCAGACAT-3’ (*ApaI*)

**[0245]** El fragmento de ADN generado por amplificación por PCR usando los dos oligonucleótidos enumerados anteriormente se designa en el presente documento como el fragmento R4/R5. Se digirió el fragmento R4/R5 generado por PCR con *ApaI* y *SalI*, y se ligó con pSW49-1 digerido con *ApaI*, *SalI* generando pSW52-11.

**[0246]** Se usó PCR para amplificar el gen TRP1 de tal modo que el gen portara un promotor incompleto. Se pretendía que el promotor incompleto redujera la expresión del gen *TRP1*, y proporcionara así un medio de selección de integración de alto número de copias del módulo de expresión final. Los oligonucleótidos usados en el gen *TRP1* contenían secuencias correspondientes a las bases de nº 53 a nº 73 y el complemento inverso de nº 804 a nº 823 del nº de acceso a GeneBank J01374. Se enumeran las secuencias oligonucleotídicas a continuación.

SEQ ID NO:28:

TRP1 SmaUp 5'-cccgggTATTGAGCACGTGAGTATACG-3' (*SmaI*)

SEQ ID NO:29:

TRP1 BamLo 5'-ggatccGGCAAGTGCACAAACAATAC-3' (*BamHI*)

**[0247]** En la siguiente etapa, se digirió pSW50-1 con *BamHI* y *SmaI*, y se purificó el fragmento de *TRP1* de 779 pb resultante. Se digirió el plásmido pRH124-31 con *PstI* y *SmaI*, generando un fragmento de 3261 pb que contenía el promotor *GPD*, el gen *HMG2 cat* y el terminador *PGK* (designado como el fragmento *GPDp/HMG2cat/PGKt*) y se purificó este fragmento. Se ligaron el fragmento *TRP1* y el fragmento *GPDp/HMG2cat/PGKt* en pSW52-11 digerido con *PstI*, *BamHI* en un ligamiento de tres fragmentos generando pSW58-77 y pSW58-45.

**[0248]** Se cortó el fragmento de ADN que contiene las fusiones génicas R6/R7-*TRP1-GPDp/HMG2cat/PGKt*-R4/R5 a partir de pSW58-77 mediante digestión con las endonucleasas de restricción *KpnI* y *SacI*. Se purificó el fragmento de 5671 pb correspondiente a la construcción de integración y se usó para transformar la cepa SW23B. Se seleccionaron los transformantes en medio SCE-trp. Se cribó en las cepas aisladas de esta manera la elevación de la actividad HMG-CoA reductasa, y mediante análisis de transferencia Southern la elevación del número de copias del gen *HMG2*. Se identificaron las cepas que portaban una copia de la construcción integrante, dos copias de la construcción integrante, tres copias de la construcción integrante y ocho copias de la construcción integrante, y se designan como SW23B nº19, SW23B nº31, SW23B nº40 y SW23B nº 74, respectivamente. La Tabla 22 da la actividad específica de HMG-CoA reductasa determinada mediante ensayos enzimáticos *in vitro* y el número de copias del gen *HMG cat* determinado por transferencia Southern. El ensayo de HMG-CoA reductasa se ha descrito anteriormente (Quain, D. E. y Haslam, J. M. 1979. "The Effects of Catabolite Derepression on the Accumulation of Steryl Esters and the Activity of β-Hydroxymethylglutaryl-CoA Reductase in Saccharomyces cerevisiae". J. Gen. Microbiol. 111:343-351).

**TABLA 22**

| Cepa | HMG-CoA reductasa | GPDp/HMG2cat/PGKt |
|---|---|---|
| | nmol/min/mg | copias/célula |
| SW23B | 5,26 | 0 |
| SW23B nº 19 | 14,53 | 1 |
| SW23B nº 31 | 37,47 | 2 |
| SW23B nº 40 | 50,33 | 3 |
| SW23B nº 76 | 59,04 | 8 |

**[0249]** Estas cepas requieren leucina y uracilo suministrados exógenamente para el crecimiento debido a las mutaciones *leu2* y *ura3* en estas cepas. Para eliminar la necesidad de suministrar estos nutrientes durante los experimentos de fermentación, se transformaron las cepas con un plásmido, pTWM138, que contenía copias funcionales de *URA3, LEU2* y *TRP1*. La presencia de este plásmido en estas cepas permitió a las cepas crecer sin suplemento de leucina ni uracilo.

**[0250]** Se llevaron a cabo experimentos de fermentación para comparar la producción de farnesol por estas cepas. Se incluyó también en este experimento la cepa SWE23-DE91/pRH124-31 que contiene la fusión génica *GPDp/HMG2cat/PGKt* en un plásmido de alto número de copias (véase el Ejemplo 4.B). Se ensayó en las cepas la producción de farnesol en fermentadores de 1 l usando el protocolo descrito en el Ejemplo 1.H, y se presentan los datos de este experimento en la Tabla 23.

**TABLA 23**

| Cepa | Genes amplificados | Tiempo de ferm. | Peso celular seco | Farnesol | |
|---|---|---|---|---|---|
| | nº de copias | h | g/l | g/l | % de peso celular seco |
| SW23B/ pTWM138 | Control | 216 | 53,3 | 3,25 | 6,10 |
| SW23Bnº19/ pTWM138 | HMG2 cat 1 copia | 192 | 52,4 | 4,58 | 8,74 |
| SW23Bnº74/ | HMG2 cat 8 copias | 216 | 43,5 | 4,70 | 10,80 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| pTWM138 | | | | | |
| SW23B/ pRH124-31 | HMG2 cat > 20 copias | 192 | 43,8 | 4,89 | 11,16 |

**[0251]** Estos datos apoyan la idea de que las cepas con niveles elevados de HMG-CoA reductasa producen más farnesol que una cepa con niveles normales de HMG-CoA reductasa. Los datos indican también que una cepa que contiene 8 copias integradas del gen *HMG2cat* produce esencialmente tanto farnesol como una cepa que porta más de 20 copias extracomosómicas del gen *HMG2cat* como es el caso de la cepa SW23B/pRH124-31. Una cepa que contenía una sola copia integrada del gen *HMG2cat* producía más farnesol que la cepa de control, pero ligeramente menos que cepas con más copias del gen *HMG2cat*. Además, las cepas que contenían niveles elevados de HMG-CoA reductasa acumulaban mevalonato en el cultivo, mientras que las cepas con niveles normales de HMG-CoA reductasa no lo hacían. Esto sugieren que una etapa más adelante de la HMG-CoA reductasa limita el flujo de carbono en la ruta una vez se ha elevado la actividad de la enzima HMG-CoA reductasa (véase el Ejemplo 10). El flujo de carbono a través de la ruta se limita por la actividad de una de las enzimas más adelante de la HMG-CoA reductasa, dando como resultado la acumulación de mevalonato en el medio.

Ejemplo 10

**[0252]** Este ejemplo muestra los efectos de la sobreexpresión de múltiples genes de la ruta de isoprenoides en una cepa que tiene una mutación *erg9* y niveles elevados de HMG-CoA reductasa.

**[0253]** Como se muestra en los Ejemplos 4 y 9, la elevación de los niveles de HMG-CoA reductasa conducía a niveles mayores de flujo de carbono a través de la ruta de isoprenoides/esterol. La sobreexpresión de otros genes de la ruta de isoprenoides en cepas que contenían HMG-CoA reductasa amplificada puede aumentar adicionalmente el flujo de carbono a través de esta ruta. La amplificación de genes de la ruta de isoprenoides en cepas que tienen niveles elevados de HMG-CoA reductasa, así como un gen *erg9* defectivo, puede dar como resultado una elevación adicional de los niveles de farnesol. También la amplificación de genes de la ruta de isoprenoides puede dar como resultado una elevación adicional de los niveles de GG en cepas que tienen un gen *erg9* defectivo y que tienen niveles elevados de HMG-CoA reductasa y GGPP sintasa.

**[0254]** Para probar estas ideas, se construyeron plásmidos que permitían la sobreexpresión de múltiples genes de la ruta de isoprenoides. Uno de los plásmidos proporcionaba la sobreexpresión de mevalonato cinasa, fosfomevalonato cinasa y difosfomevalonato descarboxilasa, codificadas por los genes *ERG12, ERG8* y *ERG19*, respectivamente. Este plásmido se designa como pSW77-69, y se construyó a partir de fragmentos de ADN obtenidos a partir de una serie de plásmidos que contenían genes individuales de la ruta de isoprenoides. Se describe en primer lugar la construcción de esos plásmidos.

**[0255]** Se usó PCR para amplificar el gen *ERG12* para clonación. Los oligonucleótidos usados para amplificar el gen *ERG12* contenían las secuencias correspondientes a las bases nº 2827 a nº 2846 y el complemento inverso de nº 5247 a nº 5229 del acceso a GeneBank nº Z49809. Se dan a continuación las secuencias de los dos oligonucleótidos. Se usan letras minúsculas para las bases que se alteraron o añadieron para crear sitios de reconocimiento de endonucleasa de restricción, que se indican entre paréntesis después de la secuencia oligonucleotídica.

SEQ ID NO:30:
E12.4SN 5'-CCAAATATAACtCGAGCTTTG-3 (*XhoI*)

SEQ ID NO:31:
E12.SALI3 5'-GCAAAGTcCaCCACCGCAG-3 (*SalI*)

**[0256]** Se amplificó el gen *ERG12* usando los dos oligonucleótidos E12.4SN y E12.SALI3 y ADN genómico de la cepa ATCC 28383. Se clonó el ADN resultante en pCR-Script en el sitio *SfrI* generando pSW68.

**[0257]** Los oligonucleótidos usados para amplificar el gen *ERG19* contenían las secuencias correspondientes a las bases nº 911 a nº 937 del nº de acceso a GeneBank Z71656 y el complemento inverso de las bases nº 1930 a nº 1962 del nº de acceso a GeneBank Z71658. Se dan a continuación las secuencias de los dos oligonucleótidos.

SEQ ID NO:32:
E19 SMAI 5'-GCCACGTGCCCcCGGGTTTCTCTAGCC-3' (*SmaI*)

SEQ ID NO:33:
E19 SACI3 5'-GGAAAAGagCtCGATAATTATTGATGATAGATC-3' (*SalI*)

**[0258]** Se amplificó el gen *ERG19* usando los dos oligonucleótidos E19 SMAI, E19 SACI3, y ADN genómico de la cepa ATCC 28383. Se clonó el ADN resultante en pCR-Script en el sitio *SfrI* generando pSW69.

**[0259]** Los oligonucleótidos usados para amplificar el gen *ERG8* contenían las secuencias correspondientes a las bases nº 2729 a nº 2749 y el complemento inverso de nº 5177 a nº 5196 del nº de acceso a GeneBank Z49939.

Se dan a continuación las secuencias de los dos oligonucleótidos.
SEQ ID NO:34:
E8.2135N 5'-CCGTTTTGGATccTAGATCAG-3' (*BamHI*)
SEQ ID NO:35:
E8SMAI3 5'-gttcccGGGTTATTGTCCTGCATTTG-3' (*SmaI*)

**[0260]** Se amplificó el gen *ERG8* usando los dos oligonucleótidos E8.2135N, E8SMAI3, y ADN genómico de la cepa ATCC 28383. Se clonó el ADN resultante en pCR-Script en el sitio *SfrI* generando pSW71.

**[0261]** Se digirió el plásmido pSW71 con *BamHI* y *SmaI*, y se purificó el fragmento de 2459 pb resultante que contenía el gen *ERG8*. Se digirió el plásmido pSW69-3 con *SmaI* y *SacI*, y se purificó el fragmento de 2239 pb resultante que contenía el gen *ERG19*. Se digirió el vector de levadura de alto número de copias YEp352 (que contiene un marcador de selección URA3) con *BamHI* y *SacI* y se purificó. Se ligaron conjuntamente los tres fragmentos de ADN purificado generando pSW76-11.

**[0262]** A continuación, se digirió pSW68 con *SalI* y *XhoI*, se purificó la banda de 2400 pb resultante que contenía el gen *ERG12* y se ligó en pSW76-11 digerido con *SalI* generando pSW77-69. Este plásmido contiene *ERG12, ERG8* y *ERG19* y proporciona la sobreexpresión de mevalonato cinasa, fosfomevalonato cinasa y difosfomevalonato descarboxilasa.

**[0263]** Otro plásmido proporcionó la sobreexpresión de mevalonato cinasa, fosfomevalonato cinasa, difosfomevalonato descarboxilasa e IPP isomerasa, codificadas por los genes *ERG12, ERG8, ERG19* e *IDI1*, respectivamente. Este plásmido se designa como pSW78-68, y se construyó como sigue. Se amplificó el gen *IDI1* por PCR para clonación. Los oligonucleótidos usados para amplificar el gen *IDI1* contenían las secuencias correspondientes a las bases nº 19577 a nº 19604 y el complemento inverso de nº 17477 a nº 17502 del nº de acceso a GeneBank U43503. Se dan a continuación las secuencias de los dos oligonucleótidos.
SEQ ID NO:36:
ISO SACI5 5'-AAGAGctcATCTGATAATAGATCAAGCG-3' (SacI)
SEQ ID NO:37:
ISO SACI3 5'-AGGAGCTCAACGACAATAAATGGCTG-3' (SacI)

**[0264]** Se amplificó el gen *IDI1* usando los dos oligonucleótidos, ISO SACI5, ISOSACI3, y ADN genómico de la cepa ATCC 28383. Se clonó el ADN resultante en pCR-Script en el sitio *SfrI* generando pSW73. Se digirió el plásmido pSW73 con *SacI* y se ligó el fragmento de 2117 pb resultante que contiene el gen *IDI1* con pSW77-69 digerido con *SacI* generando pSW78-68. Este plásmido contiene *ERG12, ERG8, ERG19* e *IDI1*, y proporciona la sobreexpresión de mevalonato cinasa, fosfomevalonato cinasa, difosfomevalonato descarboxilasa e IPP isomerasa.

**[0265]** Otro plásmido proporcionaba la sobreexpresión de acetoacetil CoA tiolasa y HMG-CoA sintasa, codificadas por los genes *ERG10* y *ERG13*, respectivamente. Este plásmido se designa como pSW79-29, y se construyó como sigue.

**[0266]** Se usó PCR para amplificar los genes *ERG13* y *ERG10* para clonación. Los oligonucleótidos usados para amplificar el gen *ERG13* contenían las secuencias correspondientes al complemento inverso de las bases nº 21104 a nº 21127 y las bases nº 18270 a nº 18292 del nº de acceso a GeneBank Z50178. Se da a continuación la secuencia de los dos oligonucleótidos.
SEQ ID NO:38:
E13 XBAI5 5'-GTCCTctAGATCTTGAATGAAATC-3' (*XbaI*)
SEQ ID NO:39:
E13 SACI3 5'-CTTTGAGCtcGTACAAGAAGCAG-3' (*SacI*)

**[0267]** Se amplificó el gen *ERG13* usando los dos oligonucleótidos, E13 XBAI5, E13 SACI3, y ADN genómico de la cepa ATCC 28383. Se clonó el ADN resultante en pCR-Script en el sitio *SfrI* generando pSW72.

**[0268]** Los oligonucleótidos usados para amplificar el gen *ERG10* contenían las secuencias correspondientes a las bases nº 4073 a nº 4093 y el complemento inverso de nº 6542 a nº 6565 del nº de acceso a Gene Bank U36624. Se dan a continuación las secuencias de los dos oligonucleótidos.
SEQ ID NO:40:
E10 HIND5 5'-CTAAGCttTGCGCCCGTGAAG-3' (*HindIII*)
SEQ ID NO:41:
E10 XBAI3-2 5'-GTTCTAGAAGTTTTCAAAGCAGAG-3' (*XbaI*)

**[0269]** Se amplificó el gen *ERG10* usando los dos oligonucleótidos, E10 HIND5, E10 XBAI3-2, y ADN genómico de la cepa ATCC 28383. Se clonó el ADN resultante en pCR-Script en el sitio *SfrI* generando pSW70.

**[0270]** Se digirió el plásmido pSW70 con *XbaI* y *HindIII*, y se purificó el fragmento de 2482 pb resultante que contenía el gen *ERG10*. Se digirió el plásmido pSW72-4 con *XbaI* y *SacI* y se purificó el fragmento de 2850 pb resultante que contenía el gen *ERG13*. Se ligaron entonces conjuntamente los dos fragmentos de ADN purificados con YEp351 digerido con *SacI, HindIII* (marcador seleccionable *LEU2*) generando pSW79-30. Este plásmido contiene los genes *ERG13* y *ERG10* y permite la sobreexpresión de acetoacetil CoA tiolasa y HMG-CoA sintasa.

**[0271]** Se transformó la cepa SW23B nº 74 (contiene 8 copias integradas del gen HMG2 cat, véase el Ejemplo 9) con pSW77-69 y pSW78-68, y se seleccionaron transformantes en medio SCE-ura. Las cepas resultantes se designan como SW23B nº 74/pSW77-69 y SW23B nº 74/pSW78-68, respectivamente. Estas cepas requieren leucina añadida para el crecimiento debido a la mutación *leu2*. Para eliminar la necesidad de suplementar estas cepas con leucina durante los experimentos de fermentación, se transformaron con un fragmento lineal de ADN que contenía un gen *LEU2* funcional, y se aislaron los transformantes LEU+. Estas cepas se designan como SW23B nº 74L/pSW77-69 y SW23B nº 74L/pSW78-68, respectivamente.

**[0272]** Se transfomró la SW23B nº 74 también con pSW79-30, y se seleccionaron los transformantes en medio SCE-leu. La SW23B nº 74/pSW79-30 requiere uracilo puesto que contiene una mutación en el gen *ura3*. Para eliminar la necesidad de suplementar estas cepas con uracilo durante los experimentos de fermentación, se transformó esta cepa con un fragmento lineal de ADN que contenía un gen *URA3* funcional, y se aislaron transformantes URA3+. Esta cepa se designa como SW23B nº 74U/pSW79-30.

**[0273]** Se transformó la SW23B nº 74 también tanto con pSW78-68 como con pSW79-30, y se aislaron transformantes que eran capaces de crecer en medio SCE-ura,-leu, indicando que los transformantes contenían ambos plásmidos. La cepa resultante se designa como SW23B nº 74/pSW78-68/pSW79-30.

**[0274]** Se llevaron a cabo experimentos de fermentación con las cepas descritas anteriormente para examinar el efecto de estas amplificaciones génicas sobre la producción de farnesol. Se ensayaron las cepas en fermentadores de 1 l usando el protocolo descrito en el Ejemplo 1.H, y se presentan los datos de estos experimentos en la Tabla 24.

**TABLA 24**

| Cepa | Genes ampli-ficados | Tiempo de ferm. | Peso celular seco | Farnesol | | Mevalonato | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | (h) | g/l | g/l | % de peso seco | g/l | % de peso seco |
| SW23B nº 74/pTWM138 | *HMG2cat* | 215 | 45,5 | 4,95 | 10,88 | 0,2 | 0,4 |
| SW23B nº 74L/pSW77-69 | *HMG2cat, ERG8, ERG12, ERG19* | 287 | 41,6 | 4,67 | 11,23 | 0 | 0 |
| SW23B nº 74L/pSW78-68 | *HMG2cat, ERG8, ERG12, ERG19, IDI1* | 215 | 46,4 | 4,87 | 10,50 | 0 | 0 |
| SW23B nº 74U/ pSW79-30 | *HMG2cat, ERG10, ERG13* | 215 | 46,1 | 4,63 | 10,04 | 5,4 | 11,7 |

**[0275]** Estos datos muestran que una cepa que sobreexpresa HMG-CoA reductasa acumula el intermedio de la ruta de isoprenoides mevalonato en el medio de cultivo. Puesto que la acumulación de mevalonato no se observa en cepas con niveles normales de HMG-CoA reductasa, esto demuestra que ha aumentado el flujo de carbono a través de la ruta de isoprenoides por la amplificación de HMG-CoA reductasa hasta el punto en que otra etapa posterior a la HMG-CoA reductasa limita la conversión de los intermedios de la ruta. Además, la sobreexpresión de las primeras tres enzimas de la ruta de isoprenoides, a saber acetoacetil CoA tiolasa, HMG-CoA sintasa y HMG-CoA reductasa (codificadas por *ERG13*, *ERG10* y *HMG2cat*, respectivamente) conducía a una acumulación aún mayor de mevalonato en el medio. Esto demuestra que el flujo de carbono en la ruta de isoprenoides ha aumentado adicionalmente por la amplificación de las tres primeras etapas, y destaca que una de las enzimas más adelante de la HMG-CoA reductasa limita la conversión de los intermedios de la ruta de isoprenoides. Puesto que el mevalonato sirve como precursor de farnesol y GG, las modificaciones descritas anteriormente pueden usarse para incrementar el flujo de carbono en la ruta de isoprenoides y, si el mevalonato puede metabolizarse más eficazmente, puede conducir a una acumulación de farnesol y GG aumentada.

