

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 582 637**

51 Int. Cl.:

C12N 9/02 (2006.01)

C12N 9/04 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

C12P 5/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.02.2012 E 12705615 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016 EP 2681313**

54 Título: **Una célula de levadura para la producción de terpenos y usos de los mismos**

30 Prioridad:

28.02.2011 EP 11001629

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

14.09.2016

73 Titular/es:

**ORGANOBALANCE GMBH (100.0%)
Gustav-Meyer-Allee 25
13355 Berlin, DE**

72 Inventor/es:

**RAAB, ANDREAS y
LANG, CHRISTINE**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 582 637 T3

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

DESCRIPCIÓN

Una célula de levadura para la producción de terpenos y usos de los mismos

La presente invención se relaciona con una célula de levadura, en la que dicha célula comprende un gen funcional que codifica para hidroximetilglutaril-coenzima-A (HMG-CoA) reductasa soluble; uno o más genes que codifican para esterilaciltransferasas en dicha célula, son defectuosos o eliminados; y dicha célula es prototrófica para al menos histidina, leucina o uracilo. Además, la presente invención se relaciona con el uso de dicha célula para la producción de uno o más terpenos. Adicionalmente, la presente invención se relaciona con métodos de generación de dicha célula y la producción de uno o más terpenos, y una composición farmacéutica o cosmética, un lubricante o aceite para transformador que comprende dichos terpenos.

En la industria farmacéutica, cosmética y química de hoy, diferentes terpenos son de creciente importancia. Se usan los terpenos, por ejemplo como aditivos en composiciones farmacéuticas y cosméticas, como adyuvantes en vacunas, como humectantes de la piel, como agentes mucolíticos, como feromonas, como hormonas, para el control de plagas, como humectantes, como fragancias, como lubricantes, como agentes antimicrobianos, como agentes antiinflamatorios, como aditivos alimenticios, como aislantes eléctricos, como aceite para transformador o aditivos para aceite para transformador, y como productos químicos en bruto útiles en la industria química, farmacéutica y cosmética. Los terpenos se pueden usar adicionalmente como una fuente natural y sostenible para propósitos químicos.

Químicamente, los terpenos son derivados de una o más unidades de isopreno, también designadas como unidades de prenilo. El isopreno tiene la fórmula $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{-CH}=\text{CH}_2$. Adicionalmente, por conjugación de heteroátomos tales como, por ejemplo, oxígeno o nitrógeno, se pueden modificar los terpenos hasta terpenoides que también son conocidos como isoprenoides.

En la naturaleza, la mayoría de los terpenos se encuentran como metabolitos secundarios en plantas, hongos y animales. Además, varias bacterias producen terpenos. Los terpenos pueden comprender diferentes números de unidades de isopreno. Los hemiterpenos y derivados de los mismos comprenden una unidad individual de isopreno y comprenden, por ejemplo, prenol y ácido isovalérico. Los monoterpenos y derivados de los mismos comprenden dos unidades de isopreno y comprenden, por ejemplo, geraniol, limoneno y terpineol. Los sesquiterpenos y derivados de los mismos comprenden tres unidades de isopreno y comprenden, por ejemplo, farnesenos, farnesol. Los diterpenos y derivados de los mismos están compuestos por cuatro unidades de isopreno y comprenden, por ejemplo, geranilgeranilo pirofosfato, cafestol, kahweol, cembreno y taxadieno (precursor de taxol), retinol, retinal y fitol. Los sesterterpenos y derivados de los mismos comprenden cinco unidades de isopreno y comprenden, por ejemplo, sesterterpenos y geranilfarnesol. Los triterpenos comprenden seis unidades de isopreno y comprenden, por ejemplo, escualeno, lanosterol y cicloartenol. Los tetraterpenos comprenden, por ejemplo, licopeno acíclico, el gammacaroteno monocíclico, y los alfa y beta carotenos bicíclicos. Los politerpenos consisten en cadenas largas de numerosas unidades de isopreno y comprenden, por ejemplo, caucho natural y gutapercha.

La vasta mayoría de terpenos es derivada de la ruta del mevalonato catalizada enzimáticamente. Aquí, la formación de terpenos inicia con acetil-coenzima A (CoA). Dos moléculas de acetil-CoA catalizadas enzimáticamente reaccionan hasta una molécula de acetoacetil-CoA. En el siguiente paso, el acetoacetil-CoA reacciona con una molécula adicional de acetil-CoA hasta 3- hidroxil-3-metil-glutaril-CoA (hidroximetilglutaril-CoA; HMG-CoA). En el siguiente paso, se reduce HMG-CoA hasta mevalonato. Esta reacción es catalizada por la enzima reductasa HMG-CoA y es típicamente el paso limitante de la velocidad de biosíntesis de terpeno. Por lo tanto, se conoce la reductasa HMG-CoA como la enzima clave para la ruta de mevalonato.

El mevalonato es típicamente fosforilado dos veces y descarboxilado hasta isopentenil-pirofosfato (IPP). A través de los pasos secuenciales de la formación de isómeros, condensación y deshidrogenación, se convierte el IPP en geranil-pirofosfato, que se combina con una unidad adicional de IPP hasta farnesil-pirofosfato. Dos moléculas de farnesil-pirofosfato de manera reductora condensan hasta escualeno, que puede ser convertido en colesterol y en cualquier hormona esteroide.

Alternativamente, geranil-pirofosfato y farnesil-pirofosfato pueden reaccionar adicionalmente hasta terpenos superiores y, tales como tetra y politerpenos.

Un terpeno de gran importancia es el triterpeno escualeno. Mundialmente, aproximadamente 2000 toneladas de escualeno se producen anualmente. Esto conduce a una facturación anual de aproximadamente 125 millones de dólares de Estados Unidos. Técnicamente, el escualeno se usa preferiblemente como aditivo nutricional, en cosméticos, y en la industria farmacéutica. Además, el escualeno se usa también como lubricante biodegradable y como aceite para transformador. El escualeno puede servir como un antioxidante y además es usado regularmente como adyuvante en vacunas.

Tradicionalmente, se obtiene el escualeno de fuentes biológicas, tales como, por ejemplo, aceite de pescado, en particular aceite de hígado de tiburón. Entonces, se purifica el escualeno de la composición compleja de aceite de pescado por procedimientos laboriosos. En el campo farmacéutico, la trazabilidad del producto a ser aprobado es muy importante para las Autoridades de Salud. Pero esta trazabilidad es difícil de asegurar cuando el producto
 5 contiene productos que provienen de origen animal. Por ejemplo, es difícil saber exactamente que ha comido el pescado, tal como un tiburón antes de ser sacrificado. En consecuencia, para un producto farmacéutico, es importante el uso de materias primas que cumplen BPM, lo que indica que su trazabilidad puede ser obtenida directamente del origen. Adicionalmente, varias especies de tiburones son especies en peligro amenazadas con la extinción. Los terpenos diferentes del escualeno son igualmente obtenidos a partir de materiales biológicos y han
 10 de ser purificados por procedimientos laboriosos y, a menudo peligrosos.

Por lo tanto, hay una necesidad de formas alternativas de producción de terpenos, tal como escualeno. Se ha demostrado el uso de una cepa de levadura modificada genéticamente que produce mayores rendimientos de escualeno (EP 0 486 290). Sin embargo, las cepas de levadura descritas además producen cantidades altas de esteroides, tales como por ejemplo, ergosterol. La producción de esteroides disminuye el rendimiento de escualeno y otros terpenos. Adicionalmente, la presencia de grandes cantidades de impurezas de esteroides requiere métodos sofisticados para purificar el escualeno y otros terpenos materias primas.
 15

Hasta el momento, los organismos modificados genéticamente (GMOs) conocidos en la técnica producen terpenos en una concentración que es muy baja para la producción industrial eficiente de terpenos y con impurezas muy altas.