**[0276]** Con respecto a este último punto, se amplificaron las enzimas más adelante de HMG-CoA reductasa en una cepa que sobreexpresaba HMG-CoA reductasa. Las enzimas amplificadas eran HMG-CoA reductasa,

mevalonato cinasa, fosfomevalonato cinasa, difosfomevalonato descarboxilasa e IPP isomerasa (codificadas por *HMG2cat, ERG12, ERG8, ERG19* e *IDI1*, respectivamente). Estas cepas acumulaban menos mevalonato en comparación con cepas que sobreexpresaban solo HMG-CoA reductasa, indicando que el flujo aumentado a través de la ruta de isoprenoides que da como resultado la sobreexpresión de HMG-CoA reductasa se adaptaba a niveles elevados de las enzimas más adelante. Aunque no se observaron niveles elevados de farnesol en el experimento descrito anteriormente, esto puede ser debido al bajo nivel de mevalonato disponible para conversión. Sin embargo, estos datos sugieren que la amplificación de una o más de las enzimas más adelante de HMG-CoA reductasa en una cepa con niveles amplificados de las primeras tres enzimas de la ruta puede conducir a una acumulación aumentada de farnesol y GG, puesto que el flujo hasta mevalonato aumenta en gran medida en estas cepas. Es probable que la sobreexpresión de uno o más genes más adelantt de HMG-CoA reductasa en una cepa que sobreexpresa acetoacetil CoA tiolasa, HMG-CoA sintasa y HMG-CoA reductasa conduzca a aumentos significativos de la acumulación de farnesol y GG.

Ejemplo 11

**[0277]** Este ejemplo describe un experimento en que la escualeno sintasa se bloquea por ácido zaragócico en una cepa con una ruta de esterol intacta y funcional, que incluye un gen *ERG9* funcional, y se observa el efecto de este inhibidor de escualeno sintasa sobre la acumulación de farnesol y GG.

**[0278]** Los ácidos zaragócicos son una familia de compuestos que actúan como potentes inhibidores de escualeno sintasa (Bergstrom, J. D., Dufresne, C., Bills, G. F., Nallin-Omstead, M. y Byrne, K. 1995. “Discovery, Biosynthesis, and Mechanism of Action of the Zaragozic Acids: Potent Inhibitors of Squalene Synthase”. Ann. Rev. Microbiol. 49: 607-639). Son capaces de inhibir la biosíntesis de colesterol en mamíferos y la biosíntesis de ergosterol en hongos. Puesto que el ergosterol es necesario para el crecimiento de células fúngicas, los ácidos zaragócicos son potentes compuestos fungicidas.

**[0279]** Se usó la cepa SWE23-E9 (*ura3, sue*; véase el Ejemplo 1.G) en este experimento debido a que contenía la mutación *sue* que proporcionaba la captación de esteroles en condiciones aeróbicas. Esto permitía a la levadura crecer en medio suplementado con ergosterol cuando la escualeno sintasa se bloqueaba por ácido zaragócico. Una cepa sin la mutación *sue* no sería capaz de captar esteroles, incluyendo ergosterol, del medio y por lo tanto no podría crecer en presencia de ácido zaragócico.

**[0280]** Se ensayaron SWE23-E9 que contienen un vector vacío (Yep352) o plásmidos que permiten la sobreexpresión de HMG-CoA reductasa (pRH124-31), GGPP sintasa (pSW4A), o tanto HMG-CoA reductasa como GGPP sintasa (pSW46-1) en matraces agitados, cultivando en primer lugar las cepas en medio SCE-urea durante 48 horas para seleccionar los plásmidos. Se inocularon entonces muestras de estos cultivos en medio YPDE o medio YPDE que contenía ácido zaragócico a 100 µg/ml. Se incubaron los cultivos de YPDE (+/- ácido zaragócico) a 30ºC durante 48 h, y se analizaron entonces el peso celular seco y la acumulación de farnesol. Se muestran en la Tabla 25 los datos de este experimento. Todos los cultivos tratados con ácido zaragócico exhibían una acumulación elevada de farnesol respecto a los cultivos no tratados. La acumulación de GG no se midió en este experimento.

**TABLA 25**

| Cepa | Ácido zaragócico | Peso celular seco | Farnesol | |
|---|---|---|---|---|
| | a 100 µg/mol | mg/ml | µg/ml | % de peso seco |
| SWE23-E9/Yep352 | + | 7,65 | 43 | 0,56 |
| SWE23-E9/Yep352 | - | 9,72 | 0 | 0 |
| SWE23-E9/pRH124-31 | + | 7,88 | 11 | 0,14 |
| SWE23-E9/pRH124-31 | - | 9,809 | 0 | 0 |
| SWE23-E9/pSW4A | + | 7,04 | 45 | 0,64 |
| SWE23-E9/pSW4A | - | 9,05 | 1 | 0 |
| SWE23-E9/pSW46-1 | + | 7,09 | 51 | 0,72 |
| SWE23-E9/pSW46-1 | - | 8,54 | 0 | 0 |

**[0281]** En un experimento separado, se ensayaron SWE23-E9 que contenía un vector vacío (Yep352) o un plásmido que permite la sobreexpresión tanto de HMG-CoA reductasa como GGPP sintasa (pSW96-1) en matraces agitados, cultivando en primer lugar las cepas en medio SCE-ura durante 48 horas para seleccionar los plásmidos. Se inocularon entonces muestras de estos cultivos en medio YPDE o medio YPDE que contenía ácido zaragócico 100 mg/ml. Se incubaron los cultivos de YPDE (+/- ácido zaragócico) a 30ºC durante 72 h, y se analizaron entonces el peso celular seco y el GG. Se presentan los datos en la Tabla 26. El cultivo de SWE23-E9/pSW46-1 tratada con ácido zaragócico exhibía un mayor nivel de GG en comparación con la misma cepa cultivada en ausencia de ácido zaragócico. Estos experimentos demuestran que las cepas sin mutaciones en la ruta biosintética del esterol pueden inducirse a acumular farnesol bloqueando la ruta usando un inhibidor de escualeno sintasa. La cantidad de farnesol o GG acumulada por los cultivos tratados con ácido zaragócico era mucho menor que la cantidad acumulada por

cepas con genes *erg9* completamente defectivos, indicando que un bloqueo genético de la escualeno sintasa es más eficaz que un bloqueo inducido por un inhibidor de escualeno sintasa.

**TABLA 26**

| Cepa | Ácido zaragócico | Peso celular seco | GG | |
|---|---|---|---|---|
| | a 100 µg/mol | mg/ml | µg/ml | % de peso seco |
| SWE23-E9/Yep352 | + | 7,17 | 0 | 0 |
| SWE23-E9/Yep352 | - | 9,25 | 0 | 0 |
| SWE23-E9/pSW46-1 | + | 6,68 | 17,8 | 0,27 |
| SWE23-E9/pSW46-1 | - | 8,41 | 6,7 | 0,08 |

Ejemplo 12

**[0282]** Se ha descrito una ruta alternativa que conduce a FPP en una serie de bacterias y plantas, y se designa como la ruta sin mevalonato o de Rohmer (Eisenreich, W., Schwarz, M., Cartayrade, A., Arigoni, D., Zenk, M. H. y Bacher, A., 1998. "The Deoxyxylulose Phosphate Pathway of Terpenoid Biosynthesis in Plants and Microorganisms". Chem. Biol. 5: R221-233. Paseshnichenko, V. A., 1998. "A New Alternative Non-Mevalonate Pathway for isoprenoid Biosynthesis in Eubacteria and Plants". Biochemistry (Mosc) 63: 139-148). Algunas de las enzimas de la ruta sin mevalonato y sus genes se han identificado y estudiado en *E. coli*, y estas incluyen 5-fosfato de desoxixilulosa sintasa, 5-fosfato de desoxixilulosa reductasa, IPP isomerasa y FPP sintasa, codificadas por los genes *dxr, dxs, idi* e *ispA*, respectivamente.

**[0283]** Para construir cepas de *E. coli* que acumulen niveles elevados de farnesol, se construyeron plásmidos para la sobreexpresión en *E. coli* de los genes enumerados anteriormente. En algunos casos, se incluyeron en el ADN clonado genes adicionales adyacentes al gen de la ruta de isoprenoides conocido.

**[0284]** Se amplificó por PCR el gen *idi* que codifica IPP isomerasa usando los dos oligonucleótidos enumerados a continuación y ADN genómico aislado de *E. coli* cepa W3110. Los oligonucleótidos usados para amplificar el gen *idi* contenían las secuencias correspondientes a las bases nº 42309 a nº 42335 y el complemento inverso de nº 43699 a nº 43726 del nº de acceso a GeneBank U28375. Se usan las letras minúsculas para bases que se alteraron para crear sitios de reconocimiento de endonucleasa de restricción, que se indican entre paréntesis después de la secuencia oligonucleotídica. Se usó un sitio *EcoRI* natural en VE145-5.

SEQ ID NO:42:
VE145-5 5'-GGGATTCGAATTCTGTCGCGCTGTAAC-3' (*EcoRI*)

SEQ ID NO:43:
VE146-3 5'-TGggATCcGTAACGGCTTTAGCGAGCTG-3' (*BamHI*)

**[0285]** Se digirió el producto PCR de *idi* con *EcoRI* y *BamHI*, y se ligó con pUC19 digerido con *EcoRI, BamHI*. El clon resultante se designa como pHS-O182.

**[0286]** Se amplificó el gen *dxr* con PCR usando los dos oligonucleótidos enumerados a continuación y ADN genómico aislado de *E. coli* cepa W3110. Los oligonucleótidos usados para amplificar una región del ADN que incluía los genes *frr, dxr* y *yaeS* contenía las secuencias correspondientes a las bases nº 2131 a nº 2150 y el complemento inverso de nº 5297 a nº 5315 del nº de acceso a GeneBank D83536.

SEQ ID NO:44:
DXR17.SN GATTCCGCGTAAGgATCcCG (*BamHI*)

SEQ ID NO:45:
DXR3179.ASN CCAGCATctAGACCACCAG (*XbaI*)

**[0287]** Se digirió el producto de PCR resultante con *BamHI* y *XbaI*, y se ligó en pHSO182 digerido con *BamHI, XbaI* generando pHS-O182R.

**[0288]** Los genes *ispA* y *dxs* parecen ser parte de un operón que incluye posiblemente otros dos genes designados como *xseB* y *yajO*. Se usó PCR para amplificar una región del ADN que incluía *xseB, ispA, dxs* y *yajO* usando los oligonucleótidos enumerados a continuación y ADN genómico aislado de *E. coli* cepa W3110. Los oligonucleótidos contenían las secuencias correspondientes a las bases nº 4157 a nº 4183 y el complemento inverso de las bases nº 8938 a nº 48956 del nº de acceso a Gene Bank AE000148.

SEQ ID NO:46:
DXS.5619P 5'-gactgcagCTGGCCGCTGGGTATTCTGTCGTAGTT-3' (*PstI*)

SEQ ID NO:47:
DXS.820X 5'-gatctagaTCACGCGTACGCAGAAGGTTTTGC-3' (*XbaI*)

**[0289]** Se digirió el producto de PCR resultante con *XbaI* y *PstI* y se ligó con pUC19 digerido con *XbaI, PstI* generando pHS-dxs.

**[0290]** Se cortará el fragmento de ADN que contiene el gen *dxs* de pHS-dxs usando *XbaI* y *PstI*, y se ligará en pHS-O182R digerido con *XbaI, PstI* generando un plásmido que contiene *dxs, dxr, ispA* e *idi*. Se transformará el plásmido resultante en *E. coli*, y se ensayará en una cepa transformada que contiene el plásmido la producción de farnesol en experimentos de matraz agitado y fermentación.

**[0291]** Para construir cepas de *E. coli* que acumulen niveles elevados de GG, se construyó un plásmido para la sobreexpresión en *E. coli* de GGPP sintasa de *Erwinia herbicola*. Se amplificó el gen *crtE* que codifica GGPP sintasa mediante PCR usando ADN genómico aislado de *Erwinia herbicola* cepa Eho10 y los dos siguientes oligonucleótidos. Los oligonucleótidos contenían las secuencias correspondientes a las bases nº 3513 a nº 3531 y el complemento inverso de bases nº 4459 a nº 4481 del nº de acceso a GeneBank M87280.

SEQ ID NO:48:

Eho10E Up 5'-gaattcCAATTCAGCGGGTAACCTT-3' (*EcoRI*)

SEQ ID NO:49:

Eho10E Lo 5'-aagcttTGCTTGAACCCAAAAGGGCGGTA-3' (*HindIII*)

**[0292]** Se digirió el producto de PCR resultante con *EcoRI* e *HindIII*, y se ligó en pET24d(+) (Novagen) de modo que la expresión del gen *ctrE* estuviera controlada por el promotor T7. Se designa el plásmido resultante como pKL19-63. Este plásmido puede transformarse en cepas de *E. coli* tales como BL21(DE3) (disponible en Novagen) que contiene un gen inducible por IPTG que codifica polimerasa T7. Esto permite la inducción por IPTG del gen *crtE* en esta cepa. La fusión génica promotor T7/*crtE* puede cortarse a partir de pKL19-63 usando *BglII* e *HindIII*, y ligarse en pACYC184 digerido con *BamHI, HindIII* (nº de acceso X06403) construyendo un plásmido que se basa en la resistencia al cloranfenicol para selección. Este plásmido contiene el origen de replicación p15A y sería compatible con plásmidos que contuvieran el origen de replicación ColE1 tales como los clones que portan los genes de la ruta de isoprenoides de *E. coli* descritos anteriormente. Estos últimos plásmidos confieren resistencia a ampicilina, de modo que pueden obtenerse transformantes de *E. coli* que porten tanto el plásmido de *crtE* como el plásmido que contiene los genes *dxs, dxr, idi* e *ispA* mediante transformación de *E. coli* con ambos plásmidos y selección por resistencia a cloranfenicol y ampicilina. Por lo tanto, se obtendrán cepas de *E. coli* BL21(DE3) que contienen plásmidos para la sobreexpresión de 5-fosfato de desoxixilulosa sintasa, 5-fosfato de desoxixilulosa reductoisomerasa, IPP isomerasa, FPP sintasa y GGPP sintasa. Se ensayará en estas cepas la producción de GG en experimentos de matraz agitado y fermentación.

Ejemplo 13

**[0293]** El siguiente ejemplo describe la construcción de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que se modifican por ingeniería genética para producir niveles elevados de farnesol y GG expresando enzimas que corresponden a enzimas de la ruta sin mevalonato.

**[0294]** La biosíntesis de IPP tiene lugar en muchas bacterias y plantas partiendo de piruvato y gliceraldehído-3, y procediendo mediante una serie de etapas enzimáticas conocidas como la ruta sin mevalonato, e incluye las enzimas 5-fosfato de desoxixilulosa sintasa y 5-fosfato de desoxixilulosa reductoisomerasa. El compuesto resultante de estas dos etapas enzimáticas es el 4-fosfato de 2-C-metil-D-etritritol (también conocido como MEP), que se metaboliza adicionalmente mediante enzimas desconocidas proporcionando IPP. Se construyen plásmidos que expresan los genes *dxs* y *dxr* de *E. coli* fusionando las regiones de codificación de estos genes con elementos promotores que permitan la expresión en levadura. Se amplifican los genes *dxs* y *dxr* mediante PCR con oligonucleótidos que incluyen sitios de restricción que permitan la clonación en vectores de expresión de levadura que contienen promotores tales como el promotor *ADH1*, el promotor *PGK* o el promotor *GPD*. Se combinan entonces las dos fusiones génicas en un solo plásmido mediante subclonación de una fusión génica en el otro plásmido. El plásmido resultante que contiene ambos genes se transforma entonces en un mutante *erg9* de levadura. La cepa resultante es capaz de sintetizar MEP, que puede metabolizarse adicionalmente a IPP mediante enzimas endógenas capaces de llevar a cabo las reacciones deseadas hasta IPP. Esta capacidad puede conducir a una acumulación aumentada de IPP, que puede causar en las células niveles acumulados elevados de farnesol mediante la acción de las enzimas IPP isomerasa y FPP sintasa endógenas. Si se realiza esto en una cepa que sobreexpresa también GGPP sintasa, entonces pueden acumularse grandes cantidades de GG en estas cepas.

Ejemplo 14

**[0295]** Este ejemplo describe la construcción de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* que sobreexpresa un gen *ERG20* mutado que codifica una enzima FPP sintasa que exhibe una especificidad de producto alterada. Al contrario que cepas que sobreexpresan FPP sintasa natural, las cepas que expresan la FPP sintasa mutada acumulaban más GG que farnesol.

**[0296]** La comparación de las secuencias aminoacídicas de FPP sintasas de una variedad de organismos reveló varios dominios altamente conservados que incluyen dos dominios ricos en aspartato, que son esenciales

para la actividad catalítica. Los investigadores han notificado que las mutaciones que afectan al aminoácido localizado en la quinta posición antes del primer dominio rico en aspartato pueden alterar la especificidad de producto de la enzima de tal modo que la enzima catalice fácilmente la formación de GGPP así como de FPP. Esto se ha mostrado para ambas FPP sintasas aviar y de *Bacillus stearothermophilus* (Tarshis, L.C., Proteau, P. J., Kellogg, B. A., Sacchettini, J. C., Poulter, C. D. 1996. "Regulation of Product Chain Length by Isoprenyl Diphosphate Synthases". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 15018-15023; Ohnuma, S., Narita, K., Nakazawa, T., Ishida, C., Takeuchi, Y., Ohto, C. y Nichino, T. 1996. "A Role of the Amino Acid Residue Located on the Fifth Position Before the First Aspartate rich Motif of Farnesyl Diphosphate Synthase on Determination of the Final Product". J. Biol. Chem. 271: 30748-30754; patente de EE.UU. 5.766.911). En el caso de la enzima de *Bacillus*, el aminoácido en la quinta posición antes de la primera región rica en aspartato se cambió de tirosina a serina. La enzima aviar contiene una fenilalanina en esta posición. Se cree que los aminoácidos aromáticos en esa posición bloquean la extensión de la cadena de isoprenilo más allá de los 15 carbonos y que la restricción puede aliviarse reemplazando la fenilalanina por un aminoácido menos voluminoso tal como serina.

**[0297]** Como en las FPP sintasas de *Bacillus* mencionadas anteriormente, la FPP sintasa de *Saccharomyces cerevisiae* tiene una tirosina en la quinta posición antes del primer dominio rico en aspartato. Se usó mutagénesis dirigida a sitio para alterar la secuencia del gen *ERG20* para codificar una serina en lugar de una tirosina en esa posición. El procedimiento usado para introducir la mutación se basaba en la amplificación por PCR del plásmido pJMB19-31 completo usando oligonucleótidos mutagénicos que introdujeron la mutación deseada, y se expone en el libro de instrucciones del kit de mutagénesis dirigida a sitio QuikChange (Stratagene). Los oligonucleótidos contenían las secuencias correspondientes a las bases nº 1063 a nº 1097 y el complemento inverso de las bases nº 1063 a nº 1097 del nº de acceso a GeneBank J05091. Las secuencias de los oligonucleótidos se dan a continuación, con los cambios indicados por letras minúsculas. Se hizo una alteración de A a T en la posición nº 1084 para cambiar el aminoácido codificado de tirosina a serina. Se hizo también una alteración de T a C en la posición nº 1074 creando un nuevo sitio *PstI*, que permitía una identificación rápida del gen mutante. Esta última mutación era silenciosa al no cambiar el aminoácido codificado.

SEQ ID NO:50:

Y95S-SN 5'-GCATTGAGTTGcTGCAGGCTTcCTTCTTGGTCGCC-3'

SEQ ID NO:51:

Y95S-ASN 5'-GGCGACCAAGAAGgAAGCCTGCAgCAACTCAATGC-3'

**[0298]** Se usaron los dos oligonucleótidos para amplificar pJMB19-31, y se ligó el producto de PCR resultante consigo mismo para volver a formar el plásmido circular, excepto porque el gen *ERG20* contenía ahora la mutación deseada. El plásmido resultante se designa como pHS31.Y95S, y se transformó este plásmido en la cepa SWE23-DE91 mutante *erg9* formando SWE23-DE91/pHS31.Y95S. Se llevaron a cabo experimentos de matraz agitado para comparar la producción de farnesol y GG por cepas que sobreexpresan el gen *ERG20* natural y el gen *ERG20* mutado. Se cultivaron las cepas durante una noche en SCE-ura y se usó éste para inocular matraces que contenían medio YPDE. Se cultivaron estos cultivos a 30ºC durante 72 h y se recogieron después para análisis de peso celular seco e isoprenoides. Se presentan en la Tabla 27 los datos de este experimento.

**TABLA 27**

| Cepa | FPP sintasa | Peso celular seco | Farnesol | | GG | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | mg/ml | mg/ml | % de peso seco | mg/ml | % de peso seco |
| SWE23/DE91/ JMB19-31 | Natural | 4,7 | 0,22 | 4,76 | 0,05 | 1,1 |
| SWE23-DE91/ pHS31.Y95S | Mutante Tyr a Ser | 4,9 | 0,01 | 0,2 | 0,13 | 2,7 |

**[0299]** Estos datos muestran que la relación de farnesol:GG se altera drásticamente mediante la sobreexpresión del mutante de tyr a ser del gen *ERG20* en la cepa mutante *erg9*. La cepa que sobreexpresa el gen *ERG20* mutante exhibía proporcionalmente más GG que la cepa que sobreexpresa el gen *ERG20* natural. Además, la cantidad total de GG producida por la cepa que sobreexpresa el *ERG20* mutante era mayor, mientras que la cantidad total de farnesol era menor, en comparación con la cepa que sobreexpresa el gen *ERG20* natural. La disminución del nivel de farnesol no se reflejaba completamente en el conjunto de GG, sugiriendo que parte del FPP puede convertirse en otros compuestos además de GG. Como alternativa, es posible que la inhibición por realimentación desempeñe un papel en la regulación de la cantidad de GG acumulada por estas cepas.

En los siguientes párrafos, numerados de 1 a 173, se describen aspectos adicionales de la presente descripción:

1. Un procedimiento para producir α-tocoferol o ésteres de α-tocoferilo que comprende: (a) producir biológicamente un compuesto seleccionado del grupo que consiste en farnesol y geranilgeraniol; y (b) convertir químicamente dicho compuesto en α-tocoferol o un éster de α-tocoferilo.

2. El procedimiento del párrafo 1, en el que dicho compuesto es geranilgeraniol que tiene un primer, segundo, tercero y cuarto restos olefínicos, y en el que dicha etapa de convertir químicamente comprende: (a) reducir al

menos uno de dichos segundo, tercero y cuarto restos olefínicos de dicho geranilgeraniol para formar un alcohol alílico; y (b) formar α-tocoferol o un éster de α-tocoferilo a partir de dicho alcohol alílico y una hidroquinona.

3. El procedimiento del párrafo 2, en el que dicha etapa de reducción (a) comprende: añadir un grupo protector a dicho geranilgeraniol para proteger de la reducción el primer resto olefínico de dicho geranilgeraniol; y reducir al menos uno de los segundo, tercero y cuarto restos olefínicos de dicho geranilgeraniol protegido; y eliminar dicho grupo protector de dicho geranilgeraniol protegido para proporcionar dicho alcohol alílico.

4. El procedimiento del párrafo 3, en el que dicho grupo protector es un grupo protector de hidroxilo.

5. El procedimiento del párrafo 4, en el que dicho grupo protector de hidroxilo es un éster.

6. El procedimiento del párrafo 5, en el que dicho éster se selecciona del grupo que consiste en isobutirato y pivaloato.

7. El procedimiento del párrafo 2, en el que dicha etapa de reducción comprende la hidrogenación.

8. El procedimiento del párrafo 2, en el que dicho alcohol alílico comprende fitol.

9. El procedimiento del párrafo 2, en el que la formación de dicho α-tocoferol o un éster de α-tocoferilo comprende poner en contacto dicho alcohol alílico con un ácido en presencia de dicha hidroquinona.

10. El procedimiento del párrafo 2, en el que dicha hidroquinona es una trimetil hidroquinona.

11. El procedimiento del párrafo 10, en el que dicha hidroquinona de trimetilo es la 2,3,5-trimetil hidroquinona.

12. El procedimiento del párrafo 1, en el que dicho compuesto es farnesol y en el que dicha etapa de convertir químicamente comprende: (a) convertir farnesol a un primer intermedio que comprende átomos de carbono suficientes para formar un grupo sustituyente trimetiltridecilo de vitamina E cuando dicho intermedio se hace reaccionar con una hidroquinona para formar la vitamina E; y (b) hacer reaccionar dicho compuesto intermedio con una hidroquinona para formar la vitamina E.

13. El procedimiento del párrafo 12, en el que dicha etapa de conversión comprende: oxidar dicho farnesol a farnesal; y formar una metil cetona a partir de dicho farnesal.

14. El procedimiento del párrafo 13, que comprende además: reducir restos olefínicos en dicha metil cetona para formar una alquil metil cetona; y formar un alcohol alílico a partir de dicha alquil metil cetona.

15. El procedimiento del párrafo 12, en el que dicho intermedio comprende isofitol.

16. El procedimiento del párrafo 12, en el que dicha hidroquinona es una trimetil hidroquinona.

17. El procedimiento de la sección 16, en el que dicha trimetil hidroquinona es la 2,3,5-trimetil hidroquinona.

18. El procedimiento del párrafo 1, en el que dicho compuesto es farnesol y en el que dicha etapa de convertir químicamente comprende: (a) oxidar dicho farnesol a farnesal; (b) formar una metil cetona a partir de dicho farnesal; (c) reducir restos olefínicos en dicha metil cetona para formar una alquil metil cetona; (d) formar un alcohol alílico a partir de dicha alquil metil cetona, en el que dicho alcohol alílico comprende un número suficiente de átomos de carbono para formar al menos un grupo sustituyente trimetiltridecilo de vitamina E cuando la vitamina E se forma a partir de dicho alcohol alílico y una hidroquinona correspondiente; y (e) formar la vitamina E a partir de dicho compuesto y una hidroquinona.

19. El procedimiento del párrafo 18, en el que dicho alcohol alílico comprende isofitol.

20. El procedimiento del párrafo 18, en el que dicha hidroquinona es una trimetil hidroquinona.

21. El procedimiento del párrafo 20, en el que dicha trimetil hidroquinona es 2,3,5-trimetil hidroquinona.

22. El procedimiento del apartado 1, en el que dicho compuesto es farnesol.

23. El procedimiento del apartado 1, en el que dicho compuesto es geranilgeraniol.

24. Un procedimiento para producir α-tocoferol o ésteres de α-tocoferilo que comprende: (a) cultivar un microorganismo en un medio de fermentación para producir un producto seleccionado del grupo que consiste en

fosfato de farnesilo, farnesol, fosfato de geranilgeranilo y geranilgeraniol, en el que se reduce la acción de la escualeno sintasa de dicho microorganismo; (b) recuperar dicho producto; y (c) convertir químicamente dicho producto en α-tocoferol o un éster de α-tocoferilo.

25. El procedimiento del párrafo 24, en el que dicho medio de fermentación comprende un inhibidor de la escualeno sintasa.

26. El procedimiento del párrafo 24, en el que dicho microorganismo se modifica genéticamente para disminuir la acción de la escualeno sintasa.

27. El procedimiento del párrafo 26, en el que dicho microorganismo se modifica genéticamente adicionalmente para incrementar la acción de la HMG-CoA reductasa.

28. El procedimiento del párrafo 27, en el que la acción de la HMG-CoA reductasa se incrementa mediante la sobreexpresión de HMG-CoA reductasa o el dominio catalítico de la misma en el microorganismo.

29. El procedimiento del párrafo 28, en el que dicho microorganismo se modifica genéticamente adicionalmente para incrementar la acción de una proteína seleccionada del grupo que consiste en acetoacetil Co-A tiolasa, HMG-CoA sintasa, mevalonato quinasa, fosfomevalonato quinasa, fosfomevalonato descarboxilasa, isopentenil pirofosfato isomerasa, farnesil pirofosfato sintasa, D-1-desoxixilulosa 5-fosfato sintasa, y 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa.

30. El procedimiento del párrafo 29, en el que el microorganismo ha sido modificado genéticamente para incrementar la acción de la farnesil pirofosfato sintasa.

31. El procedimiento del párrafo 30, en el que el microorganismo ha sido modificado genéticamente para sobreexpresar la farnesil pirofosfato sintasa.

32. El procedimiento del párrafo 24, en el que dicho microorganismo es un mutante erg9.

33. El procedimiento del párrafo 32, en el que dicho microorganismo comprende un alelo de supresión/inserción *erg9A::HIS3*.

34. El procedimiento del párrafo 24, en el que dicha etapa de recuperación comprende recuperar dicho producto de dicho microorganismo.

35. El procedimiento del párrafo 24, en el que dicho producto se secreta en dicho medio de fermentación por dicho microorganismo y en el que dicha etapa de recuperación comprende la purificación de dicho producto de dicho medio de fermentación.

36. El procedimiento del párrafo 24, en el que dicho microorganismo es un hongo.

37. El procedimiento del párrafo 36, en el que dicho hongo ha sido modificado genéticamente para expresar al menos una parte de las enzimas en la ruta independiente de mevalonato.

38. El procedimiento del párrafo 37, en el que dicho hongo ha sido modificado genéticamente para expresar una enzima seleccionada del grupo que consiste en D-1-desoxixilulosa 5-fosfato sintasa, y 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa.

39. El procedimiento del párrafo 36, en el que dicho hongo es una levadura y dicha levadura es bloqueada en la ruta de ergosterol y se modifica genéticamente para captar esteroles exógenos en condiciones aeróbicas.

40. El procedimiento del párrafo 24, en el que dicho microorganismo es una bacteria.

41. El procedimiento del párrafo 40, en el que dicha bacteria ha sido modificada genéticamente para expresar al menos una parte de las enzimas en la ruta del mevalonato.

42. El procedimiento del párrafo 41, en el que dicha bacteria ha sido modificada genéticamente para expresar una enzima seleccionada del grupo que consiste de acetoacetil Co-A tiolasa, HMG-CoA sintasa, HMG-CoA reductasa, mevalonato quinasa, fosfomevalonato quinasa, y fosfomevalonato descarboxilasa.

43. El procedimiento del párrafo 24, en el que dicho microorganismo es una microalga.

44. El procedimiento del párrafo 43, en el que dicha microalga se selecciona del grupo que consiste de Chlorella y

Prototheca.

45. El procedimiento del párrafo 24, en el que dicho microorganismo ha sido modificado genéticamente para incrementar la acción de la fosfatasa.

46. El procedimiento del párrafo 29, en el que el microorganismo ha sido modificado genéticamente para incrementar la acción de la geranilgeranilo pirofosfato sintasa.

47. El procedimiento del párrafo 46, en el que el microorganismo ha sido modificado genéticamente para sobreexpresar la geranilgeranilo pirofosfato sintasa.

48. Un procedimiento para producir α-tocoferol o ésteres de α-tocoferilo que comprende: (a) producir biológicamente un primer compuesto seleccionado del grupo que consiste en geranilgeraniol y pirofosfato de geranilgeranilo; (b) poner en contacto dicho primer compuesto con una geranilgeranilo reductasa para formar un segundo compuesto seleccionado del grupo que consiste en fitol y difosfato de fitilo; y (c) convertir químicamente dicho segundo compuesto en α-tocoferol o un éster de α-tocoferilo.

49. Un procedimiento, como se redacta en el párrafo 48, en el que dicha etapa de contacto se realiza in vivo utilizando un microorganismo que tiene actividad de geranilgeranilo reductasa.

50. Un procedimiento, como se redacta en el párrafo 48, en el que dicha etapa de contacto se realiza en un proceso biotransformación.

51. Un procedimiento, como se redacta en el párrafo 48, en el que dicho primer compuesto es geranilgeraniol y dicho segundo compuesto es fitol.

52. Un procedimiento, como se redacta en el párrafo 48, en el que dicho primer compuesto es pirofosfato de geranilgeranilo y dicho segundo compuesto es difosfato de fitilo.

53. Un procedimiento, como se redacta en el párrafo 48, en el que dicha etapa de convertir químicamente comprende reaccionar dicho segundo compuesto o un derivado del mismo con una hidroquinona para formar α-tocoferol o un éster de α-tocoferilo.

54. Un procedimiento, como se redacta en el párrafo 48, en el que dicha etapa de contacto comprende purificar dicho primer compuesto y transformar dicho primer compuesto con geranilgeranilo reductasa aislada o microorganismos que tienen actividad de geranilgeranilo reductasa.

55. El procedimiento del párrafo 54, en el que dicho microorganismo se modifica genéticamente adicionalmente para incrementar la acción de la geranilgeranilo reductasa.

56. El procedimiento del párrafo 55, en el que la acción de la geranilgeranilo reductasa se incrementa mediante la sobreexpresión de la geranilgeranilo reductasa.

57. Un procedimiento para producir un compuesto seleccionado del grupo que consiste en farnesol y geranilgeraniol que comprende: (a) cultivar un microorganismo en un medio de fermentación que comprende un compuesto seleccionado del grupo que consiste en isoprenol y prenol para producir un producto seleccionado del grupo que consiste en fosfato de farnesilo, farnesol, fosfato de geranilgeranilo y geranilgeraniol; y (b) recuperar dicho producto.

58. El procedimiento del párrafo 57, en el que dicho microorganismo se modifica genéticamente adicionalmente para incrementar la acción de la dimetilalil transferasa.

59. El procedimiento del párrafo 58, en el que la acción de la dimetilalil transferasa se incrementa mediante la sobreexpresión de la dimetilalil transferasa en el microorganismo.

60. El procedimiento del párrafo 59, en el que el microorganismo ha sido modificado genéticamente para incrementar la acción de la farnesil pirofosfato sintasa.

61. El procedimiento del párrafo 60, en el que el microorganismo ha sido modificado genéticamente para sobreexpresar la farnesil pirofosfato sintasa.

62. El procedimiento del párrafo 59, en el que el microorganismo ha sido modificado genéticamente para incrementar la acción de la geranilgeranilo pirofosfato sintasa.

63. El procedimiento del párrafo 60, en el que el microorganismo ha sido modificado genéticamente para

sobreexpresar la geranilgeranilo pirofosfato sintasa.

64. El procedimiento del párrafo 57, en el que el microorganismo ha sido modificado genéticamente para incrementar la acción de una enzima seleccionada del grupo que consiste en isoprenol quinasa y prenol quinasa.

65. El procedimiento del párrafo 57, en el que el microorganismo ha sido modificado genéticamente para sobreexpresar una enzima seleccionada del grupo que consiste en isoprenol quinasa y prenol quinasa.

66. El procedimiento del párrafo 57, en el que dicho microorganismo es un mutante *erg9*.

67. Un procedimiento para producir farnesol que comprende: (a) cultivar un microorganismo en un medio de fermentación para producir un producto seleccionado del grupo que consiste en fosfato de farnesilo y farnesol, en el que se reduce la acción de la escualeno sintasa de dicho microorganismo; y (b) recuperar dicho producto.

68. El procedimiento del párrafo 67, en el que dicho medio de fermentación comprende un inhibidor de la escualeno sintetasa.

69. El procedimiento del párrafo 67, en el que dicho microorganismo se modifica genéticamente para disminuir la acción de la escualeno sintasa.

70. El procedimiento del párrafo 69, en el que dicho microorganismo se modifica genéticamente adicionalmente para incrementar la acción de la HMG-CoA reductasa.

71. El procedimiento del párrafo 70, en el que la acción de la HMG-CoA reductasa se incrementa mediante la sobreexpresión de la HMG-CoA reductasa o el dominio catalítico de la misma en el microorganismo.

72. El procedimiento del párrafo 70, en el que dicho microorganismo se modifica genéticamente adicionalmente para incrementar la acción de una proteína seleccionada del grupo que consiste en acetoacetil Co-A tiolasa, HMG-CoA sintasa, mevalonato quinasa, fosfomevalonato quinasa, fosfomevalonato descarboxilasa, isopentenil pirofosfato isomerasa, farnesil pirofosfato sintasa, D-1-desoxixilulosa 5-fosfato sintasa, y 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa.

73. El procedimiento del párrafo 72, en el que el microorganismo ha sido modificado genéticamente para incrementar la acción de la farnesil pirofosfato sintasa.

74. El procedimiento del párrafo 73, en el que el microorganismo ha sido modificado genéticamente para sobreexpresar la farnesil pirofosfato sintasa.

75. El procedimiento del párrafo 67, en el que dicho microorganismo es un mutante *erg9*.

76. El procedimiento del párrafo 75, en el que dicho microorganismo comprende un alelo de supresión/inserción *erg9a::HIS3*.

77. El procedimiento del párrafo 67, en el que dicha etapa de recuperación comprende recuperar dicho producto de dicho microorganismo.

78. El procedimiento del párrafo 67, en el que dicho producto se secreta en dicho medio de fermentación por dicho microorganismo y en el que dicha etapa de recuperación comprende la purificación de dicho producto de dicho medio de fermentación.

79. El procedimiento del párrafo 67, en el que dicho producto es fosfato de farnesilo y farnesol intracelular y dicha etapa de recuperación comprende aislar dicho fosfato de farnesilo y farnesol de dicho microorganismo.

80. El procedimiento del párrafo 67, en el que dicho producto es fosfato de farnesilo intracelular y dicha etapa de recuperación comprende además desfosforilar dicho fosfato de farnesilo para producir farnesol.

81. El procedimiento del párrafo 67, en el que dicho microorganismo es un hongo.

82. El procedimiento del párrafo 81, en el que dicho hongo ha sido modificado genéticamente para expresar al menos una parte de las enzimas en la ruta independiente de mevalonato.

83. El procedimiento del párrafo 82, en el que dicho hongo ha sido modificado genéticamente para expresar una enzima seleccionada del grupo que consiste en D-1-desoxixilulosa 5-fosfato sintasa, y 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa.

84. El procedimiento del párrafo 81, en el que dicho hongo es una levadura y dicha levadura es bloqueada en la ruta de ergosterol y se modifica genéticamente para captar esteroles exógenos en condiciones aeróbicas.

85. El procedimiento del párrafo 67, en el que dicho microorganismo es una bacteria.

86. El procedimiento del párrafo 85, en el que dicha bacteria ha sido modificada genéticamente para expresar al menos una parte de las enzimas en la ruta del mevalonato.

87. El procedimiento del párrafo 86, en el que dicha bacteria ha sido modificada genéticamente para expresar una enzima seleccionada del grupo que consiste en acetoacetil Co-A tiolasa, HMG-CoA sintasa, HMG CoA reductasa, mevalonato quinasa, fosfomevalonato quinasa, y fosfomevalonato descarboxilasa.

88. El procedimiento del párrafo 67, en el que dicho microorganismo es una microalga.

89. El procedimiento del párrafo 88, en el que dicha microalga se selecciona del grupo que consiste en Chlorella y Prototheca.

90. Un microorganismo para la producción de farnesol mediante un proceso biosintético, teniendo dicho microorganismo una modificación genética para reducir la acción de la escualeno sintasa en dicho microorganismo y una modificación genética para incrementar la acción de una proteína seleccionada del grupo que consiste en acetoacetil Co-A tiolasa, HMG-CoA sintasa, HMG-CoA reductasa, mevalonato quinasa, fosfomevalonato quinasa, fosfomevalonato descarboxilasa, isopentenil pirofosfato isomerasa, farnesil pirofosfato sintasa, D-1-desoxixilulosa 5-fosfato sintasa, y 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa.

91. El microorganismo del párrafo 90, en el que dicha modificación genética para incrementar la acción de una proteína comprende la integración de múltiples copias de genes para dicha proteína en el genoma de dicho microorganismo.

92. El microorganismo del párrafo 91, en el que dicha modificación genética para incrementar la acción de una proteína incrementa la expresión de un gen que codifica dicha proteína.

93. El microorganismo del párrafo 92, en el que dicho microorganismo modificado genéticamente es un mutante erg9.

94. Un procedimiento para producir geranilgeraniol que comprende: (a) cultivar un microorganismo en un medio de fermentación para producir un producto seleccionado del grupo que consiste en fosfato de geranilgeranilo y geranilgeraniol, en el que se reduce la acción de la escualeno sintasa de dicho microorganismo; y (b) recuperar dicho producto.

95. El procedimiento del párrafo 94, en el que dicho medio de fermentación comprende un inhibidor de la escualeno sintasa.

96. El procedimiento del párrafo 94, en el que dicho microorganismo se modifica genéticamente para disminuir la acción de la escualeno sintasa.

97. El procedimiento del párrafo 96, en el que dicho microorganismo se modifica genéticamente adicionalmente para incrementar la acción de la HMG-CoA reductasa.

98. El procedimiento del párrafo 97, en el que la acción de la HMG-CoA reductasa se incrementa mediante la sobreexpresión de la HMG-CoA reductasa o el dominio catalítico de la misma en el microorganismo.

99. El procedimiento del párrafo 97, en el que dicho microorganismo se modifica genéticamente adicionalmente para incrementar la acción de una proteína seleccionada del grupo que consiste en acetoacetil Co-A tiolasa, HMG-CoA sintasa, mevalonato quinasa, fosfomevalonato quinasa, fosfomevalonato descarboxilasa, isopentenil pirofosfato isomerasa, farnesil pirofosfato sintasa, D-1-desoxixilulosa 5-fosfato sintasa, y 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa.

100. El procedimiento del párrafo 99, en el que el microorganismo ha sido modificado genéticamente para incrementar la acción de la geranilgeranilo pirofosfato sintasa.

101. El procedimiento del párrafo 100, en el que el microorganismo ha sido modificado genéticamente para sobreexpresar la geranilgeranilo pirofosfato sintasa.