Además, los organismos modificados genéticamente son conocidos generalmente por ser inestables comparativamente desde el punto genético y típicamente mostrar menor viabilidad y/o cinética de crecimiento, que las correspondientes a células de tipo silvestre, cuando son cultivadas. Por lo tanto, durante el cultivo de un lote de dichas células, la productividad de dicho lote típicamente disminuye rápidamente sobre el tiempo. Esto dificulta regularmente la facilidad del uso eficiente de organismos modificados genéticamente en métodos de producción industrial variables.
 20
 25

Por otra parte, cuando se genera un organismo genéticamente modificado por inserción de uno o más genes foráneos, uno o más genes originales del organismo son reemplazados por dicho gen foráneo. Esto puede tener la ventaja de que las células se conviertan en auxotróficas para ciertos nutrientes orgánicos, lo cual puede ser usado para propósitos de selección. Adicionalmente, bajo ciertas condiciones de cultivo de célula, la auxotrofia se conoce por ser capaz de tener ventajas para la reproducibilidad de las células. Bajo ciertas condiciones, las células prototróficas son incluso superadas por las correspondientes células auxotróficas. A manera de ejemplo, se ha descrito que bajo condiciones de crecimiento limitado por amoniaco, un prototrofo de histidina de células de levadura *hoΔ::HIS3* tuvo competencia con la correspondiente célula auxotrófica de histidina *HO his3* cuando se cultivó por 30 generaciones (Pronk, 2002). Por lo tanto, los organismos modificados genéticamente son usualmente
 30
 35 cultivados como cepas auxotróficas. Sin embargo, el uso de células auxotróficas evidentemente limita la libertad de escogencia del medio de cultivo.

Se divulgan también las cepas de levadura modificada genéticamente para la producción de escualeno en Raab A. and Lang C., Abschlussbericht "Innovatives Verfahren zur Herstellung von Squalen mit Hefe" (AZ13202-32), 2009.

En vista de lo anterior, existe todavía una necesidad inminente de organismos para producir terpenos en una concentración y pureza suficientemente alta para su uso industrial, las cuales son de suficientemente estables desde el punto de vista genético.
 40

En consecuencia, el problema técnico de la presente invención subyace en el suministro de un organismo con productividad mejorada de terpenos y genética mejorada, y estabilidad fenotípica.

Sorprendentemente, se encontró que una célula de levadura que comprende un gen funcional que codifica para hidroximetilglutaril coenzima- A (HMG-CoA) reductasa soluble, en la que uno o más genes que codifican para las esterilaciltransferasas han sido eliminados y que fue prototrófica para histidina, leucina y uracilo, muestra una productividad alta de terpenos y genética mejorada, y estabilidad fenotípica en cultivo de célula. Como era de esperarse, la eliminación de genes que codifican para esterilaciltransferasas condujo a menores niveles de esterilésteres. Sin embargo, inesperadamente, la eliminación de genes que codifican para esterilaciltransferasas no condujo a una acumulación de esteroides, pero si a una acumulación de terpenos, tales como escualeno.
 45
 50

Las células generadas forman una línea de célula estable y son genéticamente estables cuando son cultivadas por más de 30 generaciones. En estas, se encontró sorprendentemente que una célula que es prototrófica para histidina, leucina y uracilo, muestra una estabilidad genética y fenotípica más alta que una célula auxotrófica correspondiente.

En un primer aspecto, la presente invención se relaciona con una célula de levadura, en la que

a) dicha célula comprende un gen funcional que codifica para hidroximetilglutaril-coenzima-A (HMG-CoA) reductasa soluble;

b) uno o más genes que codifican para esterilaciltransferasas en dicha célula, son defectuosos o eliminados; y

5 c) dicha célula es prototrófica para histidina, leucina y uracilo.

Como se usa aquí, el término "célula de levadura" se puede entender en el sentido más amplio como cualquier célula de un organismo de levadura. Preferiblemente, la célula de levadura puede ser una célula de Saccharomyces, en particular una célula de Saccharomyces seleccionada del grupo consiste en Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces delbrückii, Saccharomyces italicus, Saccharomyces ellipsoideus, Saccharomyces fermentati, Saccharomyces kluyveri, Saccharomyces krusei, Saccharomyces lactis, Saccharomyces marxianus, Saccharomyces microellipsoides, Saccharomyces montanus, Saccharomyces norbensis; Saccharomyces oleaceus, Saccharomyces paradoxus, Saccharomyces pastorianus, Saccharomyces pretoriensis, Saccharomyces rosei, Saccharomyces rouxii, Saccharomyces, uvarum, Saccharomycescodes ludwigii. Más preferiblemente, la célula es una célula Saccharomyces cerevisiae. La célula Saccharomyces cerevisiae puede ser una célula de cualquier cepa, preferiblemente una célula de cepa AH22 como se usa a manera de ejemplo en los ejemplos.

Alternativamente, la célula puede ser una célula no Saccharomyces de Kluyveromyces lactis, Kluyveromyces marxianus var. marxianus, Kluyveromyces thermotolerans, Candida utilis, Candida tropicalis, Candida albicans, Candida lipolytica und Candida versatilis, del género Pichia como Pichia stipidis, Piachia pastoris und Pichia sorbitophila, Cryptococcus, Debaromyces, Hansenula, Saccharomycescodes, Saccharomycescodes, Schizosaccharomyces, Wickerhamia, Debayomyces, Hanseniaspora, Kloeckera, Zygosaccharomyces, Ogataea, Kuraishia, Komagataella, Metschnikowia, Williopsis, Nakazawaea, Cryptococcus, Torulaspora, Bullera, Rhodotorula, Willopsis o Sporobolomyces.

Como es usado aquí, el término "gen funcional" indica que el gen puede estar activo en la célula de levadura. Bajo condiciones adecuadas, el gen puede, por lo tanto, ser transcrito y traducido en la célula de levadura y se puede expresar el polipéptido de hidroximetilglutaril coenzima- A (HMG-CoA) reductasa. Como es usado a través de la invención, se pueden entender los términos "polipéptido" y "proteína" de manera intercambiable.

El término "hidroximetilglutaril-coenzima-A (HMG-CoA) reductasa soluble" se puede entender en el sentido más amplio como la forma soluble de un enzima que cataliza la reducción de hidroximetilglutaril-coenzima-A (HMG-CoA) hasta mevalonato. Como es usado aquí, se pueden entender los términos "hidroximetilglutaril-coenzima-A", "hidroximetilglutaril-CoA", "3-hidroxi-3-metil-glutaril-CoA", "3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA", "β-hidroxi-β-metil-glutaril-CoA", "β-hidroxi-β-metilglutaril-CoA", "beta-hidroxi-beta-metil-glutaril-CoA", "beta-hidroxi-beta-metilglutaril-CoA" y "HMGCoa" de manera intercambiable.

Preferiblemente, en contraste a la forma de tipo silvestre de reductasa HMG-CoA, la reductasa HMG-CoA soluble de la presente invención puede no ser inhibida por uno o más de los inhibidores del tipo silvestre HMG-CoA, tales como, por ejemplo, mevalonato, glucagón, colesterol, L-hidroxicolesterol, lipoproteínas de baja densidad y ácidos biliares.

Más preferiblemente, la reductasa soluble HMG-CoA es una reductasa HMG-CoA (tHMG1) truncada como se usa a manera de ejemplo en los ejemplos. Esta tHMG1 es descrita adicionalmente por Basson et al. (Basson et al., 1988) y/o es codificada por la secuencia de ADN de SEQ ID NO:1.