102. El procedimiento del párrafo 94, en el que dicho microorganismo es un mutante *erg9*.

103. El procedimiento del párrafo 102, en el que dicho microorganismo comprende un alelo de supresión/inserción *erg9a::HIS3*.

104. El procedimiento del párrafo 94, en el que dicha etapa de recuperación comprende la recuperación de dicho producto de dicho microorganismo.

105. El procedimiento del párrafo 94, en el que dicho producto se secreta en dicho medio de fermentación por dicho microorganismo y en el que dicha etapa de recuperación comprende la purificación de dicho producto de dicho medio de fermentación.

106. El procedimiento del párrafo 94, en el que dicho producto es fosfato de geranilgeranilo intracelular y geranilgeraniol intracelular y extracelular y dicha etapa de recuperación comprende aislar dicho fosfato de geranilgeranilo y geranilgeraniol de dicho microorganismo y aislar geranilgeraniol de dicho medio de fermentación.

107. El procedimiento del párrafo 94, en el que dicho producto es fosfato de geranilgeranilo intracelular y dicha etapa de recuperación comprende además desfosforilar dicho fosfato de geranilgeranilo para producir geranilgeraniol.

108. El procedimiento del párrafo 94, en el que dicho microorganismo es un hongo.

109. El procedimiento del párrafo 108, en el que dicho hongo ha sido modificado genéticamente para expresar al menos una parte de las enzimas en la ruta independiente de mevalonato.

110. El procedimiento del párrafo 109, en el que dicho hongo ha sido modificado genéticamente para expresar una enzima seleccionada del grupo que consiste en D-1-desoxixilulosa 5-fosfato sintasa, y 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa.

111. El procedimiento del párrafo 108, en el que dicho hongo es una levadura y dicha levadura es bloqueada en la ruta de ergosterol y se modifica genéticamente para captar esteroles exógenos en condiciones aeróbicas.

112. El procedimiento del párrafo 94, en el que dicho microorganismo es una bacteria.

113. El procedimiento del párrafo 112, en el que dicha bacteria ha sido modificada genéticamente para expresar al menos una parte de las enzimas en la ruta del mevalonato.

114. El procedimiento del párrafo 113, en el que dicha bacteria ha sido modificada genéticamente para expresar una enzima seleccionada del grupo que consiste en acetoacetil Co-A tiolasa, HMG-CoA sintasa, HMG-CoA reductasa, mevalonato quinasa, fosfomevalonato quinasa, y fosfomevalonato descarboxilasa.

115. El procedimiento del párrafo 94, en el que dicho microorganismo es una microalga.

116. El procedimiento del párrafo 115, en el que dicha microalga se selecciona del grupo que consiste en Chlorella y Prototheca.

117. Un microorganismo para la producción de geranilgeraniol mediante un proceso biosintético, teniendo dicho microorganismo una modificación genética para reducir la acción de la escualeno sintasa en dicho microorganismo y una modificación genética para incrementar la acción de una proteína seleccionada del grupo que consiste en acetoacetil Co-A tiolasa, HMG-CoA sintasa, HMG-CoA reductasa, mevalonato quinasa, fosfomevalonato quinasa, fosfomevalonato descarboxilasa, isopentenil pirofosfato isomerasa, farnesil pirofosfato sintasa, D-1-desoxixilulosa 5-fosfato sintasa, y 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa.

118. El microorganismo del párrafo 117, en el que dicha modificación genética para incrementar la acción de una proteína comprende integrar múltiples copias de genes para dicha proteína en el genoma de dicho microorganismo.

119. El microorganismo del párrafo 117, en el que dicha modificación genética para incrementar la acción de una proteína aumenta la expresión de un gen que codifica dicha proteína.

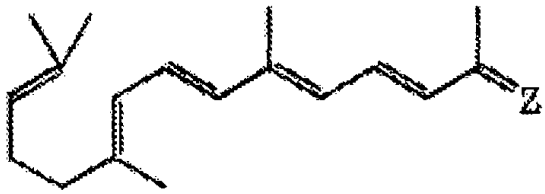
120. El microorganismo del párrafo 117, en el que dicho microorganismo modificado genéticamente es un mutante *erg9*.

121. Un procedimiento para producir vitamina A a partir de farnesol que comprende: (a) preparar un compuesto polienocarbonilo α,β-insaturado a partir de farnesol; y (b) ciclar dicho compuesto polienocarbonilo α,β-insaturado para formar un compuesto polienocarbonilo α,β-insaturado cíclico; y (c) convertir dicho compuesto polienocarbonilo

α,β-insaturado cíclico en vitamina A.

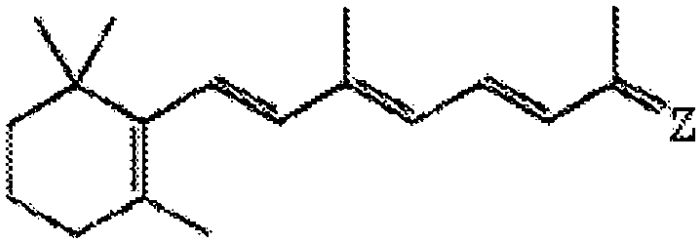
122. El procedimiento del párrafo 121, en el que dicha etapa de preparación comprende: oxidar dicho farnesol a farnesal; y formar dicho compuesto polienocarbonilo α,β-insaturado a partir de dicho farnesal.

123. El procedimiento del párrafo 121, en el que dicho compuesto polienocarbonilo α,β-insaturado es de la fórmula:



en el que Z es O o $CHCO_2R$, y R es hidrocarbilo $C_1$-$C_{10}$.

124. El procedimiento del párrafo 121, en el que dicho compuesto polienocarbonilo α,β-insaturado es de la fórmula:



en el que Z es O o $CHCO_2R$, y R es hidrocarbilo $C_1$-$C_{10}$.

125. El procedimiento del párrafo 124, en el que Z es $CHCO_2R$.

126. El procedimiento del párrafo 125, en el que dicha etapa de conversión comprende la reducción de un grupo éster a un grupo alcohol.

127. El procedimiento del párrafo 124, en el que Z es O.

128. El procedimiento del párrafo 127, en el que dicha etapa de conversión comprende: la realización de una reacción química para transformar Z de O a $CHCO_2R$ o CHCN; y reducir Z para formar la vitamina A.

129. El procedimiento del párrafo 121, en el que dicho farnesol se produce biológicamente.

130. El procedimiento del párrafo 129, en el que la producción biológica comprende: (a) cultivar un microorganismo en un medio de fermentación para producir un producto seleccionado del grupo que consiste en fosfato de farnesilo y farnesol, en el que se reduce la acción de la escualeno sintasa de dicho microorganismo; y (b) recuperar dicho producto.

131. El procedimiento del párrafo 130, en el que dicho microorganismo se modifica genéticamente para disminuir la acción de la escualeno sintasa.

132. El procedimiento del párrafo 131, en el que dicho microorganismo se modifica genéticamente adicionalmente para incrementar la acción de la HMG-CoA reductasa.

133. El procedimiento del párrafo 132, en el que la acción de la HMG-CoA reductasa se incrementa mediante la sobreexpresión de la HMG-CoA reductasa o el dominio catalítico de la misma en el microorganismo.

134. El procedimiento del párrafo 132, en el que dicho microorganismo se modifica genéticamente adicionalmente para incrementar la acción de una proteína seleccionada del grupo que consiste en acetoacetil Co-A tiolasa, HMG-

CoA sintasa, mevalonato quinasa, fosfomevalonato quinasa, fosfomevalonato descarboxilasa, isopentenil pirofosfato isomerasa, farnesil pirofosfato sintasa, D-1-desoxixilulosa 5-fosfato sintasa, y 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa.

135. El procedimiento del párrafo 134, en el que el microorganismo ha sido modificado genéticamente para incrementar la acción de farnesil pirofosfato sintasa.

136. El procedimiento del párrafo 130, en el que dicho microorganismo es un mutante *erg9*.

137. El procedimiento del párrafo 130, en el que dicho producto se secreta en dicho medio de fermentación por dicho microorganismo y en el que dicha etapa de recuperación comprende la purificación de dicho producto de dicho medio de fermentación.

138. El procedimiento del párrafo 130, en el que dicho producto es fosfato de farnesilo y farnesol intracelular y dicha etapa de recuperación comprende aislar dicho fosfato de farnesilo y farnesol de dicho microorganismo.

139. El procedimiento del párrafo 130, en el que dicho producto es fosfato de farnesilo intracelular y dicha etapa de recuperación comprende además desfosforilar dicho fosfato de farnesilo para producir farnesol.

140. El procedimiento del párrafo 121, en el que dicho microorganismo es un hongo.

141. El procedimiento del párrafo 140, en el que dicho hongo ha sido modificado genéticamente para expresar al menos una parte de las enzimas en la ruta independiente de mevalonato.

142. El procedimiento del párrafo 141, en el que dicho hongo ha sido modificado genéticamente para expresar una enzima seleccionada del grupo que consiste en D-1-desoxixilulosa 5-fosfato sintasa, y 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa.

143. El procedimiento del párrafo 140, en el que dicho hongo es una levadura y dicha levadura es bloqueada en la ruta de ergosterol y se modifica genéticamente para captar esteroles exógenos en condiciones aeróbicas.

144. El procedimiento del párrafo 130, en el que dicho microorganismo es una bacteria.

145. El procedimiento del párrafo 144, en el que dicha bacteria ha sido modificada genéticamente para expresar al menos una parte de las enzimas en la ruta del mevalonato.

146. El procedimiento del párrafo 145, en el que dicha bacteria ha sido modificada genéticamente para expresar una enzima seleccionada del grupo que consiste en acetoacetil Co-A tiolasa, HMG-CoA sintasa, mevalonato quinasa, fosfomevalonato quinasa, y fosfomevalonato descarboxilasa.

147. El procedimiento del párrafo 130, en el que dicho microorganismo es una microalga.

148. El procedimiento del párrafo 147, en el que dicha microalga se selecciona del grupo que consiste en Chlorella y Prototheca.

149. Un procedimiento para producir β-caroteno, que comprende: (a) producir químicamente retinal a partir de farnesol; y (b) someter dicho retinal a una condición de acoplamiento reductor para producir dicho β-caroteno.

150. El procedimiento del párrafo 149, en el que dicha etapa química comprende: (a) preparar un compuesto polienocarbonilo α,β-insaturado a partir de dicho farnesol; y (b) ciclar dicho compuesto polienocarbonilo α,β-insaturado para formar un compuesto polienocarbonilo α,β-insaturado cíclico; (c) convertir dicho compuesto polienocarbonilo α,β-insaturado en retinol; y (d) oxidar dicho retinol a dicho retinal.

151. El procedimiento del párrafo 149, en el que dicho farnesol se produce biológicamente.

152. El procedimiento del párrafo 151, en el que la producción biológica comprende (a) cultivar un microorganismo en un medio de fermentación para producir un producto seleccionado del grupo que consiste en fosfato de farnesilo y farnesol, en el que se reduce la acción de la escualeno sintasa de dicho microorganismo; y (b) recuperar dicho producto.

153. El procedimiento del párrafo 152, en el que dicho microorganismo se modifica genéticamente para disminuir la acción de la escualeno sintasa.

154. El procedimiento del párrafo 153, en el que dicho microorganismo se modifica genéticamente adicionalmente

para incrementar la acción de la HMG-CoA reductasa.

155. El procedimiento del párrafo 154, en el que la acción de la HMG-CoA reductasa se incrementa mediante la sobreexpresión de la HMG-CoA reductasa o el dominio catalítico de la misma en el microorganismo.

156. El procedimiento del párrafo 155, en el que dicho microorganismo se modifica genéticamente adicionalmente para incrementar la acción de una proteína seleccionada del grupo que consiste en acetoacetil Co-A tiolasa, HMG-CoA sintasa, mevalonato quinasa, fosfomevalonato quinasa, fosfomevalonato descarboxilasa, isopentenil pirofosfato isomerasa, farnesil pirofosfato sintasa, D-1-desoxixilulosa 5-fosfato sintasa, y 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa.

157. El procedimiento del párrafo 156, en el que el microorganismo ha sido modificado genéticamente para incrementar la acción de la farnesilo pirofosfato sintasa.

158. El procedimiento del párrafo 152, en el que dicho microorganismo es un mutante *erg9*.

159. El procedimiento del párrafo 152, en el que dicho producto se secreta en dicho medio de fermentación por dicho microorganismo y en el que dicha etapa de recuperación comprende la purificación de dicho producto de dicho medio de fermentación.

160. El procedimiento del párrafo 152, en el que dicho producto es fosfato de farnesilo y farnesol intracelular y dicha etapa de recuperación comprende aislar dicho fosfato de farnesilo y farnesol de dicho microorganismo.

161. El procedimiento del párrafo 152, en el que dicho producto es fosfato de farnesilo intracelular y dicha etapa de recuperación comprende además desfosforilar dicho fosfato de farnesilo para producir farnesol.

162. El procedimiento del párrafo 152, en el que dicho microorganismo es un hongo.

163. El procedimiento del párrafo 162, en el que dicho hongo ha sido modificado genéticamente para expresar al menos una parte de las enzimas en la ruta independiente de mevalonato.

164. El procedimiento del párrafo 162, en el que dicho hongo ha sido modificado genéticamente para expresar una enzima seleccionada del grupo que consiste en D-1-desoxixilulosa 5-fosfato sintasa, y 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa.

165. El procedimiento del párrafo 162, en el que dicho hongo es una levadura y dicha levadura es bloqueada en la ruta de ergosterol y se modifica genéticamente para captar esteroles exógenos en condiciones aeróbicas.

166. El procedimiento del párrafo 152, en el que dicho microorganismo es una bacteria.

167. El procedimiento del párrafo 166, en el que dicha bacteria ha sido modificada genéticamente para expresar al menos una parte de las enzimas en la ruta del mevalonato.

168. El procedimiento del párrafo 167, en el que dicha bacteria ha sido modificada genéticamente para expresar una enzima seleccionada del grupo que consiste en acetil Co-A tiolasa, HMG-CoA sintasa, HMG-CoA reductasa, mevalonato quinasa, fosfomevalonato quinasa, y fosfomevalonato descarboxilasa.

169. El procedimiento del párrafo 152, en el que dicho microorganismo es una microalga.

170. El procedimiento del párrafo 169, en el que dicha microalga se selecciona del grupo que consiste en Chlorella y Prototheca.

171. Un procedimiento para producir β-caroteno que comprende: producir sulfona $C_{-40}$ a partir de un haluro de retinilo y retinilfenilsulfona; y convertir dicha sulfona $C_{-40}$ a β-caroteno.

172. El procedimiento del párrafo 171, en el que dicha etapa de producción comprende poner en contacto dicha retinilfenilsulfona con una base.

173. El procedimiento del párrafo 171, en el que dicha etapa de conversión comprende un proceso de eliminación.

**[0300]** La descripción de la invención anterior se ha presentado con fines de ilustración y descripción. Además, no se pretende que la descripción limite la invención a la forma dada a conocer en el presente documento. Por consiguiente, las variaciones y modificaciones acordes con las enseñanzas anteriores, y la experiencia o el conocimiento de la técnica relevante, están dentro del alcance de la presente invención. Las realizaciones descritas

anteriormente en el presente documento pretenden adicionalmente explicar los mejores modos conocidos de practicar la invención y posibilitar que otros expertos en la técnica utilicen la invención en dichas, u otras, realizaciones y con las diversas modificaciones necesarias por las aplicaciones o usos particulares de la invención.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

**[0301]**

<110> DCV Inc. doing business as Bio-Technical Resources
<120> PROCEDIMIENTO DE PRODUCCIÓN DE VITAMINAS
<130> AHB/FP6722565
<140>
<141> 07-06-1999
<150> 08003596.7
<151> 07-06-1999
<150> 99932295.1
<151> 07-06-1999
<150> PCT/US99/15264
<151> 07-06-1999
<150> 60/091.983
<151> 07-06-1998
<150> 60/091.951
<151> 07-06-1998
<150> 60/091.964
<151> 07-06-1998
<160> 51
<170> PatentIn Ver. 2.0
<210> 1
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(23)
<223> CEBADOR
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR
<400> 1
ctcagtacgc tggtacccgt cac 23
<210> 2
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(27)
<223> CEBADOR
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR
<400> 2
gatggatccc aatatgtgta gctcagg 27
<210> 3
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(22)
<223> CEBADOR
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR
<400> 3
gcgcatccac gggctatata aa 22

<210> 4
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(26)
<223> CEBADOR
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR
<400> 4
gcggatccta ttatgtaagt acttag 26

<210> 5
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(22)
<223> CEBADOR
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR
<400> 5
gagcatccac gggctatata aa 22

<210> 6
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(26)
<223> CEBADOR
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR
<400> 6
tccccccggg cgcagacttc acgctc 26

<210> 7
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(31)
<223> CEBADOR
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR
<400> 7
gatccgcggc tcaagctagc ggtattatgc c 31

<210> 8
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(29)
<223> CEBADOR
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR
<400> 8
gactctagag tttacgagtc tggaaaatc 29

<210> 9
<211> 28

<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(28)
<223> CEBADOR
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR
<400> 9
gtaggatcca tggaattgag caatagag 28

<210> 10
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(33)
<223> CEBADOR
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR
<400> 10
aattccaagc ttgcggccgc tctagaacgc gtg 33

<210> 11
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(32)
<223> CEBADOR
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR
<400> 11
gatccacgcg ttctagagcg gccgcaagct tg 32

<210> 12
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(25)
<223> CEBADOR
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR
<400> 12
gaattcgttt ataaggacag cccga 25

<210> 13
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(26)
<223> CEBADOR
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR
<400> 13
ctgcagtcct taactgacgg cagcga 26

<210> 14
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(52)
<223> CEBADOR
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR
<400> 14
agctgaattc gagctcggta cccgggctct agagtcgacc tgcaggcatg ca 52
<210> 15
<211> 52
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(52)
<223> CEBADOR
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR
<400> 15
agcttgcatg cctccaggtc gactctagag cccgggtacc gagctcgaat tc 52
<210> 16
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(29)
<223> CEBADOR
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR
<400> 16
gacggatccg tggaatattt cggatatcc 29
<210> 17
<211> 34
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(34)
<223> CEBADOR
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR
<400> 17
ctcggatccg gacggattac aacaggtatt gtcc 34
<210> 18
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(31)
<223> CEBADOR
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR
<400> 18
cagaattcac catggccgtg acttcctcct c 31
<210> 19
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> misc_feature

<222> (1)..(32)
<223> CEBADOR
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR
<400> 19
caagatctca tacattcaat cctcatggac ac 32

<210> 20
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(31)
<223> CEBADOR
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR
<400> 20
gagaattctt aacacgcatg atccccacgg c 31

<210> 21
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(32)
<223> CEBADOR
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR
<400> 21
ctggatccgt caaatccgtg aatcgtaacg ag 32

<210> 22
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(33)
<223> CEBADOR
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR
<400> 22
ggccggatcc atattacgta gaaatggctt cag 33

<210> 23
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(27)
<223> CEBADOR
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR
<400> 23
gccgctcgag ggtccttatc tagtttg 27

<210> 24
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(38)
<223> CEBADOR

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR
<400> 24
tctagaggca cctgtcactt tggaaaaaaa atatacgc 38
<210> 25
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(26)
<223> CEBADOR
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR
<400> 25
ccgcgggccg gaaatgctct ctgttc 26
<210> 26
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(26)
<223> CEBADOR
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR
<400> 26
cacgtcgacc attcaaactt tactac 26
<210> 27
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> misc_feature
<222> (11)..(19)
<223> CEBADOR
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR
<400> 27
gagggcccgg tccagacat 19
<210> 28
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(27)
<223> CEBADOR
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR
<400> 28
cccgggtatt gagcacgtga gtatacg 27
<210> 29
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(26)
<223> CEBADOR
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR
<400> 29

ggatccggca agtgcacaaa caatac 26

<210> 30
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> CEBADOR
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR
<400> 30

ccaaatataa ctcgagcttt g 21

<210> 31
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(19)
<223> CEBADOR
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial. CEBADOR
<400> 31

gcaaagtcca ccaccgcag 19

<210> 32
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(27)
<223> CEBADOR
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR
<400> 32

gccacgtgcc cccgggtttc tctagcc 27

<210> 33
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(33)
<223> CEBADOR
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR
<400> 33

ggaaaagagc tcgataatta ttgatgatag atc 33

<210> 34
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> CEBADOR
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR
<400> 34

ccgttttgga tcctagatca g 21

<210> 35

<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(26)
<223> CEBADOR
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR
<400> 35
gttcccgggt tattgtcctg catttg 26

<210> 36
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(28)
<223> CEBADOR
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR
<400> 36
aagagctcat ctgataatag atcaagcg 28

<210> 37
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(26)
<223> CEBADOR
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR
<400> 37
aggagctcaa cgacaataaa tggctg 26

<210> 38
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(24)
<223> CEBADOR
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR
<400> 38
gtcctctaga tcttgaatga aatc 24

<210> 39
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(23)
<223> CEBADOR
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR
<400> 39
ctttgagctc gtacaagaag cag 23

<210> 40
<211> 21
<212> ADN

<213> Secuencia artificial
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(21)
<223> CEBADOR
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR
<400> 40
ctaagctttg cgcccgtgaa g 21
<210> 41
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(24)
<223> CEBADOR
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR
<400> 41
gttctagaag ttttcaaagc agag 24
<210> 42
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(27)
<223> CEBADOR
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR
<400> 42
gggattcgaa ttctgtcgcg ctgtaac 27
<210> 43
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(28)
<223> CEBADOR
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR
<400> 43
tgggatccgt aacggcttta gcgagctg 28
<210> 44
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(20)
<223> CEBADOR
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR
<400> 44
gattccgcgt aaggatcccg 20
<210> 45
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>

<221> misc_feature
<222> (1)..(19)
<223> CEBADOR
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR
<400> 45
ccagcatcta gaccaccag 19
<210> 46
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(35)
<223> CEBADOR
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR
<400> 46
gactgcagct ggccgctggg tattctgtcg tagtt 35
<210> 47
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(32)
<223> CEBADOR
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR
<400> 47
gatctagatc acgcgtacgc agaaggtttt gc 32
<210> 48
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(25)
<223> CEBADOR
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR
<400> 48
gaattccaat tcagcgggta acctt 25
<210> 49
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(29)
<223> CEBADOR
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR
<400> 49
aagctttgct tgaacccaaa agggcggta 29
<210> 50
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> misc_feature

<222> (1)..(35)
<223> CEBADOR
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR
<400> 50
gcattgagtt gctgcaggct tccttcttgg tcgcc 35
<210> 51
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<221> misc_difference
<222> (1)..(35)
<223> CEBADOR
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: CEBADOR
<400> 51
ggcgaccaag aaggaagcct gcagcaactc aatgc 35

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento de fermentación para producir farnesol o geranilgeraniol, o las formas fosfato de los mismos, es decir pirofosfato de farnesilo (FPP) o pirofosfato de geranilgeranilo (GGPP), que comprende:
a) proporcionar un microorganismo que ha sido modificado genéticamente para incrementar el número de copias de genes de HMG-CoA reductasa, cuyo microorganismo es capaz de producir farnesol, geranilgeraniol, FPP o GGPP en un medio de fermentación en el que el medio de fermentación comprende una fuente de carbono en una cantidad inicial entre 1 gramo por litro y 100 gramos por litro de medio de fermentación;
b) cultivar el microorganismo recombinante en condiciones en las que la fuente de carbono en el medio de fermentación se agota y se reconstituye durante la fermentación; y
c) recuperar dicho producto,
en el que se reduce la actividad de escualeno sintasa de dicho microorganismo, y en el que si el microorganismo es capaz de producir geranilgeraniol o GGPP, el microorganismo comprende además un gen que codifica GGPP sintasa.