Se puede entender que la reductasa soluble HMG-CoA de la presente invención también puede ser un producto de una o más modificaciones postranslacionales. Las modificaciones postranslacionales son bien conocidas en la técnica y pueden comprender pero pueden no estar limitadas a formación de lípidos, fosforilación, sulfación, glicosilación, truncamiento, formación de ciclos de varios restos de aminoácidos, formación de ciclos de la cadena de polipéptido, oxidación, reducción, descarboxilación, acetilación, amidación, desamidación, formación de enlaces disulfuro, formación de piroglutamato, adición de aminoácidos, adición de cofactor (por ejemplo, biotilación, adición de hemo) y formación de complejos de iones metálicos, iones no metálicos, péptidos o pequeñas moléculas y adición de grupos hierro - sulfuro. Evidentemente, los, cofactores, tales como, por ejemplo, ATP, ADP, NAD⁺, NADH+H⁺, NADP⁺, NADPH+H⁺, iones de metal, aniones, lípidos, etc. pueden estar unidos al polipéptido, con independencia de la influencia biológica de estos cofactores.

El término "soluble" como es usado aquí se refiere a la forma de la enzima con propiedades disminuidas de unión a membrana. Preferiblemente, más de 50% de las moléculas HMG-CoA solubles de la presente invención no están integradas en o vinculadas a la membrana, más preferiblemente más de 60% de las moléculas HMG-CoA solubles de la presente invención no están integradas en o vinculadas a la membrana, incluso más preferiblemente más de 70% de las moléculas HMG-CoA solubles de la presente invención no están integradas en o vinculadas a la

membrana, incluso más preferiblemente más de 80% de las moléculas HMG-CoA solubles de la presente invención no están integradas en o vinculadas a la membrana, incluso más preferiblemente más de 90% de las moléculas HMG-CoA solubles de la presente invención no están integradas en o vinculadas a la membrana, lo más preferiblemente más de 95% de las moléculas HMG-CoA solubles de la presente invención no están integradas en o vinculadas a la membrana. La reductasa soluble HMG-CoA esta preferiblemente presente en el citosol de la célula de levadura de la presente invención.

El término "esterilaciltransferasa" como es usado aquí, se refiere a cualquier enzima que cataliza la formación de esteril acil ésteres. La esterilaciltransferasa puede ser una esterol O-aciltransferasa. Como son usados aquí los términos "esterol O-aciltransferasa", "esterol-éster sintetasa" y "acil-CoA:esterol aciltransferasa" pueden ser entendidos de manera intercambiable. En el contexto de la presente invención, la esterol O-aciltransferasa es preferiblemente una esterol O-aciltransferasa de levadura (EC 2.3.1.26). Más preferiblemente, las esterol O-aciltransferasas es/son los productos de gen de una o ambas esterol O-aciltransferasas usadas a manera de ejemplo en los ejemplos de la presente invención, así, el gen ARE1 y/o el gen ARE2 de levadura.

El gen ARE1 también es conocido como el gen SAT2, nombre de locus ordenada YCR048W u ORF nombre YCR48W. El gen ARE2 también es conocido como el gen SAT1, nombre de locus ordenada YNR019W u ORF nombre N3206.

En el contexto de la célula de levadura de la presente invención, los genes que codifican para esterilaciltransferasa son eliminados o defectuosos. Como es usado aquí, el término "eliminados" indica que el gen o una o más partes del gen han sido removidos. El gen no es transcrito y no se produce gen de producto, por lo tanto no se produce polipéptido correspondiente. Se puede entender que no necesariamente se debe remover el gen completo del genoma. Preferiblemente más de 50% del gen, más preferiblemente más de 60% del gen, incluso más preferiblemente más de 70% del gen, incluso más preferiblemente más de 80% del gen, incluso más preferiblemente más de 90% del gen, incluso más preferiblemente más de 95% del gen, y lo más preferiblemente 100% del gen son eliminados. La eliminación puede ser una eliminación terminal o una eliminación intercalada. Puede ser causada por un experimentador o por la naturaleza. Un gen puede ser eliminado por cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, un gen puede ser eliminado mediante cruzamiento o uso de procedimientos de crececombinasa (Guldener et al, 1996).

Como es usado aquí, el término "defectuoso" indica que el gen es ya sea no transcrito o que el gen codifica para un producto de gen, en consecuencia, un polipéptido que no es funcional. En el contexto de genes de esterilacil aciltransferasas, el término "no funcional" se refiere a un polipéptido que tiene menos de 50%, preferiblemente menos de 40%, más preferiblemente menos de 30%, incluso más preferiblemente menos de 20%, incluso más preferiblemente menos de 10%, incluso más preferiblemente menos de 5%, incluso más preferiblemente menos de 4%, incluso más preferiblemente menos de 3%, incluso más preferiblemente menos de 2%, y lo más preferiblemente menos de 1% de la eficiencia de transferencia de acilo comparada con la del correspondiente polipéptido de tipo silvestre.

Como se muestra a manera de ejemplo en los ejemplos, los genes ARE1 y/o ARE2 pueden ser preferiblemente eliminados, en particular son eliminados los genes ARE1 y ARE2. Un gen puede tornarse defectuoso por cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, el gen puede tornarse defectuoso por mutagénesis no específica, causada por un experimentador o por la naturaleza (por ejemplo, por radiación, agentes químicos, o espontáneamente) o por mutagénesis dirigida al sitio (por ejemplo, por PCR). Puede ser causado por un desplazamiento del marco o una mutación puntual (intercambio nucleótido individual).

A través de la invención, el término "prototrófica" se puede entender en el sentido más amplio como que tiene la habilidad para sintetizar un compuesto orgánico particular requerido para el crecimiento de célula. En el contexto de la presente invención, la célula de levadura puede ser prototrófica para histidina, leucina y/o uracilo. Por lo tanto, la célula es capaz de sintetizar histidina, leucina y/o uracilo por sí misma y es por lo tanto capaz de crecer libre en medio libre de histidina, leucina y/o uracilo y en placas de cultivo celular libres de histidina, leucina y/o uracilo. Se puede entender que una célula de levadura también puede ser prototrófica para otros factores nutrientes.

En una realización preferida, la célula de levadura de la presente invención es una célula de una línea de célula estable, preferiblemente más estable que la célula correspondiente que es por lo menos auxotrófica para histidina, leucina o uracilo, más preferiblemente auxotrófica para histidina y leucina, histidina y uracilo, o leucina y uracilo, incluso más preferiblemente auxotrófica para histidina, leucina y uracilo.

Como es usado aquí, el término "línea de célula estable" se puede entender como una población de células que mantiene sus propiedades fenotípicas que son relevantes en el contexto de la presente invención. Estas propiedades relevantes son principalmente viabilidad, crecimiento y/o productividad de terpeno, más preferiblemente viabilidad, crecimiento y productividad de terpeno.

Una persona experta en la técnica entenderá que la línea de célula estable es preferiblemente también estable genéticamente.

5 Cuando se cultiva por 30 generaciones, la productividad de terpeno preferiblemente disminuye no más de 50%, más preferiblemente disminuyen o más de 30%, incluso más preferiblemente no más de 20%, incluso más preferiblemente no más de 10%, incluso más preferiblemente no más de 8%, incluso más preferiblemente no más de 6%, incluso más preferiblemente no más de 4%, y lo más preferiblemente no más de 2% comparados con las células de levadura antes del cultivo por 30 generaciones.

10 Adicionalmente, cuando se cultiva por 30 generaciones, la rata de reproducción de células preferiblemente disminuyó no más de 50%, más preferiblemente no más de 30%, incluso más preferiblemente no más de 20%, incluso más preferiblemente no más de 10%, incluso más preferiblemente no más de 8%, incluso más preferiblemente no más de 6%, incluso más preferiblemente no más de 4%, y más preferiblemente no más de 2% comparado con las células de levadura antes del cultivo por 30 generaciones.

15 Además, la productividad de terpeno de la célula de levadura de la presente invención preferiblemente no disminuye por más de 20% cuando se cultivó por más de 10, más de 20, más de 30, más de 40, más de 50, más de 60, más de 70, más de 80, más de 90, más de 100, más de 150, o más de 200 generaciones.

Igualmente, la rata de reproducción celular de la célula de levadura de la presente invención preferiblemente no disminuye por más de 20% cuando se cultivó por más de 10, más de 20, más de 30, más de 40, más de 50, más de 60, más de 70, más de 80, más de 90, más de 100, más de 150, o más de 200 generaciones.

20 A través de la invención, el término "auxotrófica" se puede entender en su sentido más amplio como la inhabilidad de la célula de levadura para sintetizar un compuesto orgánico particular requerido para su crecimiento. En el contexto de la presente invención, una célula de levadura puede ser auxotrófica para histidina, leucina y/o uracilo. Por lo tanto, la célula es incapaz de sintetizar histidina, leucina y/o uracilo por sí misma y por lo tanto no es capaz de crecer en medio libre de histidina, leucina y/o uracilo y en placas de cultivo celular libres de histidina, leucina y/o uracilo de placas de cultivo. La célula de levadura auxotrófica requiere la respectiva suplementación de histidina, leucina y/o uracilo en el medio de cultivo. Se puede entender que una célula de levadura también puede ser auxotrófica para otros factores nutrientes del grupo que consiste en pero no está limitado a vitaminas, aminoácidos, azúcares y ácidos lípidos.

30 Como es usado aquí, el término "célula correspondiente que es por lo menos auxotrófica para histidina, leucina o uracilo" se refiere a una célula del mismo origen genético que la célula de la presente invención. La célula correspondiente que es por lo menos auxotrófica para histidina, leucina o uracilo también comprende un gen funcional que codifica para reductasa soluble HMG-CoA. Adicionalmente, uno o más genes que codifican para esterilaciltransferasas en dicha célula son deficientes o eliminados. La única diferencia genética entre la célula de la presente invención y la célula correspondiente que es por lo menos auxotrófica para histidina, leucina y/o uracilo es que esta última es por lo menos auxotrófica para histidina, leucina y/o uracilo. Preferiblemente, la célula es una célula de Saccharomyces, más preferiblemente una célula de Saccharomyces cerevisiae, incluso más preferiblemente una célula de Saccharomyces cerevisiae de la cepa AH22, incluso más preferiblemente una célula originada de la cepa de levadura AH22tH3 derivada de la cepa AH22, más preferiblemente originada de la cepa AH22tH3ura8, incluso más preferiblemente originada de una de las cepas AH22tH3ura8Δare1 o AH22tH3ura8Δare2. Más preferiblemente, la célula correspondiente que es por lo menos auxotrófica para histidina, leucina o uracilo es una célula de levadura de la cepa AH22tH3ura8Δare1 Δare2 como se muestra en los ejemplos a manera de ejemplo.

En una realización preferida, dicha célula es una célula modificada genéticamente.

45 Como es usado aquí, el término "célula modificada genéticamente" se puede entender en el sentido más amplio como una célula cuyo genoma ha sido modificado por cualquier medio conocido en la técnica también denominado como organismo modificado genéticamente (GMO). La célula por sí misma se puede modificar o puede ser una progenie de una célula modificada genéticamente. Típicamente un GMO se genera por experimentación humana, tal como mutagénesis no específica o específica por medio de radiación (por ejemplo, radiación ultravioleta (UV), radiación de rayos X, radiación radioactiva/nuclear (por ejemplo, radiación alfa, beta o gamma) o radiación cósmica) o uno o más agentes mutagénicos (por ejemplo, agente de introducción de grupos alquilo (por ejemplo, mostazas de nitrógeno (por ejemplo, ciclofosfamida, mecloretamina o mustina (HN2), uramustina o mostoaza de uracilo, melfalán, clorambucilo, ifosfamida), nitrosoureas (por ejemplo, carmustina, lomustina, estreptozocina), sulfonatos de alquilo (por ejemplo, busulfán), tiotepa y sus análogos, derivados de platino (por ejemplo, cisplatino, carboplatino, nedaplatino, oxaliplatino, satraplatino, tetranitrato de triplatino), procarbazona, altretamina, aflatoxinas y aflatoxinas y productos metabólicos y derivados de los mismos, nitrito, anilina y productos metabólicos y derivados de los mismos, benceno y productos metabólicos y sus derivados, compuestos aromáticos policíclicos y productos metabólicos y derivados de los mismos) a una nucleobase), nitrosaminas, arsénico, asbesto, berilio y sus

compuestos, óxido de etileno, compuesto de cromo hexavalente (VI), radón, cloruro de vinilo, fumar, etc.) Sin embargo, una mutación también puede ocurrir espontáneamente.

En una realización preferida, dicha célula es una célula de *Saccharomyces*, más preferiblemente en la que dicha célula es una célula de *Saccharomyces cerevisiae*, en particular en la que dicha célula es derivada de una célula de *Saccharomyces cerevisiae* de la cepa AH22.

Las células de levadura de la cepa AH22 son obtenibles comercialmente de la American Type Culture Collection (ATCC) bajo el número ATCC 38626. Originalmente, la cepa AH22 que tiene una mutación doble *leu2-* y el genotipo *a' leu2-3 leu2-112 his4-519 can1* se derivó de la cepa S288c de tipo silvestre (Hinnen et al., 1978). La cepa S288c (Mortimer et al., 1985) está también disponible comercialmente bajo el número ATCC 26108. Preferiblemente, la célula de levadura de la presente invención es una célula *Saccharomyces cerevisiae* originaria de la cepa AH22tH3 que ha sido derivada de una célula de la cepa AH22, más preferiblemente originaria de la cepa AH22tH3ura8, incluso más preferiblemente originaria de una de las cepas AH22tH3ura8Δare1, AH22tH3ura8Δare2 o AH22tH3ura8Δare1Δare2, incluso más preferiblemente originaria de la cepa AH22tH3ura8Δare1Δare2, incluso más preferiblemente originaria de una de las cepas AH22tH3ura8Δare1Δare2H, AH22tH3ura8Δare1Δare2U o AH22tH3ura8Δare1Δare2L. Más preferiblemente, la célula de levadura de la presente invención es una célula de levadura de la cepa AH22tH3ura8Δare1Δare2HUL como se muestra a manera de ejemplo en los ejemplos. Las células de levadura de la invención son prototróficas para histidina, leucina y uracilo.

En una realización adicional preferida, la reductasa soluble HMG-CoA está caracterizada porque

- a) es una proteína de reductasa soluble HMG-CoA truncada que carece de la región de unión de membrana;
- b) está codificada en un vector bajo el control transcripcional de un promotor que es activo en dicha célula; y/o
- c) esta expresada bajo el control de un promotor constitutivo, en particular bajo el control de un promotor constitutivo fuerte.

En contexto de la presente invención, el término "proteína de reductasa soluble HMG-CoA truncada" se refiere a una proteína de reductasa HMGCoA de una menor longitud que la proteína de reductasa HMG-CoA con respecto a la longitud de la cadena de aminoácido constitutiva. Preferiblemente, la proteína de reductasa HMG-CoA carece de la región de unión de membrana de la proteína de tipo silvestre.