2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la cantidad inicial de la fuente de carbono es entre 2 gramos por litro y 50 gramos por litro de medio de fermentación.

3. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la fermentación se lleva a cabo en modo de alimentación por lotes, de manera que la fuente de carbono se mantiene en un nivel deseado antes del agotamiento.

4. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el microorganismo alcanza una densidad celular de 10 g/l a 100 g/l.

5. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la fuente de carbono se selecciona del grupo que consiste en monosacáridos, disacáridos y trisacáridos.

6. Procedimiento, según la reivindicación 5, en el que la fuente de carbono es glucosa.

7. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la concentración de nitrógeno asimilable en la etapa de cultivo se mantiene en menos de 20 g/l en el medio de fermentación.

8. Procedimiento, según la reivindicación 7, en el que la concentración de nitrógeno asimilable se mantiene en menos de 5 g/l en el medio de fermentación.

9. Procedimiento, según la reivindicación 8, en el que la concentración de nitrógeno asimilable se deja que se agote de las fuentes de nitrógeno durante la fermentación.

10. Procedimiento, según la reivindicación 7, en el que la fuente de nitrógeno se selecciona del grupo que consiste en amoniaco anhidro y sales de amonio.

11. Procedimiento, según la reivindicación 7, en el que la fuente de nitrógeno se selecciona del grupo que consiste en hidrolizados de proteína, hidrolizados de biomasa microbiana, peptona, extracto de levadura, sulfato de amonio, urea y aminoácidos.

12. Procedimiento, según la reivindicación 9, en el que las condiciones de cultivo se mantienen entre 20ºC y 45ºC.

13. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1-12, en el que dicho microorganismo es una levadura.

14. Procedimiento, según la reivindicación 13, en el que la levadura es *Saccharomyces cerevisiae*.

15. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha HMG-CoA reductasa (HMGR) es una HMGR truncada en la que se ha extraído el dominio regulador.

16. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la HMGR está integrada en el genoma del microorganismo.

17. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho microorganismo es un mutante *erg9*.

18. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el microorganismo comprende niveles elevados de HMG CoA reductasa, junto con niveles elevados de mevalonato quinasa, fosfomevalonato quinasa, difosfomevalonato descarboxilasa e IPP isomerasa.

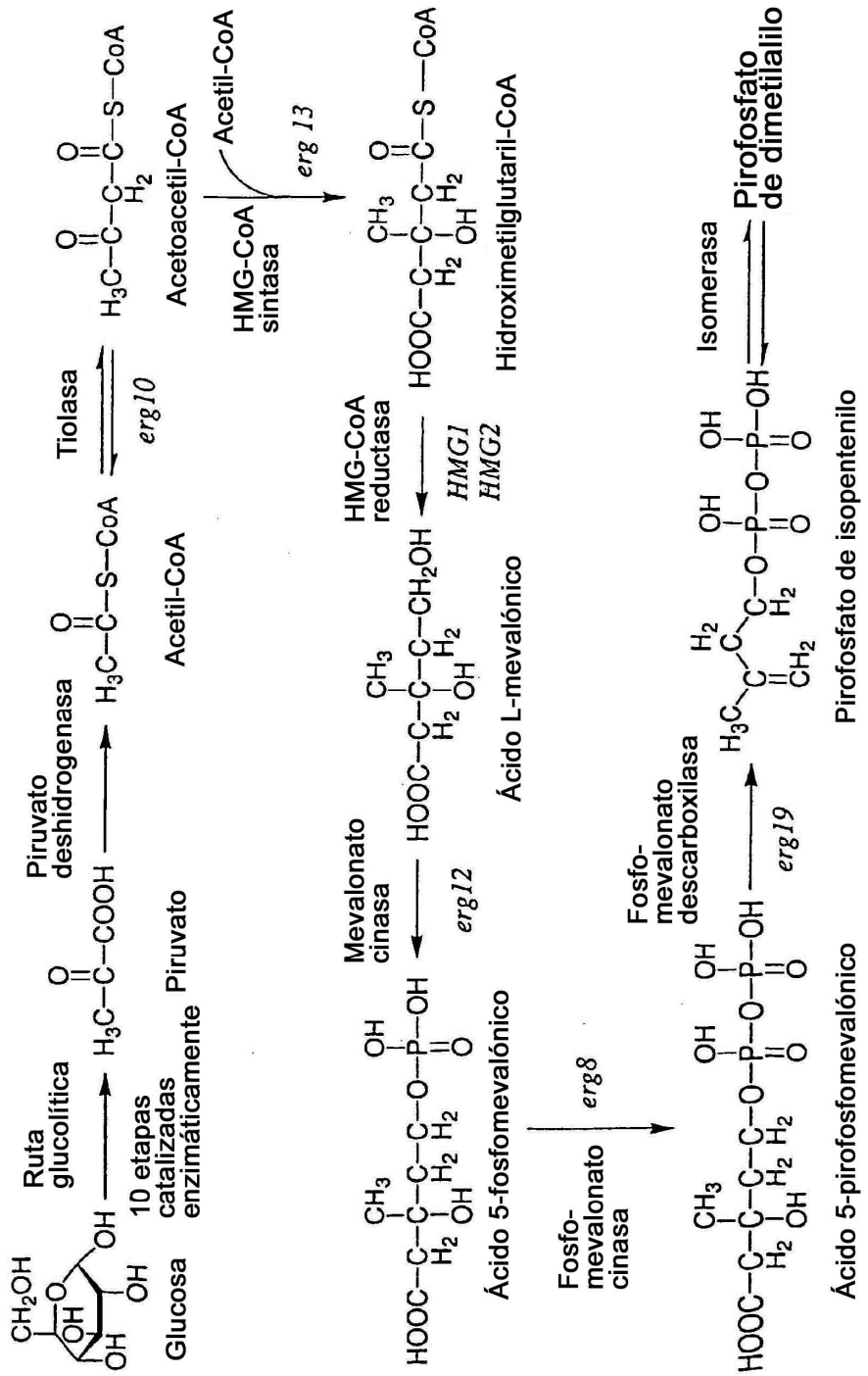

Glucosa
Ruta glucolítica
10 etapas catalizadas enzimáticamente
Piruvato
Piruvato deshidrogenasa
Acetil-CoA
Tiolasa
erg10
Acetoacetil-CoA
HMG-CoA sintasa
Acetil-CoA
erg 13
Ácido 5-fosfomevalónico
Fosfo-mevalonato cinasa
erg8
Mevalonato cinasa
erg12
Ácido L-mevalónico
HMG-CoA reductasa
HMG1
HMG2
Hidroximetilglutaril-CoA
Ácido 5-pirofosfomevalónico
Fosfo-mevalonato descarboxilasa
erg19
Pirofosfato de isopentenilo
Isomerasa
Pirofosfato de dimetilalilo

FIG. 1A-i

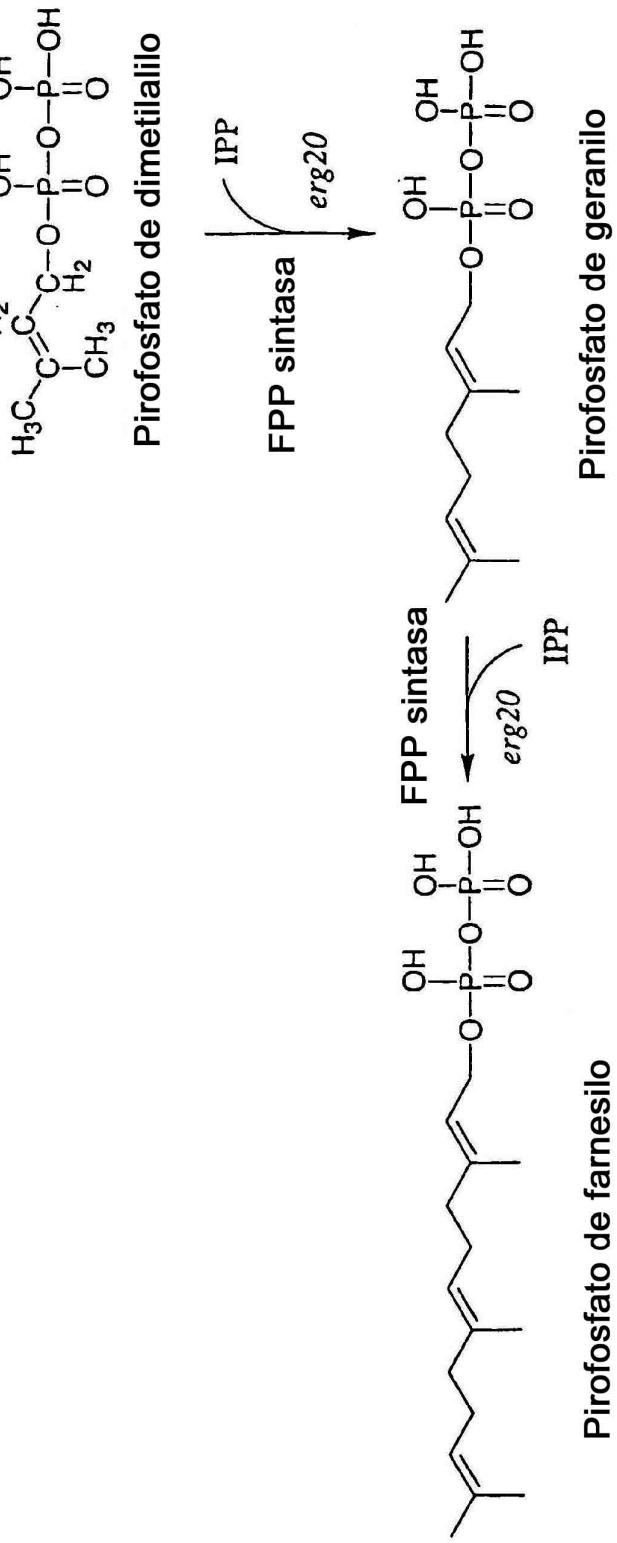

Pirofosfato de dimetilalilo
IPP
FPP sintasa
erg20
Pirofosfato de geranilo
FPP sintasa
IPP
erg20
Pirofosfato de farnesilo

FIG. 1A-ii

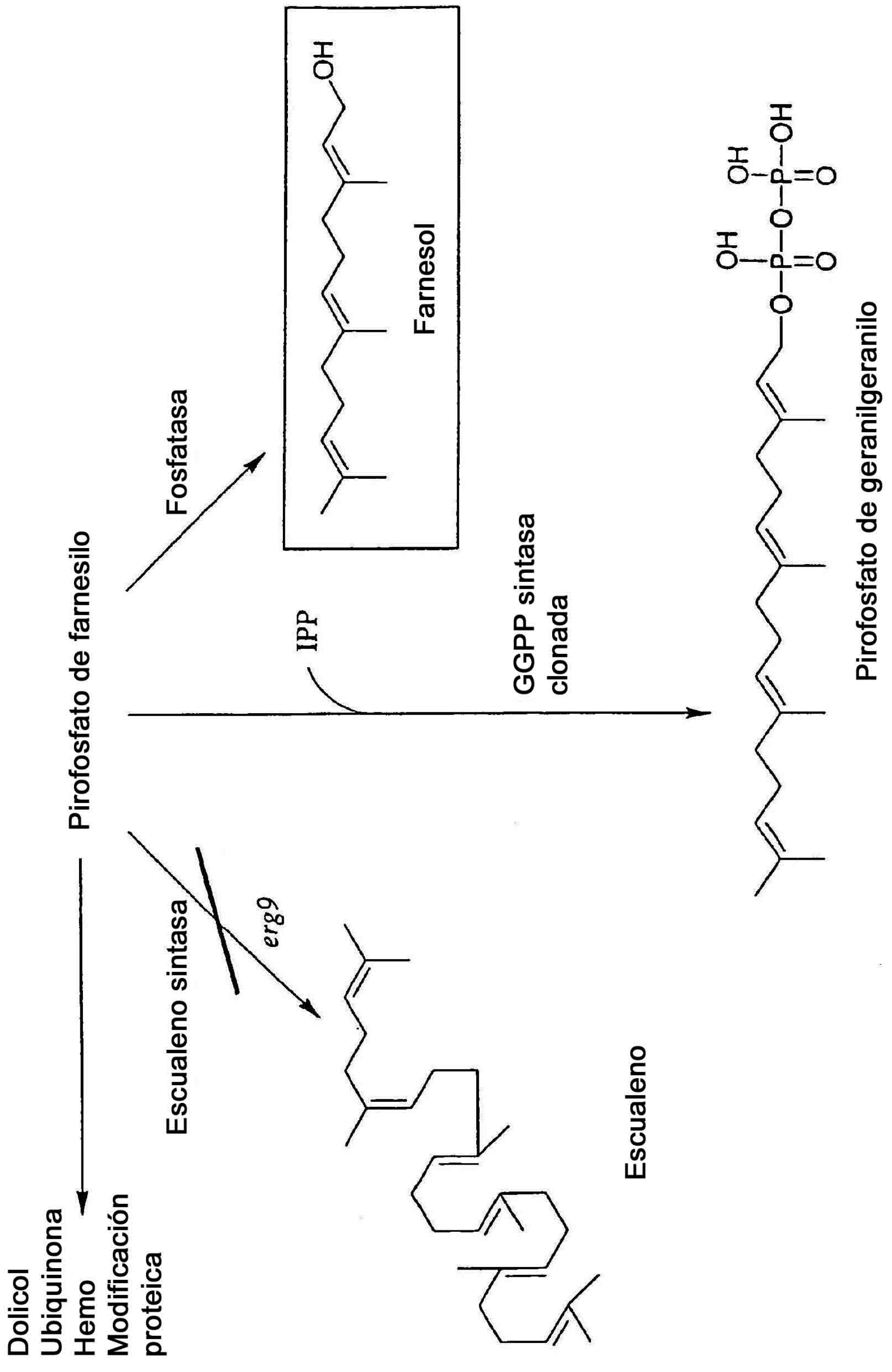

Pirofosfato de farnesilo
Fosfatasa
Farnesol
OH
IPP
GGPP sintasa clonada
Pirofosfato de geranilgeranilo
Escualeno sintasa
erg9
Escualeno
Dolicol
Ubiquinona
Hemo
Modificación proteica

FIG. 1A-iii

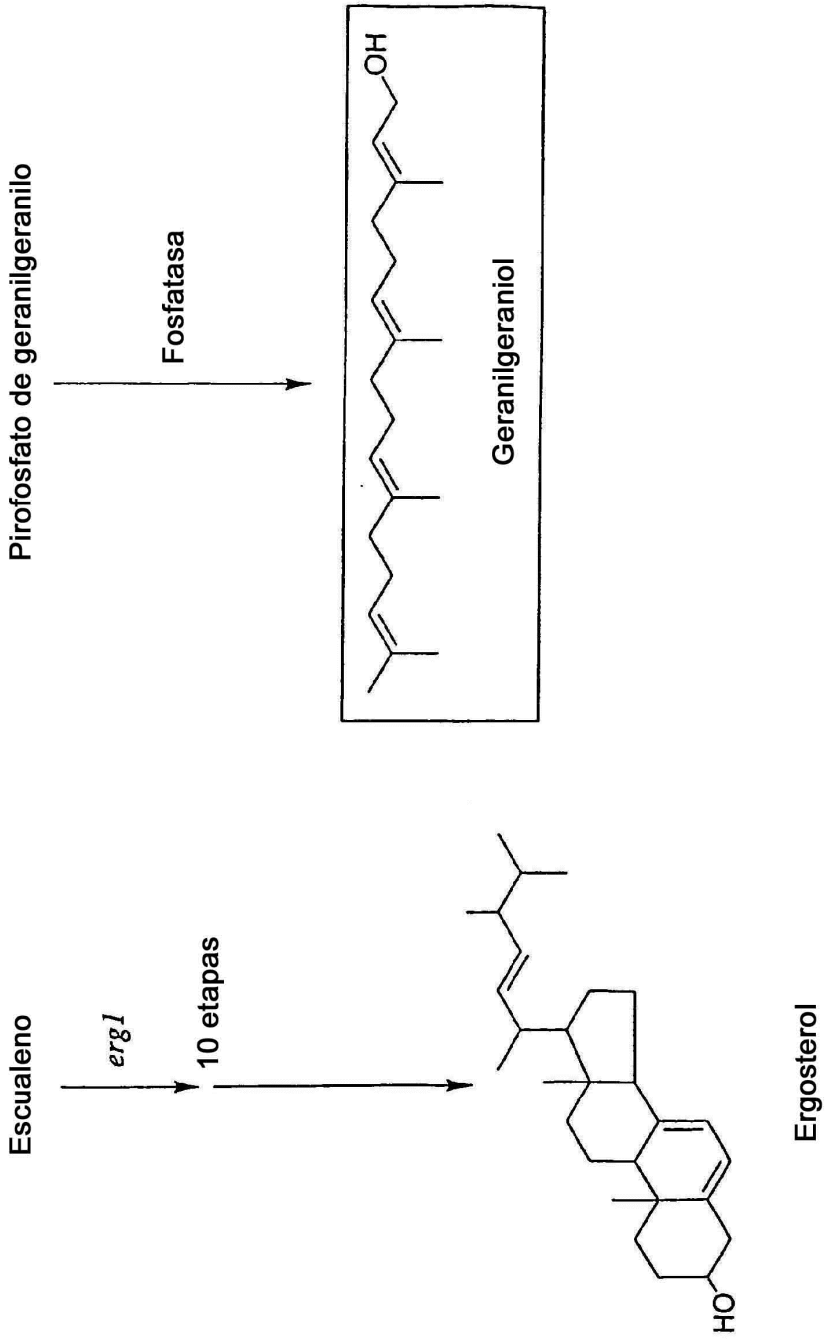

Pirofosfato de geranilgeranilo
Fosfatasa
OH
Geranilgeraniol
Escualeno
erg1
10 etapas
HO
Ergosterol

FIG. 1A-iv

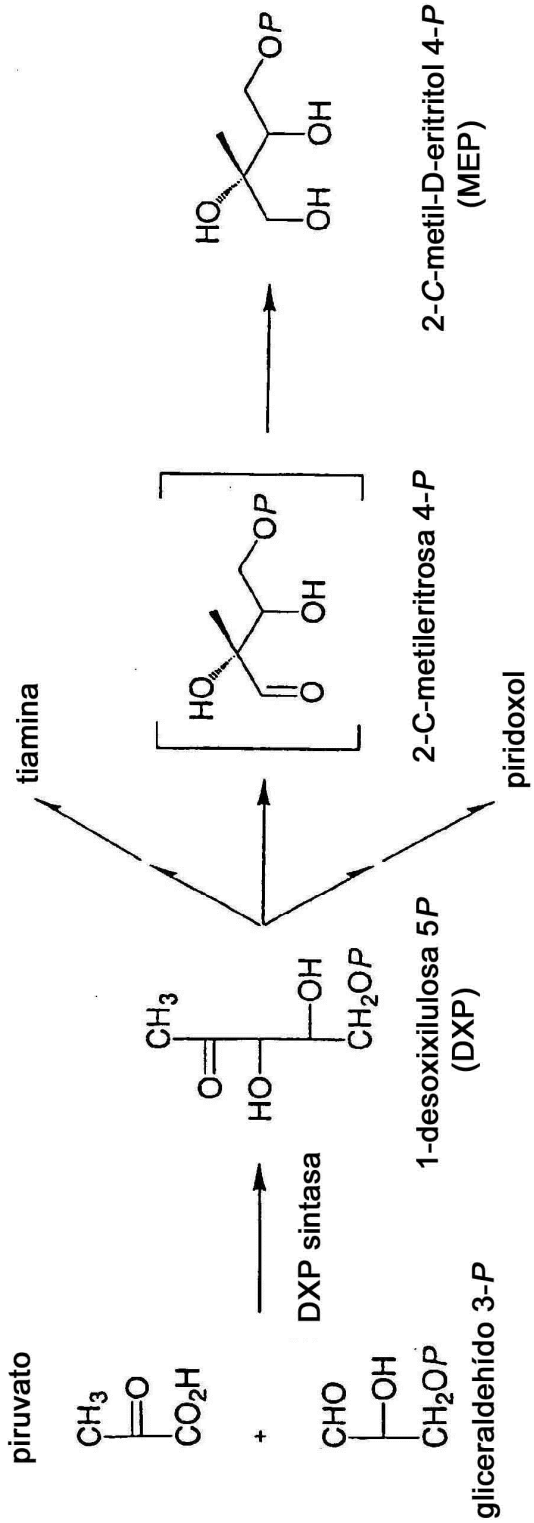

piruvato
gliceraldehído 3-P
DXP sintasa
1-desoxixilulosa 5P
(DXP)
tiamina
piridoxol
2-C-metileritrosa 4-P
2-C-metil-D-eritritol 4-P
(MEP)

FIG. 1B-i

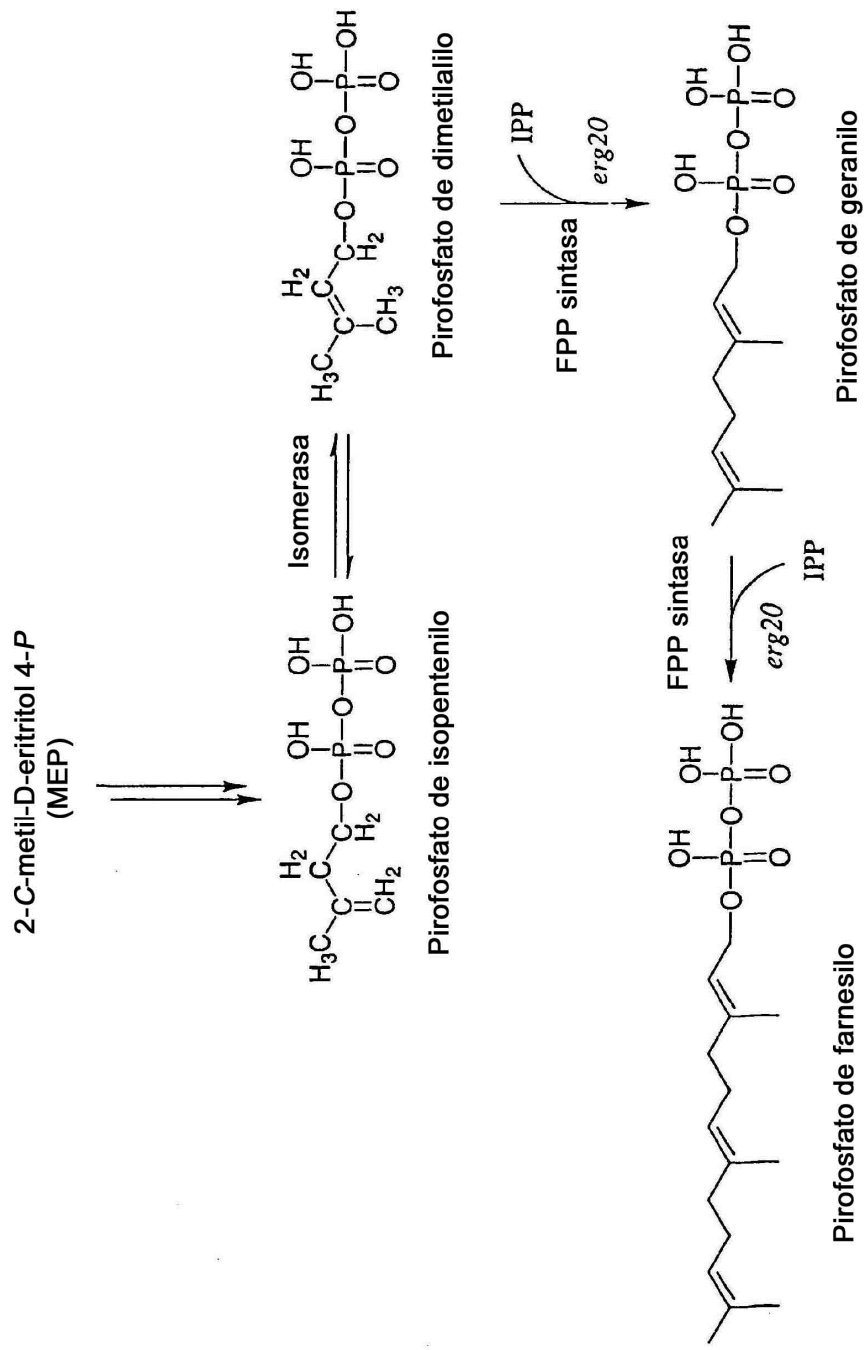

2-C-metil-D-eritritol 4-P
(MEP)
Isomerasa
Pirofosfato de isopentenilo
Pirofosfato de dimetilalilo
IPP
FPP sintasa
erg20
Pirofosfato de geranilo
FPP sintasa
IPP
erg20
Pirofosfato de farnesilo

FIG. 1B-ii

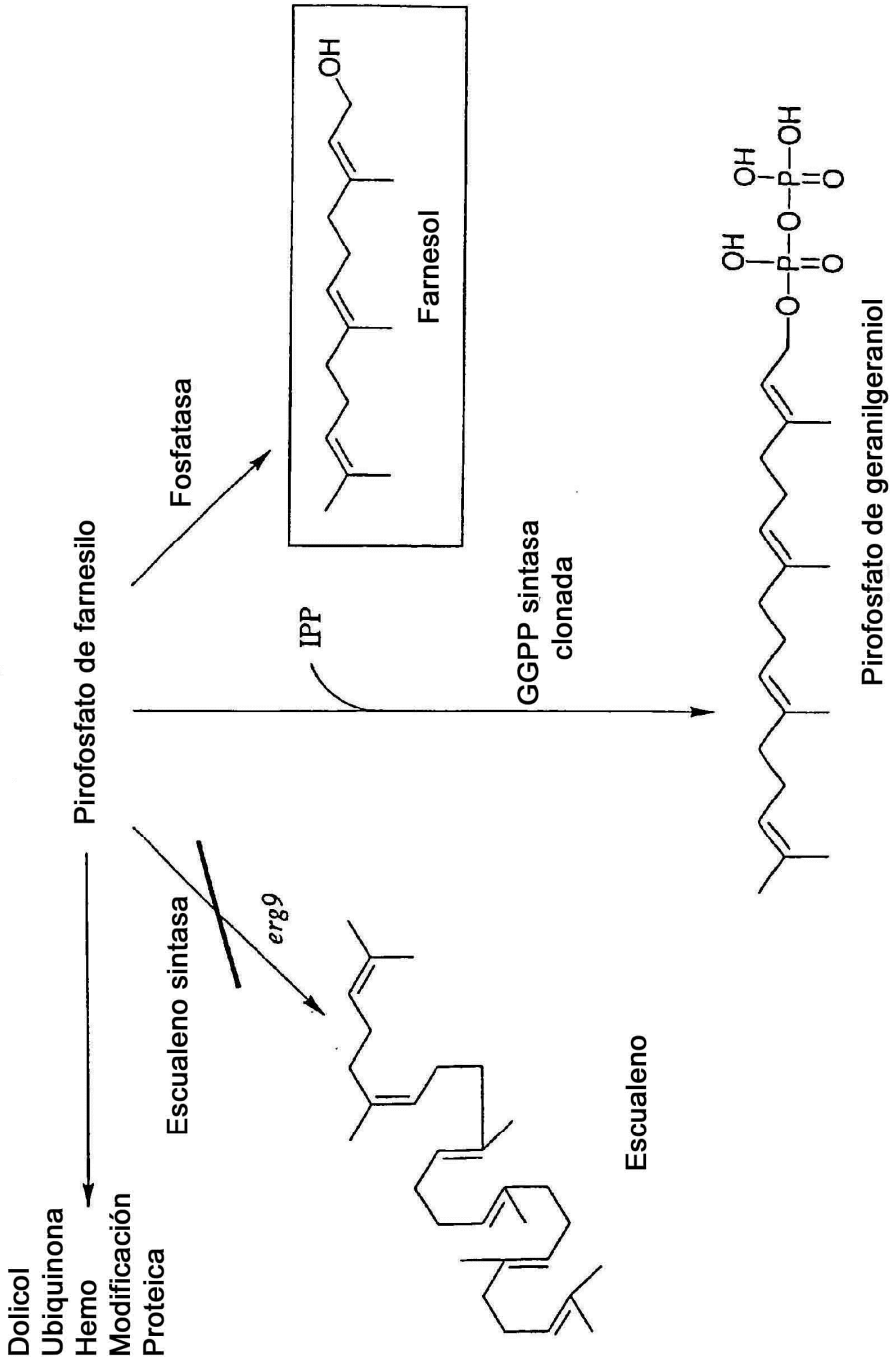

Pirofosfato de farnesilo
Fosfatasa
Farnesol
OH
IPP
GGPP sintasa clonada
Pirofosfato de geranilgeraniol
OH
OH
OH
Escualeno sintasa
erg9
Escualeno
Dolicol
Ubiquinona
Hemo
Modificación Proteica

FIG. 1B-iii

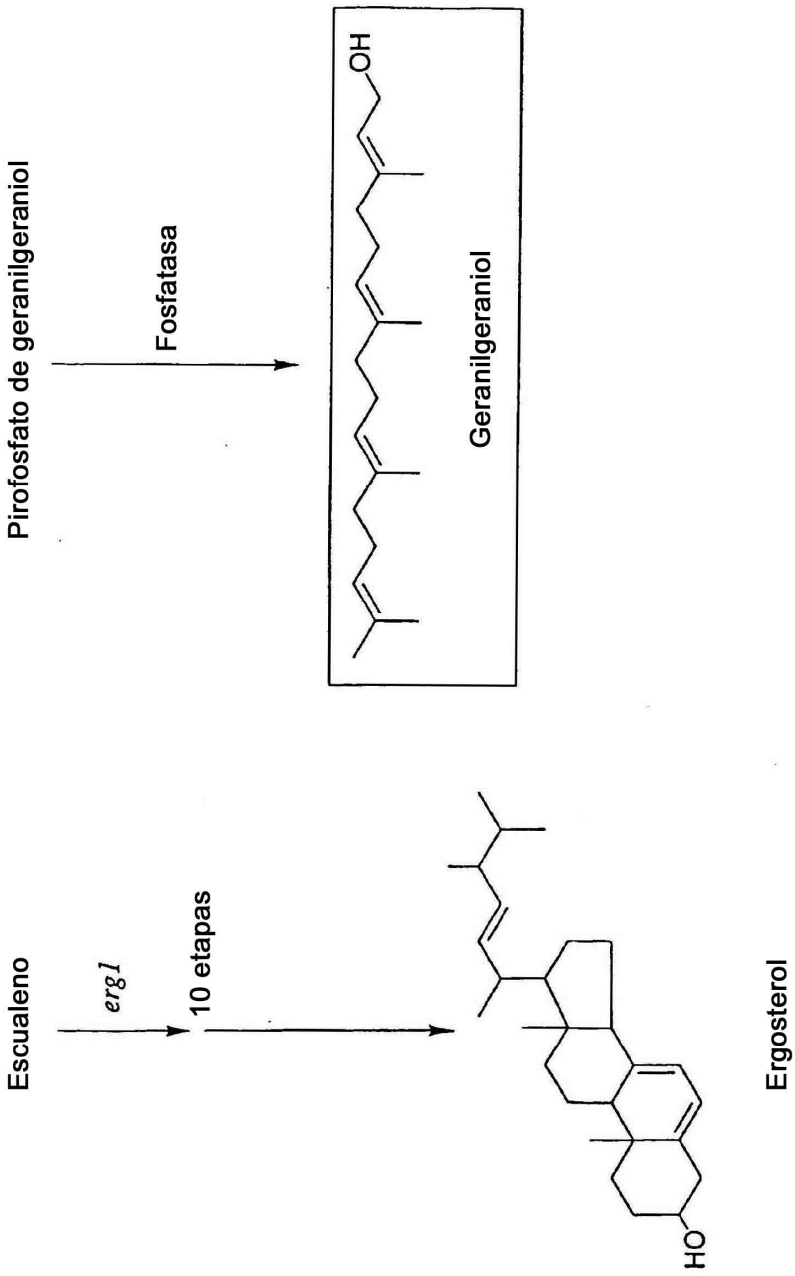

Pirofosfato de geranilgeraniol
Fosfatasa
OH
Geranilgeraniol
Escualeno
erg1
10 etapas
HO
Ergosterol