Como es usado aquí, el término "región de unión de membrana" se refiere a una región en la cadena de polipéptido relevante para la integración dentro de la membrana o la unión a la membrana. Es conocido en la técnica que los aminoácidos con amino terminal en 525 de la reductasa HMG-CoA están integrados en su mayoría dentro de la membrana (Basson et al., 1988).

Por lo tanto, en el contexto la presente invención, preferiblemente los aminoácidos con amino terminal pueden estar truncados hasta una posición de aminoácido entre un intervalo de aproximadamente 450 a 500, de aproximadamente 500 a 510, de aproximadamente 510 a 520, de aproximadamente 520 a 530, de aproximadamente 530 a 540, de aproximadamente 540 a 550, de aproximadamente 550 a 560, de aproximadamente 560 a 570 o de aproximadamente 570 a 600 aminoácidos. A manera de ejemplo, pueden ser truncados los aminoácidos hasta el aminoácido 552, así aminoácidos 1 a 552, (Polakowski et al., 1998). Más preferiblemente, la reductasa soluble HMG-CoA truncada es tHMG1 como se describe por Basson et al. (Basson et al., 1988). La tHMG1 está codificada por la secuencia de ADN de SEQ ID NO:1.

En contraste con la forma de tipo silvestre de reductasa HMG-CoA, la reductasa soluble HMG-CoA truncada de la presente invención puede no estar inhibida por uno o más de los inhibidores de HMG-CoA de tipo silvestre, tal como, por ejemplo, mevalonato, glucagón, colesterol, L-hidroxicolesterol, lipoproteínas de densidad baja y ácidos biliares.

Más preferiblemente, la reductasa soluble HMG-CoA es la reductasa HMG-CoA truncada tHMG1 como se muestra a manera de ejemplo en los ejemplos. Ésta tHMG1 es descrita adicionalmente por Basson et al. (Basson et al., 1988) y/o es codificada por la secuencia de ADN de SEQ ID NO:1.

Como se indica anteriormente, se puede entender que la reductasa soluble HMG-CoA de la presente invención también puede ser un producto de una o más modificaciones postraslacionales. Las modificaciones postraslacionales son bien conocidas en la técnica y pueden comprender pero pueden no estar limitadas a formación de lípidos, fosforilación, sulfatación, glicosilación, truncamiento, formación de ciclos de varios restos de aminoácidos, formación de ciclos de la cadena de polipéptido, oxidación, reducción, descarboxilación, acetilación, amidación, desamidación, formación de enlaces disulfuro, formación de piroglutamato, adición de aminoácidos, adición de cofactor (por ejemplo, biotilación, adición de hemo) y la formación de complejos de iones metálicos, iones no metálicos, péptidos o pequeñas moléculas y adición de grupos hierro - sulfuro. Evidentemente, cofactores,

tal como, por ejemplo, ATP, ADP, NAD⁺, NADH+H⁺, NADP⁺, NADPH+H⁺, iones de metal, aniones, lípidos, etc. pueden estar unidos al polipéptido, con independencia de la influencia biológica de estos cofactores.

5 Como es usado en el contexto de la presente invención, el término "vector" puede hacer referencia a cualquier composición que transfiere información genética dentro de la célula de levadura. La información genética puede estar codificada como ácido desoxirribonucleico (ADN) (ADN de cadena doble (ADNds), ADN de cadena individual (ADNss)), ácido ribonucleico (ARN), (ARN de cadena individual (ARNss), ARN de cadena doble (ARNds)), o como un análogo de ADN análogo tal como, por ejemplo, ácido nucleico de péptido (PNA), morfolino, ácido nucleico de glicol (GNA), ácido nucleico de treosa (TNA) o ADN metilado. Preferiblemente, la información genética está codificada como ADN. El vector puede ser cualquier vector conocido en la técnica tal como, por ejemplo, un vector lineal, un vector circular, un vector viral, o un vector bacteriano. Preferiblemente, el vector comprende ADN lineal o ADN circular, más preferiblemente ADN circular, en particular un plásmido. El vector puede ser insertado en la célula por cualquier medio conocido en la técnica, y puede ser usado en combinación con o sin agentes de transfección (por ejemplo, acetato de litio, polietilenoimina (PEI), fugeno, LT - 1, JetPEI, transfectamina, lipofectamina, UptiFectina, PromoFectina, GenePORTER, Hilymax, nanofibras de carbono, péptidos que penetran en células (CPP) con nanotubos de carbono, dominios de transducción de proteínas (PT), liposomas, DEAE-dextrano, dendrímeros), con o sin formación electrónica de poros, o con o sin una pistola de genes, con o sin transfección óptica, con o sin electrotransferencia de genes, con o sin impalfección, con o sin magnetofección, y/o con o sin transfección asistida por magneto. Preferiblemente, el vector es un vector de ADN circular, más preferiblemente, el vector es un plásmido. El plásmido puede ser cualquier plásmido conocido en la técnica tal como, por ejemplo, un plásmido YEpH2 o un plásmido de pUC19. El vector también puede ser un casete de expresión lineal que puede o no estar integrado en el genoma de la célula objetivo. Sin embargo, se puede entender que cualquier otro vector también puede ser usado.

25 El término "bajo control transcripcional" indica que el promotor regula la tasa de transcripción del gen. La tasa de transcripción es la tasa del ARN mensajero (ARNm) complementariamente a un segmento de la cadena antisentido del ADN vector generado por intervalo de tiempo.

30 Como es usado aquí, el término "promotor" se puede entender en el sentido más amplio como una región de ADN que facilita la transcripción del gen que codifica para reductasa soluble HMG-CoA. El promotor puede estar localizado cerca al gen, y puede estar localizado en la misma cadena y cadena arriba. La cadena arriba indica que está localizado hacia la región 5' de la cadena de sentido que codifica la reductasa soluble HMG-CoA. El promotor puede ser un promotor homólogo o un promotor heterólogo. Más preferiblemente, se usan los promotores como se muestra a manera de ejemplo en los ejemplos.

El término "expresado" se puede entender en el sentido más amplio como la conversión de la información genética a una cadena de polipéptido.

35 El término "promotor constitutivo" se puede entender como un promotor no regulado extensivamente que permite transcripción continua de su gen asociado. El término "promotor constitutivo fuerte" se refiere a un promotor que tiene una alta tasa transcripcional.

Adicionalmente, en una realización preferida, el uno o más genes que codifican para esterilaciltransferasas es/son ARE1 y/o ARE2, preferiblemente ambos genes, ARE1 y ARE2, son defectuosos o eliminados.

40 Adicionalmente o alternativamente, otros genes que tienen una influencia en la formación de esteril acil ésteres pueden ser defectuosos o eliminados.

45 En una realización preferida, la productividad de terpeno, preferiblemente la productividad de triterpeno, en particular la productividad de escualeno de dicha célula es al menos equivalente, preferiblemente aumentada en comparación con la célula de tipo silvestre correspondiente y/o la célula correspondiente que es al menos auxotrófica para histidina, leucina o uracilo, preferiblemente auxotrófica para histidina y leucina, histidina y uracilo, o leucina y uracilo, más preferiblemente, auxotrófica para histidina, leucina y uracilo.

50 El término "terpeno" se puede entender en el sentido más amplio como cualquier molécula estructuralmente derivada de isopreno. Preferiblemente, el terpeno de la presente invención es un terpeno que comprende al menos dos unidades de isopreno, más preferiblemente el terpeno comprende al menos tres unidades de isopreno, incluso más preferiblemente el terpeno comprende al menos cuatro unidades de isopreno, incluso más preferiblemente el terpeno comprende al menos cinco unidades de isopreno, incluso más preferiblemente el terpeno comprende seis unidades de isopreno, en particular, el terpeno es un triterpeno.