FIG. 1B-iv

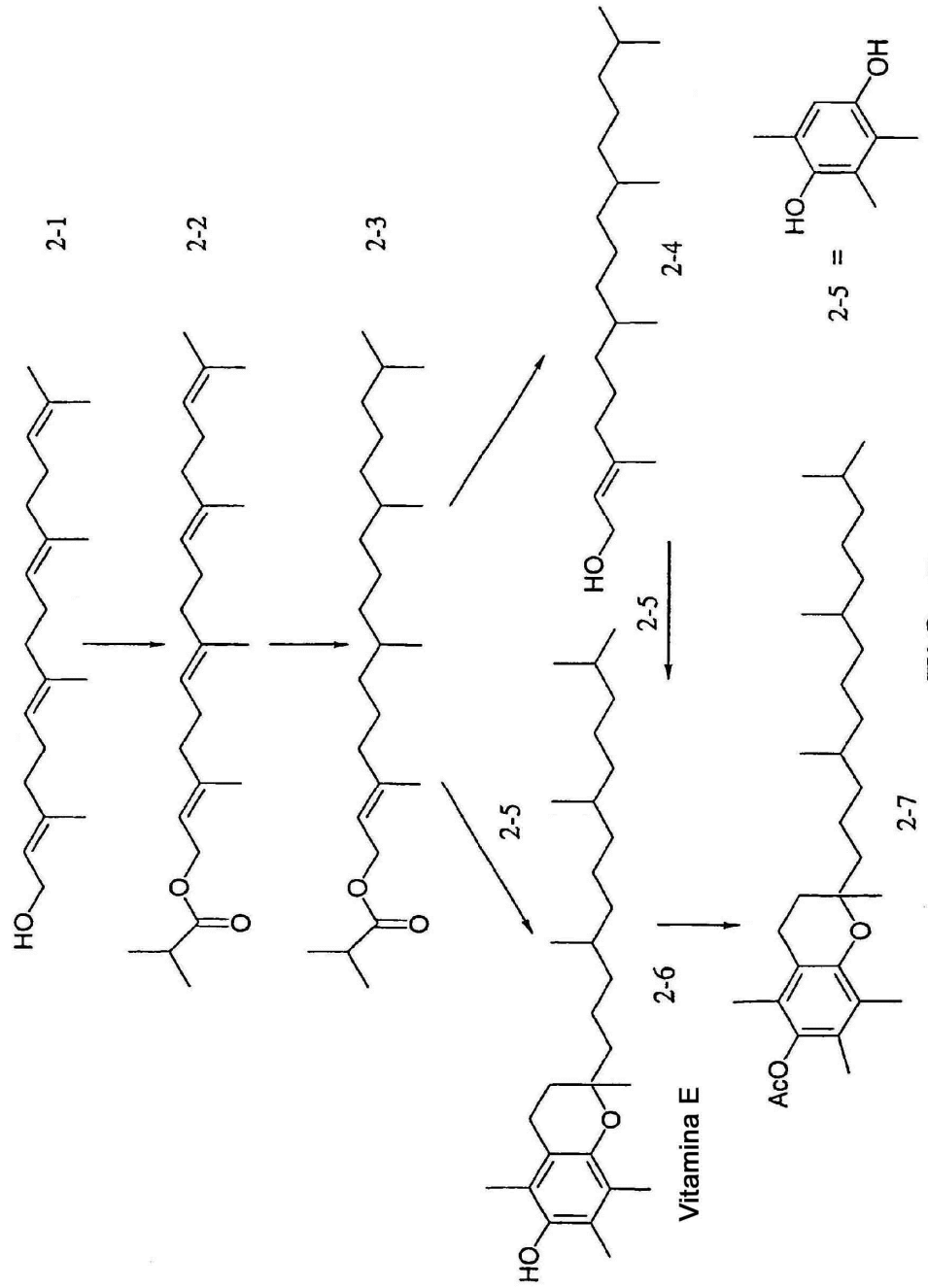



FIG. 2

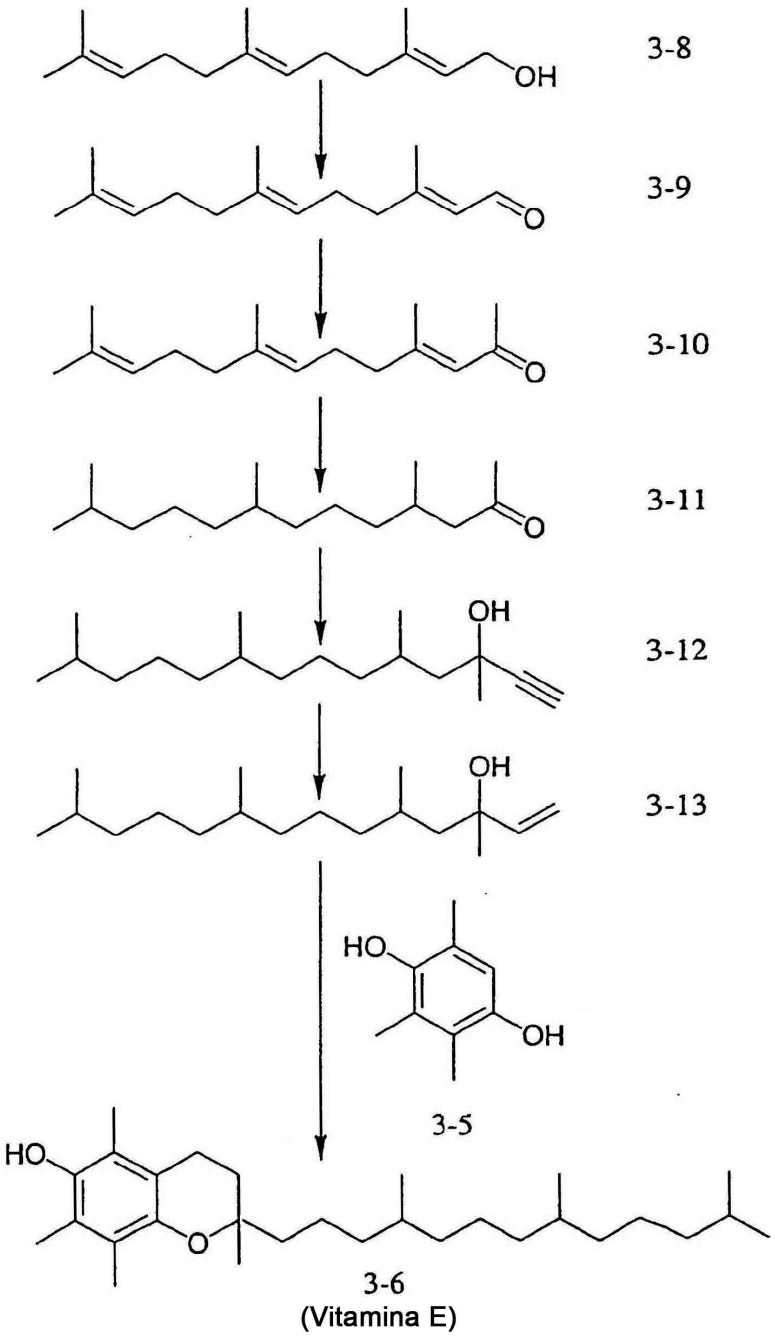



FIG. 3

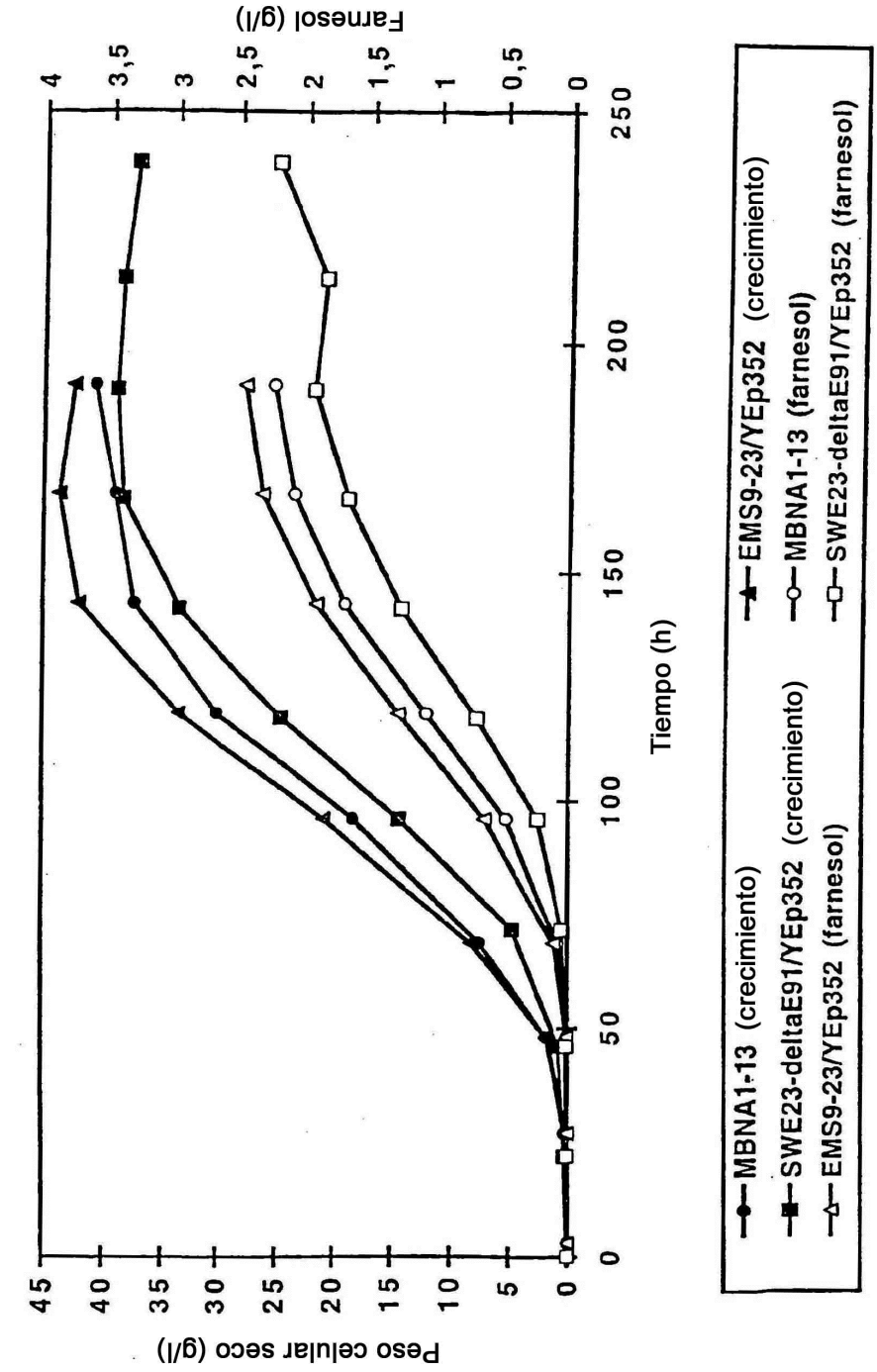

Farnesol (g/l)
4
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
Peso celular seco (g/l)
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
0
50
100
150
200
250
Tiempo (h)
MBNA1-13 (crecimiento)
SWE23-deltaE91/YEp352 (crecimiento)
EMS9-23/YEp352 (farnesol)
EMS9-23/YEp352 (crecimiento)
MBNA1-13 (farnesol)
SWE23-deltaE91/YEp352 (farnesol)

FIG. 4

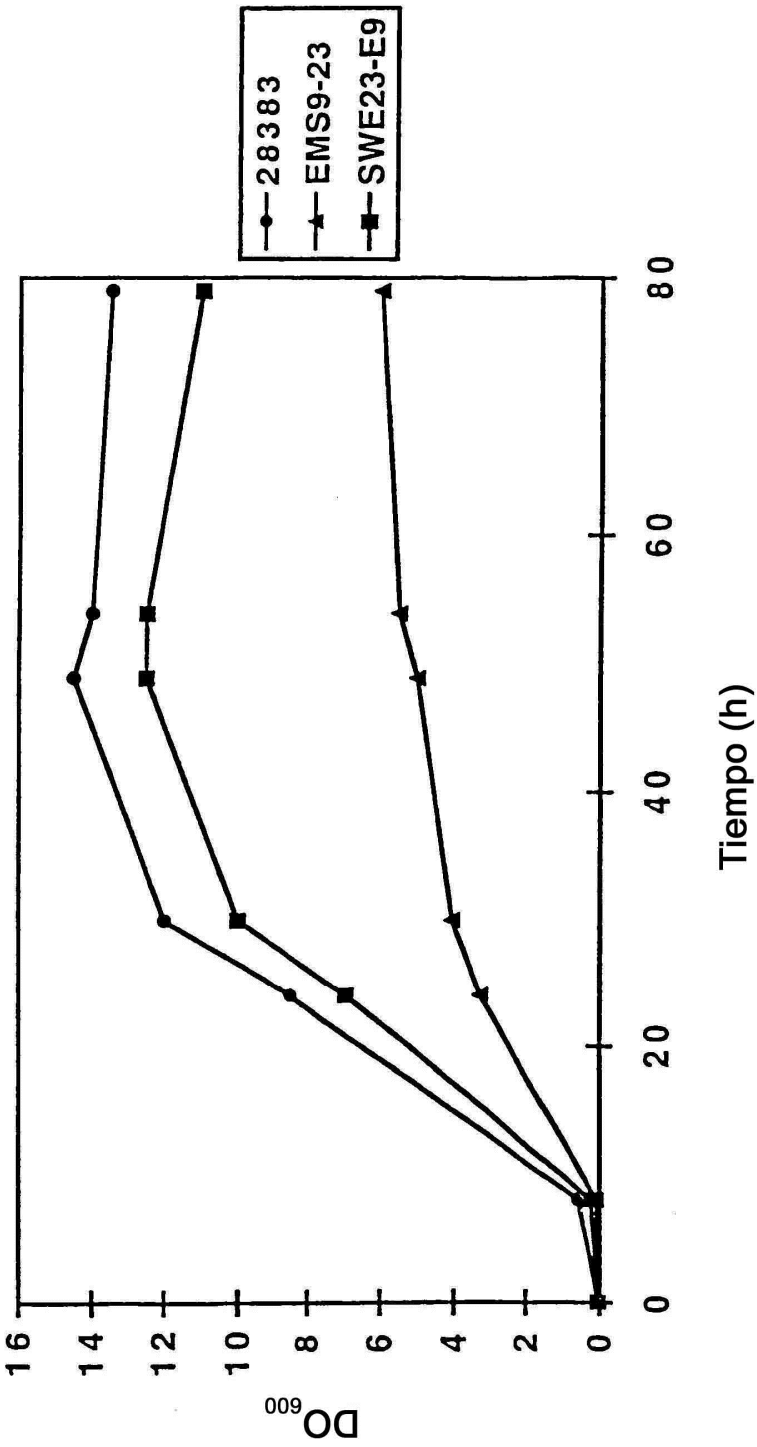

28383
EMS9-23
SWE23-E9
DO600
0
2
4
6
8
10
12
14
16
0
20
40
60
80
Tiempo (h)

FIG. 5

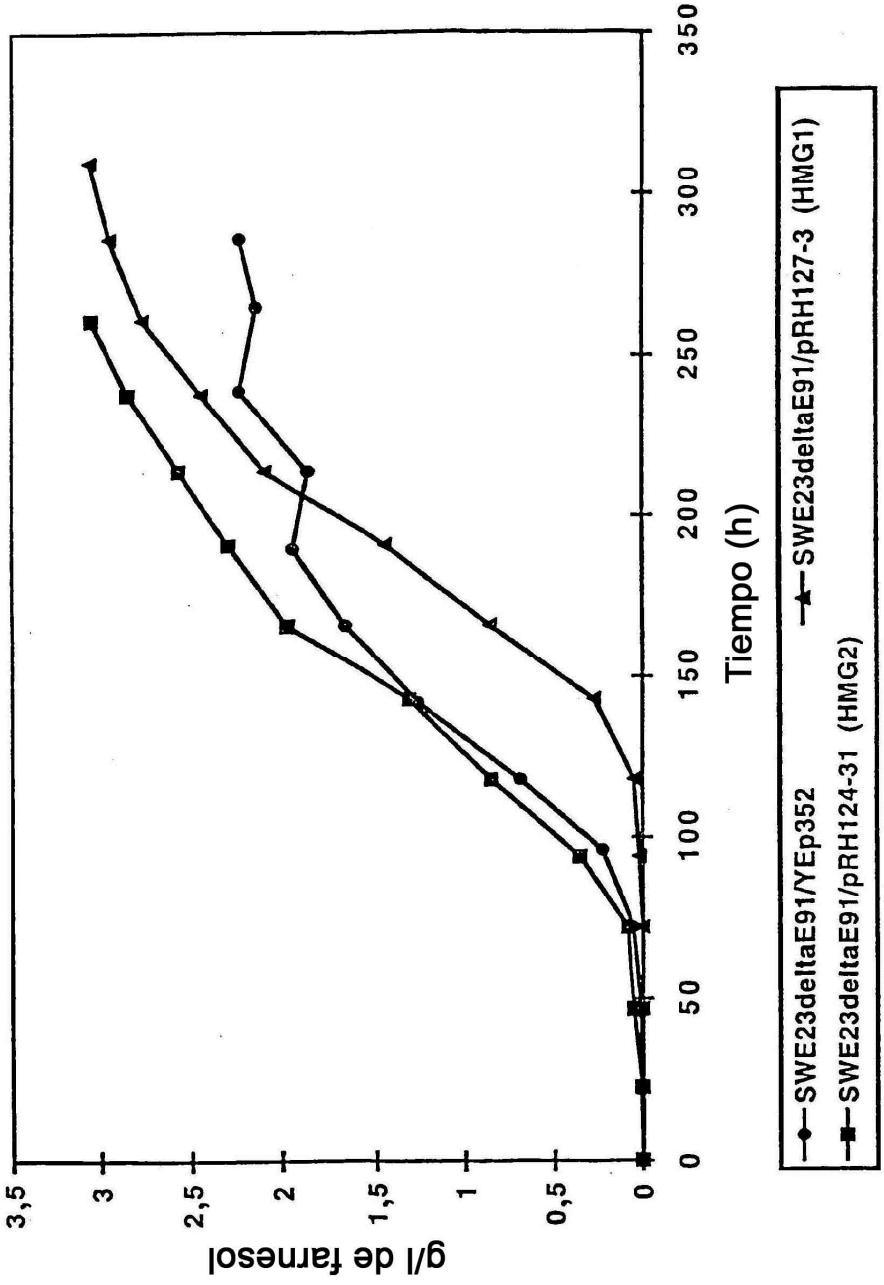

g/l de farnesol
3,5
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
0
50
100
150
200
250
300
350
Tiempo (h)
SWE23deltaE91/YEp352
SWE23deltaE91/pRH124-31 (HMG2)
SWE23deltaE91/pRH127-3 (HMG1)

FIG. 6

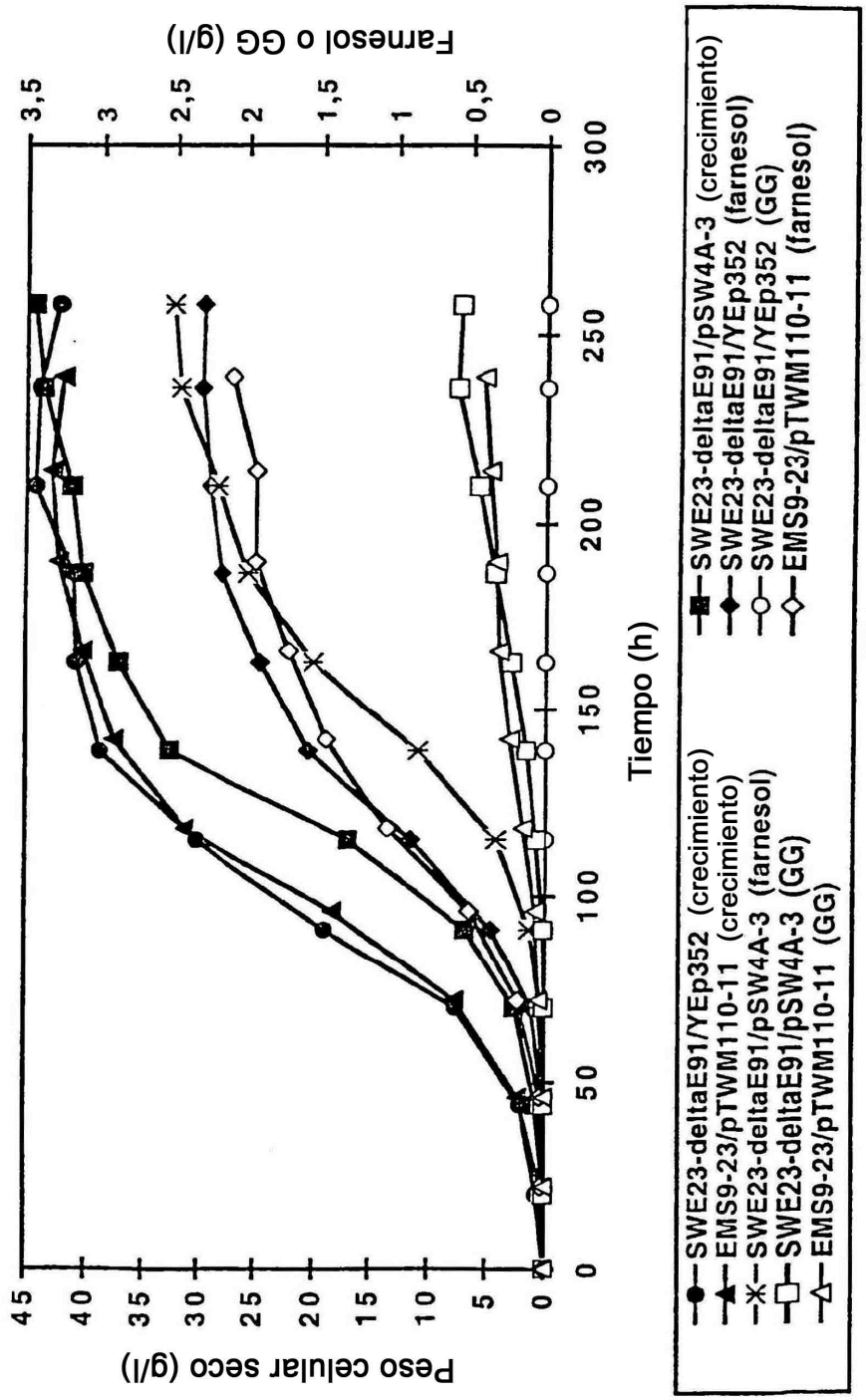

Peso celular seco (g/l)
Farnesol o GG (g/l)
Tiempo (h)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
0
0,5
1
1,5
2
2,5
3
3,5
0
50
100
150
200
250
300
SWE23-deltaE91/YEp352 (crecimiento)
EMS9-23/pTWM110-11 (crecimiento)
SWE23-deltaE91/pSW4A-3 (farnesol)
SWE23-deltaE91/pSW4A-3 (GG)
EMS9-23/pTWM110-11 (GG)
SWE23-deltaE91/pSW4A-3 (crecimiento)
SWE23-deltaE91/YEp352 (farnesol)
SWE23-deltaE91/YEp352 (GG)
EMS9-23/pTWM110-11 (farnesol)

FIG. 7

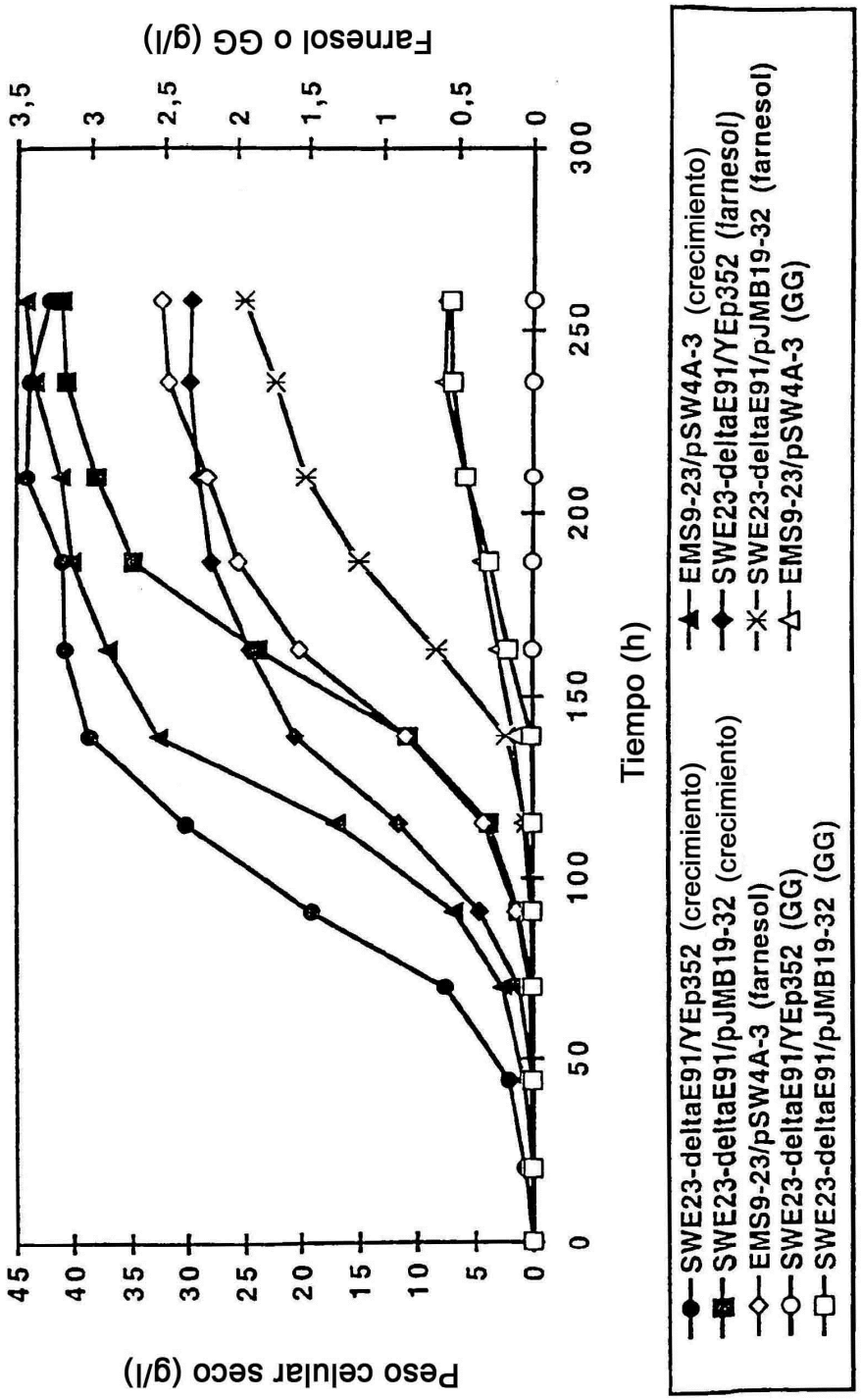

Peso celular seco (g/l)
Farnesol o GG (g/l)
Tiempo (h)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
0
0,5
1
1,5
2
2,5
3
3,5
0
50
100
150
200
250
300
SWE23-deltaE91/YEp352 (crecimiento)
SWE23-deltaE91/pJMB19-32 (crecimiento)
EMS9-23/pSW4A-3 (farnesol)
SWE23-deltaE91/YEp352 (GG)
SWE23-deltaE91/pJMB19-32 (GG)
EMS9-23/pSW4A-3 (crecimiento)
SWE23-deltaE91/YEp352 (farnesol)
SWE23-deltaE91/pJMB19-32 (farnesol)
EMS9-23/pSW4A-3 (GG)