[0063] Preferiblemente, el terpeno es un terpeno derivado de la ruta de mevalonato. Estos terpenos comprenden, pero no están limitados a escualeno, caroteno (por ejemplo, α -caroteno, β -caroteno, γ -caroteno, δ -caroteno, ϵ -caroteno, ζ -caroteno), carotenoide, retinoato, complejo de ácido retinoico, retiniléster, retinal (retinal todo trans, 11-

cis-retinal), retinol (vitamina A, retinol todo trans, 11-cis-retinol), farneseno, farnesol, geraneno, geranol, isopenteno, quinonol (por ejemplo, filoquinonol, plastoquinonol, ubiquinonol, menaquinonol), fiteno, fitenol, geranilgeraneno, geranilgeraneno, xantofila (por ejemplo, violaxantina, zeaxantina), isopentol, limoneno, limonol, pineno, pinol, hormona juvenil III, undecapreno, undecaprenol, azúcar de undecaprenilo, kaureno, kaurenol, fitoalexina, capsidiol, guayaazuleno, giberilina, caucho, tocoperol, clorofila, quinona (por ejemplo, filoquinona, plastoquinona, ubiquinona, menaquinona), dolicol, azúcar dolequilo, prefitoeno, fitoeno, fitoenol, fitoflueno, fitofluenol, neurosporeno, licopeno, licopenol, licopreno, y licoprenol, cafestol, kahweol, cembreno, cambrenol, taxadieno, paclitaxel, taxol, sesterterpeno, cicloartenol, caucho natural, o gutapercha.

El terpeno puede o puede no comprender uno o más heteroátomos, preferiblemente oxígeno y/o nitrógeno. Se entenderá que un terpeno que comprende uno o más grupos hidroxilo, puede también estar esterificado con, por ejemplo, fosfato, pirofosfato, uno o más ácidos grasos, uno o más aminoácidos, uno o más polipéptidos, y uno o más péptidos cortos. Adicionalmente, un terpeno que comprende uno o más grupos amino, puede estar amidado con, por ejemplo, fosfato, pirofosfato, uno o más ácidos grasos, uno o más aminoácidos, uno o más polipéptidos, y uno o más péptidos cortos. Además, un terpeno que comprende uno o más grupos carboxílicos pueden estar amidados con, por ejemplo, uno o más aminoácidos, uno o más polipéptidos, y uno o más péptidos cortos y/o puede estar esterificado con, una o más coenzimas (por ejemplo, coenzima A (CoA)), uno o más azúcares, uno o más aminoácidos, uno o más polipéptidos, y/o uno o más péptidos cortos. Preferiblemente, el terpeno no conjugado, o esterificado con fosfato, pirofosfato y/o CoA. Más preferiblemente, el terpeno no conjugado. Más preferiblemente, el terpeno es escualeno como se muestra a manera de ejemplo en los ejemplos.

El término "productividad de terpeno" se puede entender como la productividad de cualquier terpeno por la célula de levadura. Preferiblemente la productividad de terpeno se refiere a la productividad de un terpeno de la ruta de mevalonato, más preferiblemente a productividad de escualeno.

Como es usado través de la invención, el término "productividad" se puede entender en el sentido más amplio como la habilidad de la célula de la presente invención para producir una molécula particular. La productividad puede ser cuantificada como la cantidad de dicha molécula que una célula produce en un cierto intervalo de tiempo. Por lo tanto, la productividad se puede entender como la producción de una molécula particular en el tiempo. Preferiblemente, la productividad de un lote de células puede ser cuantificada como la masa de la molécula particular por volumen del caldo de cultivo, como masa de dicha molécula por célula o como porcentaje en peso (% (w/w)) por masa de célula seca. Si se compara la productividad de dos cepas, tal como, por ejemplo, la cepa de la presente invención versus la cepa de tipo silvestre correspondiente con otra, la productividad relativa puede ser cuantificada como incremento o disminución de la producción de un terpeno en porcentaje en peso.

Como es usado en el contexto de la presente invención, el término "célula de tipo silvestre" se refiere a una célula de levadura de la misma especie que no es modificada genéticamente. La célula de tipo silvestre puede ser preferiblemente de la misma cadena de la cual la célula de levadura de la presente invención es derivada. Más preferiblemente, la célula de tipo silvestre no comprende un gen funcional que codifica para reductasa soluble HMG-CoA y/o dicha célula de tipo silvestre comprende un gen ARE1 funcional y/o un gen ARE2 funcional. La célula de tipo silvestre puede ser una célula que ocurre naturalmente y/o puede ser obtenible de un banco de célula tal como por ejemplo, el American Type Culture Collection (ATCC).

El término "célula de tipo silvestre correspondiente" se refiere a una célula de tipo silvestre que es originaria del mismo origen genético que la célula de la presente invención, pero en la que no ocurren una o más mutaciones genéticas. La célula de tipo silvestre correspondiente es de la misma especie y es originaria de la misma cepa que la célula de levadura de la presente invención. Además, preferiblemente la célula de tipo silvestre correspondiente puede no tener eliminación de deficiencia en los genes ARE1 y/o ARE2, en particular en el gen ARE1 y ARE2. Preferiblemente, la célula de tipo silvestre es una célula de levadura, más preferiblemente una célula de *Saccharomyces*, incluso más preferiblemente una célula de *Saccharomyces cerevisiae*, incluso más preferiblemente una célula de *Saccharomyces cerevisiae* de una cepa disponible comercialmente, incluso más preferiblemente una célula de *Saccharomyces cerevisiae* de la cepa AH22 o S288c. Mas preferiblemente, la célula de tipo silvestre es una célula *Saccharomyces cerevisiae* de la cepa AH22.

El término "equivalente" se refiere a una productividad de terpeno que es idéntica a la de la célula de tipo silvestre correspondiente y/o a la célula correspondiente auxotrófica como se definió anteriormente dentro de un intervalo de error de +/- 20%, más preferiblemente dentro del intervalo de error de +/- 10%, incluso más preferiblemente dentro de un intervalo de error de menos de +/- 10%.

En una realización preferida, dicha célula produce cantidades reducidas de esteril acil ésteres, preferiblemente en la que dicha célula es deficiente para la producción de esteril acil ésteres.

Como es usado aquí, el término "cantidad reducida" se refiere a la producción de una cantidad más baja de esteril éster. La producción de una cantidad reducida puede hacer referencia a una productividad de esteril acil ésteres de

menos de 100%, menos de 50%, menos de 40%, menos de 30%, menos de 20%, menos de 10%, menos de 8%, menos de 6%, menos de 5%, menos de 4%, menos de 3%, menos de 2%, o incluso menos de 1% de la cantidad producida por la célula de tipo silvestre correspondiente. A manera de ejemplo, la célula de tipo silvestre correspondiente puede ser una célula de levadura de la cepa AH22 o una célula de levadura de la cepa S288c, en particular una célula de la cepa AH22.

El término "deficiente para la producción de esteril acil ésteres" puede ser entendido como la ausencia extensiva de la formación de esteril ésteres. Se entenderá que en un sistema biológico siempre habrá un nivel basal de actividad no específica. Por lo tanto, como es usado aquí, el término "ausencia extensiva" puede referirse a una concentración de menos de 5%, preferiblemente menos de 1%, más preferiblemente menos de 0.5%, incluso más preferiblemente menos que 0.1% de la concentración encontrada en una célula de tipo silvestre correspondiente.

Un segundo aspecto de la presente invención se relaciona con un método para generar una célula de la presente invención, donde dicho método comprende:

a.) insertar un gen que codifica para reductasa soluble HMG-CoA en una célula de levadura;

b.) seleccionar células que comprenden un gen que codifica para dicha reductasa soluble HMG-CoA;

c.) eliminar o mutar uno o más genes que codifican para esterilaciltransferasas de dicha célula;

d.) convertir dicha célula en una célula que es al menos prototrófica para histidina, leucina y uracilo, por medios de

(i) insertar casetes de genes que codifican para una o más enzimas para la producción de histidina, leucina y/o uracilo, y/o

(ii) mutagénesis de reversión de uno o más genes defectuosos que codifican para enzimas para la producción de histidina, leucina y/o uracilo, en particular por mutagénesis de reversión de un gen defectuoso que codifica para una enzima, para la producción de histidina y por inserción de casetes de gen que codifican para enzimas para la producción de leucina y uracilo;

e.) seleccionar células que son prototróficas para histidina, leucina y uracilo; y opcionalmente;

f.) cultivar células del paso e.); y opcionalmente

g.) aislar y estabilizar las células del paso e.) o f.).

La célula de levadura y sus características funcionales son detalladas anteriormente. Se entenderá que las características definidas aquí también aplican a una célula generada por un método de la presente invención.

Como es usado aquí el término "generar una célula" puede ser entendido en el sentido más amplio como la provisión de la célula de la presente invención. Se entenderá que la célula progenitora puede ser cualquier célula de levadura. Preferiblemente, la célula es una célula de cepa de tipo silvestre. A manera de ejemplo, como se detalló anteriormente, la cepa de tipo silvestre puede ser una cepa AH22 o la cepa S288c, preferiblemente la cepa AH22. Más preferiblemente, la célula es generada como se muestra a manera de ejemplo en los ejemplos.

El término "insertar un gen" se refiere a cualquier medio para incorporar un gen en la célula de levadura. El gen puede estar codificado en cualquier vehículo de información genética tal como, por ejemplo, ADN (ADN de cadena doble (ADNs), ADN de cadena individual (ADNs)), ARN, (ARN de cadena individual (ARNs)), ARN de cadena doble (ARNs)), o como un análogo de ADN tal como, por ejemplo, ácido nucleico de péptido (PNA), morfolino, ácido nucleico de glicol (GNA), ácido nucleico de treosa (TNA) o ADN metilado, o un híbrido de los mismos. Preferiblemente, el gen es codificado en ADN, más preferiblemente ADN de cadena doble, en particular una cadena de ADN de cadena circular doble, en particular un plásmido. El plásmido puede ser cualquier plásmido conocido en la técnica. A manera de ejemplo, el plásmido puede ser el YEpH2 o un plásmido pUC. Más preferiblemente, el uno o más genes pueden ser insertados como se muestra a manera de ejemplo en los ejemplos.

La información genética puede ser insertada en la célula como un vector. Como es detallado anteriormente, el vector puede ser cualquier vector conocido en la técnica tal como, por ejemplo, un vector lineal, un vector circular, un vector viral, o un vector bacteriano. Preferiblemente, el vector comprende ADN lineal o ADN circular, más preferiblemente ADN circular, en particular un plásmido. El vector puede ser insertado en la célula por cualquier medio conocido en la técnica, y puede ser usado en combinación con o sin agentes de transfección (por ejemplo, polietileno imina (PEI), Fugeno, LT-1, JetPEI, transfectamina, lipofectamina, UptiFectin, a PromoFectina, GenePORTER, Hilymax, nanofibras de carbono, péptidos que penetran en células (CPPs) de nanotubos de carbono, dominios de transducción de proteína (PTDs), liposomas, DEAE-dextrano, dendrímeros), con o sin formación eléctrica de poros, o con o sin una pistola genes, con o sin transfección óptica, con o sin electrotransferencia de genes, con o sin impalefección, con o sin magnetofección, y/o con o sin transfección asistida

por magneto. Preferiblemente, el vector es un vector de ADN circular, más preferiblemente, el vector es un plásmido. El plásmido puede ser cualquier plásmido conocido en la técnica tal como, por ejemplo, un plásmido YEPh2 o un pUC19. Sin embargo, se puede entender que también cualquier otro vector puede ser usado.

5 El gen insertado puede ser activo o pasivo en la célula. Preferiblemente, el gen insertado es transcrito activamente y expresado en la célula. El gen puede ser transcrito activamente expresado como un plásmido extranuclear, como un plásmido intranuclear, como un vector lineal extranuclear, como un vector lineal intranuclear, o puede ser insertado dentro del genoma de la célula de levadura. Como es usado aquí, el término "genoma" se refiere a la entidad de información genética en la célula de levadura. Preferiblemente, el gen que codifica para reductasa soluble HMG-CoA se inserta dentro del genoma de dicha célula de levadura. Opcionalmente, la reductasa HMG-CoA puede reemplazar otro gen, tal como por ejemplo, un gen para prototofía de uracilo tal como, por ejemplo, el gen *ura3*. La célula resultante es entonces auxotrófica para uracilo.

Preferiblemente, dicho gen que codifica para reductasa soluble HMG-CoA es expresada en la célula de levadura, así, la reductasa soluble HMGCoA es producida por dicha célula.

15 Como es usado a través de la invención, el término "células que seleccionan" se refiere al enriquecimiento de la fracción deseada de la población de células. Más preferiblemente, las células son seleccionadas como se muestra a manera de ejemplo en los ejemplos.

20 En el contexto de las células que comprenden un gen que codifica para dicha reductasa soluble HMG-CoA, las células que comprenden dicho gen están enriquecidas en la población. La selección de las células puede ser ejecutada en un cultivo en suspensión o sobre una placa de cultivo de material sólido tal como, por ejemplo, una placa de agar. Las células pueden ser seleccionadas por dilución de las células y colocándolas por estrías para generar colonias originarias de únicamente una célula individual. Preferiblemente, a continuación en estas colonias se evalúa la presencia de un gen que codifica para dicha reductasa soluble HMG-CoA. Alternativamente, las células pueden ser evaluadas en su funcionalidad por determinación de productividad de terpenos. Alternativamente o adicionalmente, las células también pueden ser seleccionadas someténdolas a una presión de selección. Esta presión de selección puede ser un antibiótico para el cual únicamente la población de célula deseada es resistente a, o puede ser una condición de crecimiento preferida por la población deseada. En el contexto de selección de células que comprenden un gen que codifica para dicha reductasa soluble HMG-CoA, las células pueden haber crecido sobre o en un medio preferido por las células que comprenden dicho gen. A manera de ejemplo, sin incorporación del gen que codifica para dicha reductasa soluble HMG-CoA, dentro del genoma de las células de levadura reemplaza un gen por prototofía de uracilo, el medio de cultivo celular puede contener 5-FOA (ácido 5-fluoroorótico) (Boeke et al., 1987) que promueve la selección de levaduras de auxotróficas para uracilo.

35 Como es usado aquí, el término "eliminar un gen" se puede entender como la remoción de un gen o una o más partes de dicho gen. Después, el gen no es transcrito y no se produce producto de gen, por lo tanto no se produce polipéptido correspondiente. Se puede entender que no necesariamente todo el gen se ha removido del genoma. Preferiblemente más de 50% del gen, más preferiblemente más de 60% del gen, incluso más preferiblemente más de 70% del gen, incluso más preferiblemente más de 80% del gen, incluso más preferiblemente más de 90% del gen, incluso más preferiblemente más de 95% del gen, y lo más preferiblemente 100% del gen es eliminado. La eliminación puede ser una eliminación terminal o una eliminación de manera intercalada. Puede ser causada por un experimentador o por la naturaleza. Un gen puede ser eliminado por cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, un gen puede ser eliminado por entrecruzamiento o por uso de procedimientos de crecercombinasa (Guldener et al, 1996). Más preferiblemente, el uno o más genes pueden ser eliminados como se muestra a manera de ejemplo en los ejemplos.