FIG. 8

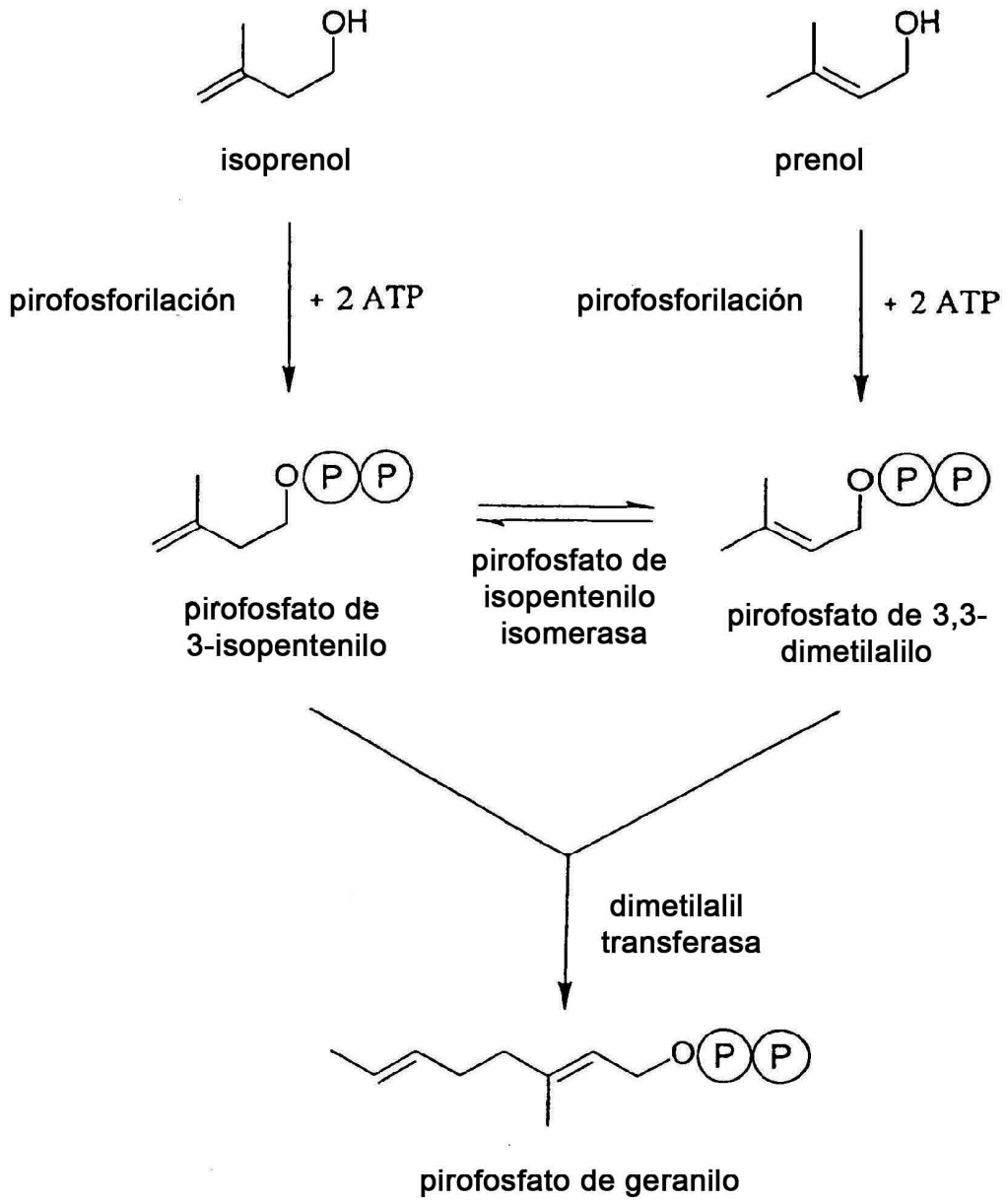

OH
isoprenol
OH
prenol
pirofosforilación
+ 2 ATP
pirofosforilación
+ 2 ATP
O P P
pirofosfato de 3-isopentenilo
pirofosfato de isopentenilo isomerasa
O P P
pirofosfato de 3,3-dimetilalilo
dimetilalil transferasa
O P P
pirofosfato de geranilo

FIG. 9-i

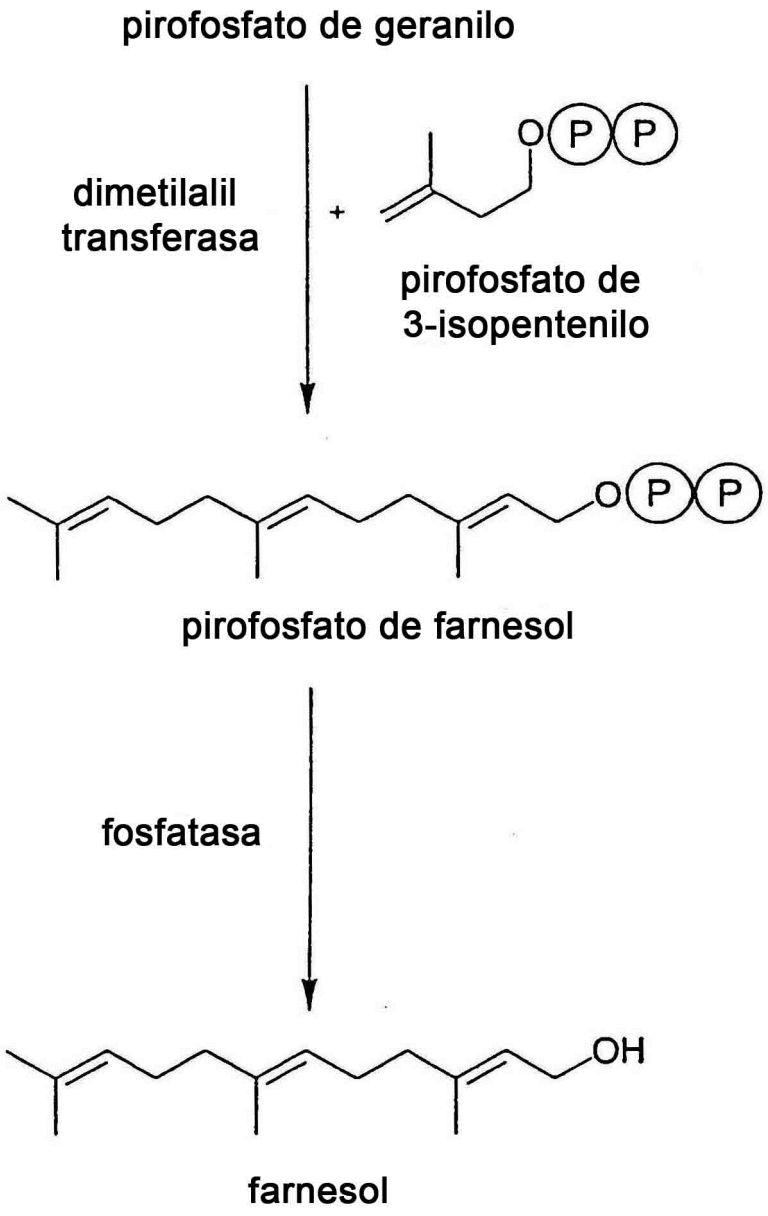

pirofosfato de geranilo
dimetilalil transferasa
+
O P P
pirofosfato de 3-isopentenilo
O P P
pirofosfato de farnesol
fosfatasa
OH
farnesol

FIG. 9-ii

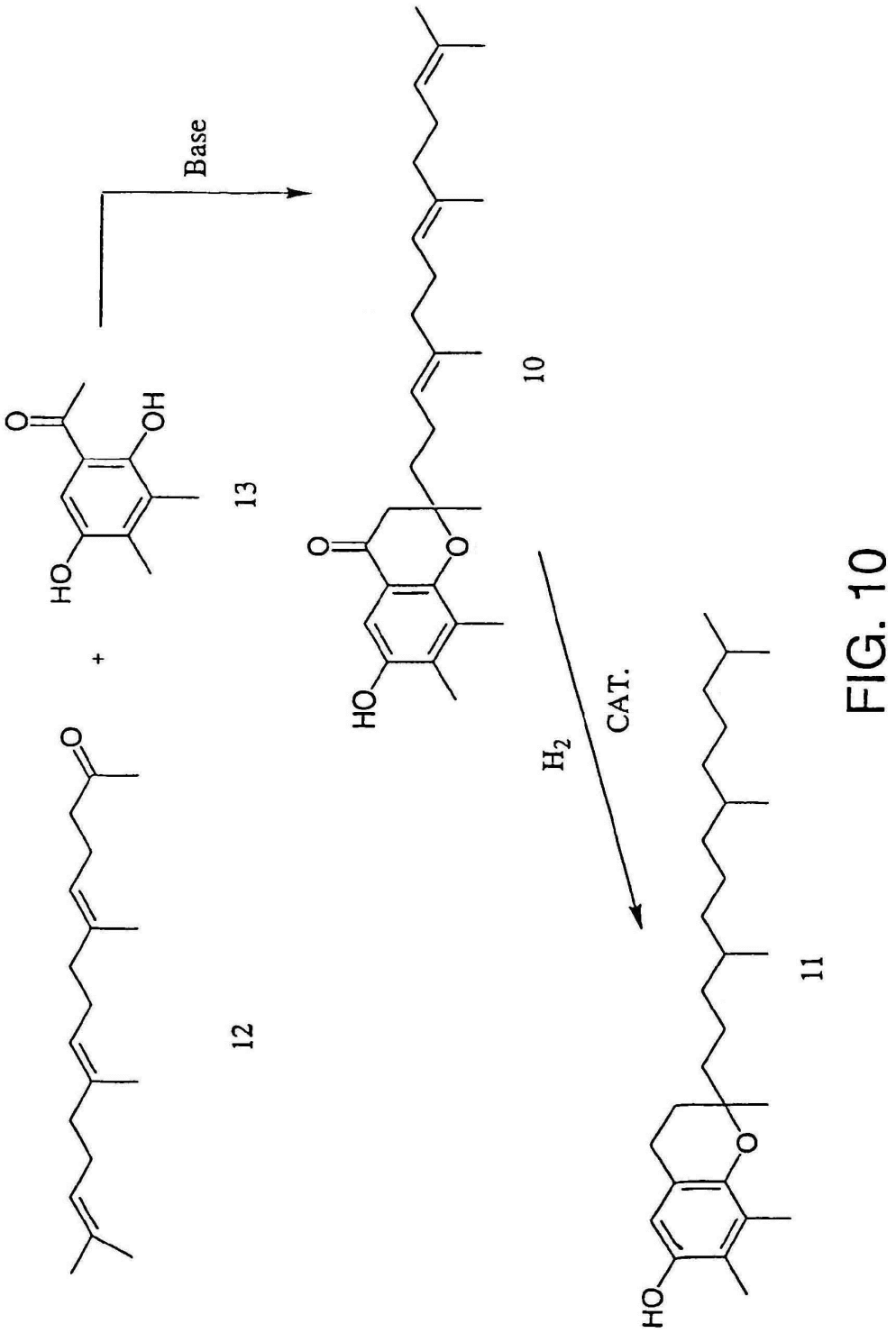



FIG. 10

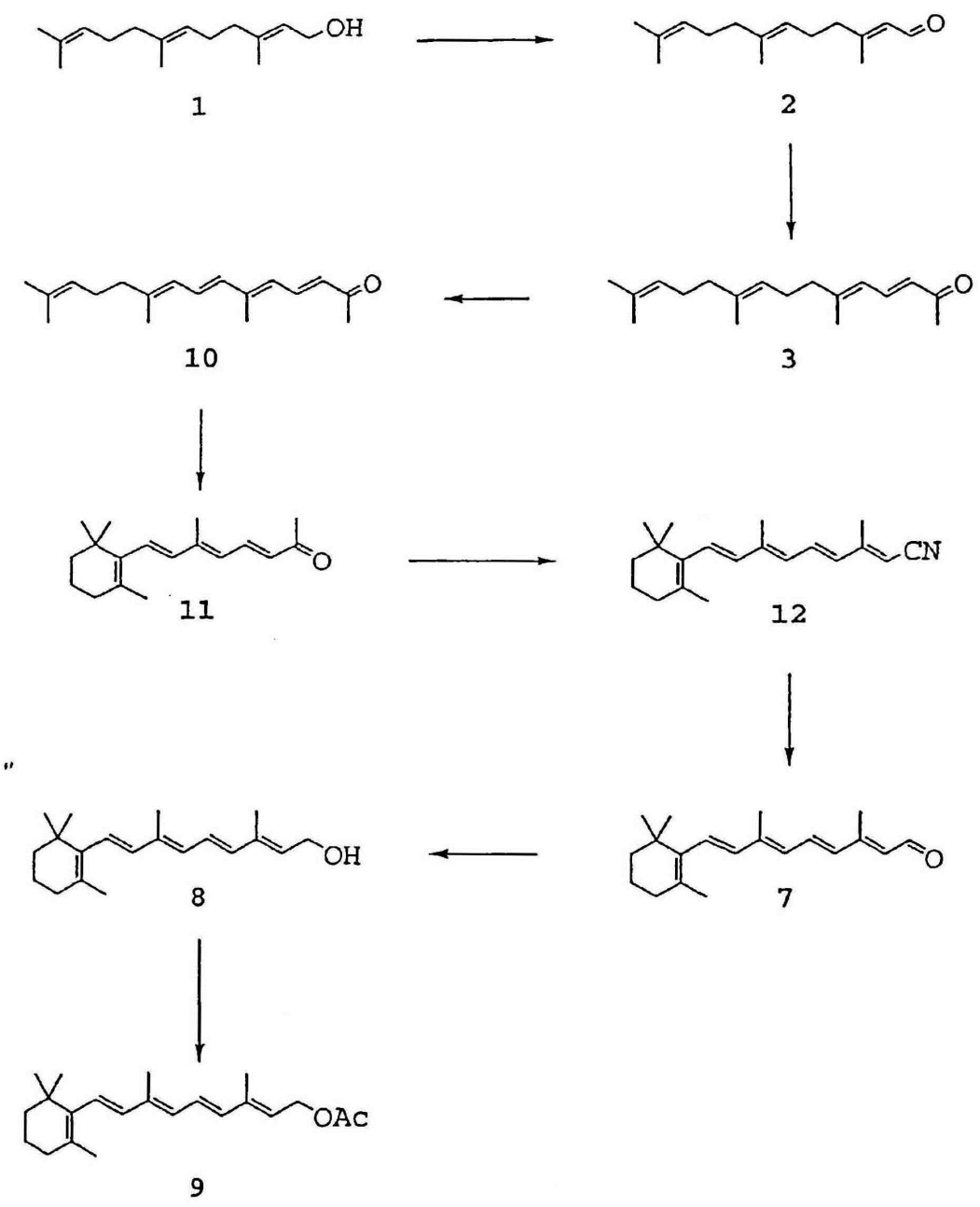



FIG. 11

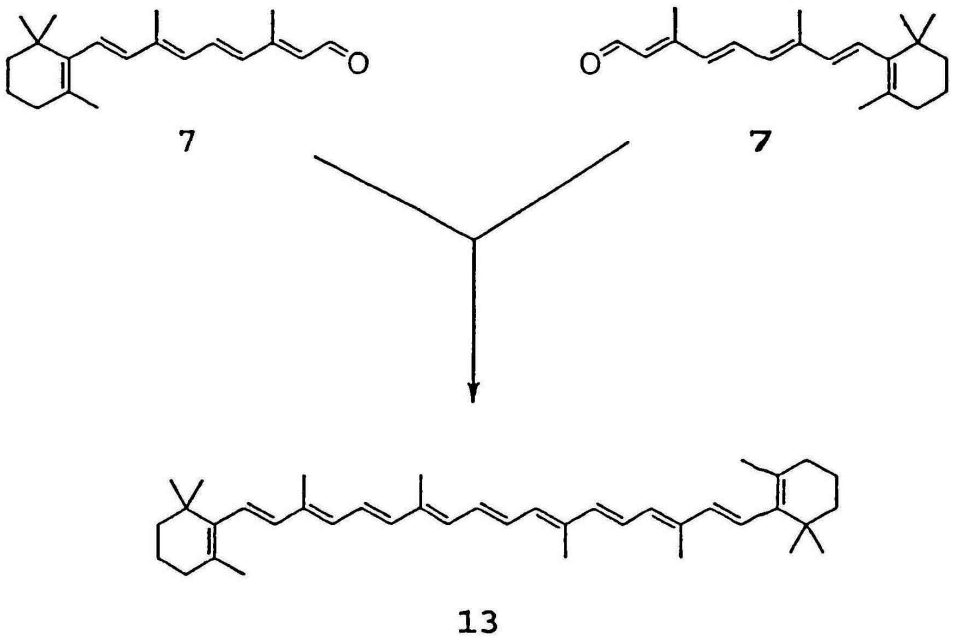



FIG. 12

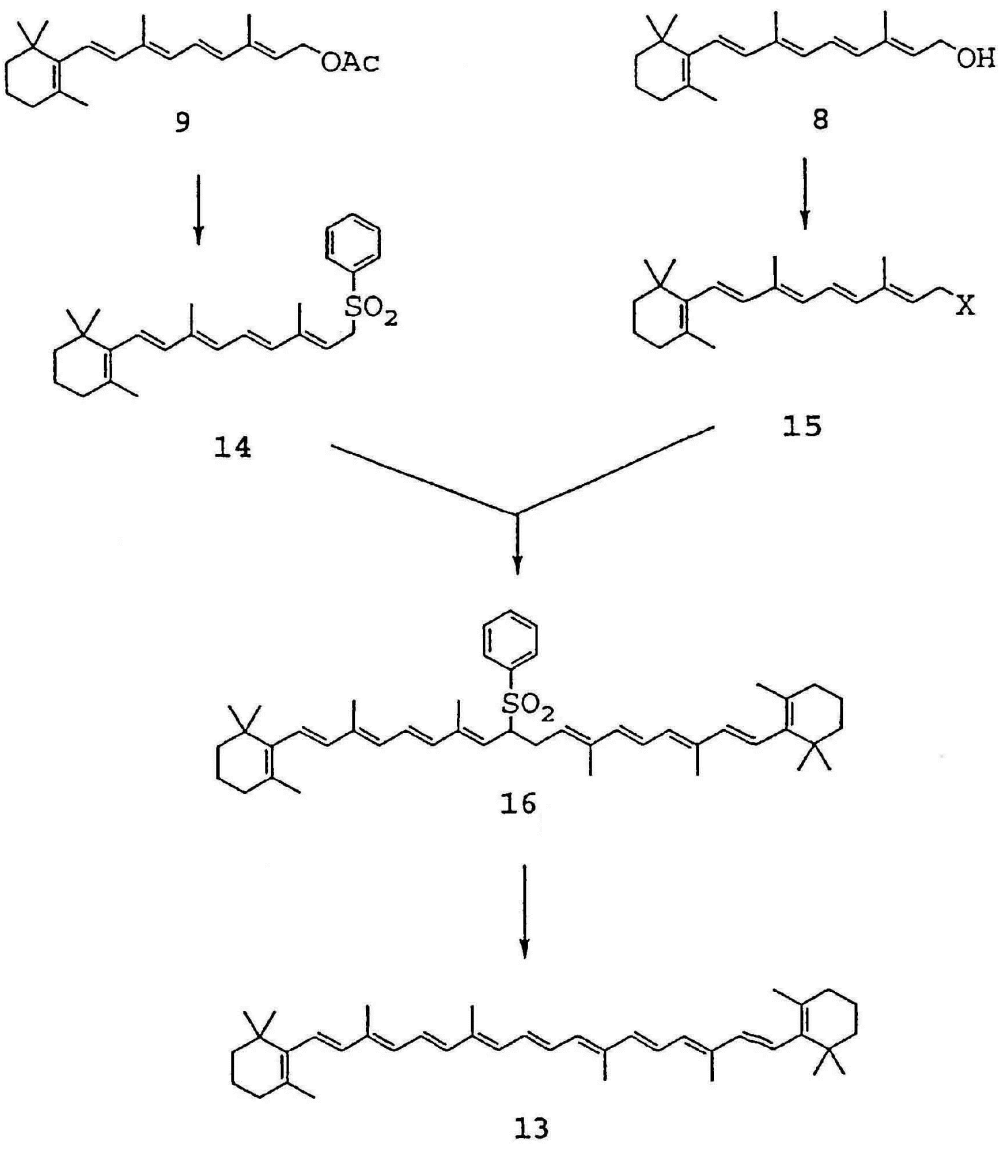



FIG. 13