45 Como es usado aquí, el término "mutar un gen" se puede entender en el sentido más amplio como una alteración de la secuencia de ácido nucleico de dicho gen. La mutación resultante puede ser un intercambio de nucleótido individual (mutación de punto) o puede ser una mutación de desplazamiento de marco. Preferiblemente, el gen es mutado en una forma que no resulta en un producto de gen, es decir, un polipéptido, o en un polipéptido con actividad disminuida comparada con la del polipéptido de tipo silvestre. Una mutación puede ser causada por cualquier medio conocido en la técnica (por ejemplo, por radiación o agentes químicos), o por mutagénesis dirigida al sitio (por ejemplo, por PCR). La mutación puede también ocurrir espontáneamente debido a la tasa de mutación que ocurre naturalmente. La mutación puede causar un desplazamiento del marco o una mutación de punto (nucleótido individual). Por ejemplo, la mutación puede ser obtenida por mutagénesis no específica, causada por un experimentador o por la naturaleza. Más preferiblemente, el uno o más genes pueden ser mutados como se muestra a manera de ejemplo en los ejemplos.

55 Una mutación puede ser causada por, por ejemplo, radiación (por ejemplo, radiación ultravioleta (UV), radiación de rayos X, radiación reactiva/nuclear (por ejemplo, radiación alfa, beta o gamma) o radiación cósmica) o uno o más agentes mutagénicos (por ejemplo, agente de introducción de grupo alquilo (por ejemplo, mostazas de nitrógeno (por ejemplo, por ejemplo, ciclofosfamida, mecloretamina o mustina (HN2), uramustina o mostaza de uracilo,

5 melfalán, clorambucilo, ifosfamida), nitrosoureas (por ejemplo, carmustina, lomustina, estrepto-zocina), sulfonatos de alquilo (por ejemplo, busulfán), tiotepa y sus análogos, derivados de platino (por ejemplo, cisplatino, carboplatino, nedaplatino, oxaliplatino, satraplatino, tetranitrato de triplatino), procarbazona, altretamina, aflatoxinas y aflatoxina y productos metabólicos y derivados de los mismos, nitrito, anilina y productos metabólicos y derivados de los mismos, benceno y productos metabólicos y sus derivados, compuestos aromáticos policíclicos y productos metabólicos y derivados de los mismos) a una nucleobase), nitrosaminas, arsénico, asbesto, berilio y sus compuestos, óxido de etileno, compuesto de cromo hexavalente (VI), radón, cloruro de vinilo, fumar, etc. Una mutación también puede ocurrir espontáneamente.

10 Preferiblemente, las esterilaciltransferasas es/son ARE1 y/o ARE2. Preferiblemente, los genes ARE1 y/o ARE2 es/son eliminados, más preferiblemente los genes ARE1 y ARE2 son eliminados.

15 El término "convertir" se puede entender en el sentido más amplio como alteración de las propiedades genéticas de una célula. Uno o más casetes de gen que codifican para una o más enzimas para la producción de histidina, leucina y/o uracilo pueden ser insertados dentro de las células por mutagénesis de reversión de uno o más genes defectuosos que codifican para enzimas para la producción de histidina, leucina y/o uracilo. Más preferiblemente, las células son convertidas como se muestra a manera de ejemplo en los ejemplos.

20 Como es usado aquí, el término "casete del gen" se puede entender en el sentido más amplio como una secuencia de ADN modular que codifica uno o más genes para una función bioquímica individual. Esto puede hacer referencia a un fragmento manipulable de ADN que lleva uno o más genes de interés, siendo capaz de expresar, uno o más de dichos genes y puede comprender adicionalmente uno o más conjuntos de sitios de restricción. Preferiblemente, el uno o más genes están localizados entre dos o más sitios de restricción. Opcionalmente, el casete del gen puede ser transferido de una secuencia de ADN (usualmente en un vector) al genoma y reemplazar una secuencia de ADN del genoma de la célula de la presente invención. Más preferiblemente, los casetes del gen pueden ser eliminados como se muestra a manera de ejemplo en los ejemplos.

25 En el contexto de la presente invención, el término "mutagénesis de reversión" se refiere a una mutación que restablece el antiguo genotipo o el fenotipo original de la célula correspondiente de tipo silvestre con respecto a características fenotípicas particulares. Entonces, preferiblemente, se repara un gen defectuoso. A manera de ejemplo una mutación de reversión de un gen defectuoso que codifica para una enzima para la producción de histidina en una célula auxotrófica para histidina puede conducir a una célula prototrófica para histidina. Más preferiblemente, la mutagénesis de reversión puede ser ejecutada como se muestra a manera de ejemplo en los ejemplos.

30 El gen defectuoso que codifica para una enzima para la producción de histidina puede ser reparado por inserción de un casete de gen o por mutagénesis de reversión. Preferiblemente, el gen es reparado por mutagénesis de reversión, más preferiblemente por mutagénesis de reversión del gen HIS4.

35 El gen defectuoso que codifica para una enzima para la producción de leucina puede ser reparado por inserción de un casete del gen o por mutagénesis de reversión. Preferiblemente, el gen es reparado por inserción de un casete de gen que comprende una forma intacta de dicho gen, más preferiblemente por inserción de un casete de gen que codifica para el gen LEU2.

40 El gen defectuoso que codifica para una enzima para la producción de uracilo puede ser reparado por inserción de un casete de gen o por mutagénesis de reversión. Preferiblemente, el gen es reparado por inserción de un casete de gen que comprende una forma intacta de dicho gen, más preferiblemente por inserción de un casete de gen que codifica para un gen URA3.

45 En el contexto de las células prototróficas para histidina, leucina y/o uracilo, las células prototróficas están enriquecidas en la población. La selección de las células puede ser ejecutada en un cultivo en suspensión o sobre una placa de cultivo de material sólido tal como, por ejemplo, una placa de agar. Las células pueden ser seleccionadas por dilución de células y colocándolas por estría para generar colonias originarias de una célula única individual. A continuación puede probarse en estas colonias la presencia de genes respectivos o por sus propiedades fenotípicas. Alternativamente o adicionalmente, las células también pueden ser seleccionadas someténdolas a una presión de selección. Esta presión de selección puede ser un medio que carece del respectivo compuesto o de un medio que comprende un antibiótico al cual únicamente la población de célula deseada es resistente o puede ser una condición de crecimiento preferida por la población deseada. Preferiblemente, el medio carece de histidina, leucina y/o uracilo, más preferiblemente dicho medio carece de histidina y leucina, histidina y uracilo, o leucina y uracilo, en particular dicho medio carece de histidina, leucina y uracilo. Como es usado aquí, el término "carece" indica que la concentración de dicho compuesto no está presente o únicamente está presente en trazas.

55 El término "cultivar células" se puede entender en el sentido más amplio como mantener las células viables. Las

células pueden ser cultivadas en condiciones adecuadas para células de levadura. A manera de ejemplo, las células de levadura pueden ser cultivadas en cultivo en suspensión o en placas tal como, por ejemplo, placas de agar. El medio de suspensión o agar puede contener nutrientes adecuados para las células de levadura tales como, por ejemplo, uno o más aminoácidos, uno o más péptidos, uno o más lípidos, una o más vitaminas, elementos de traza, y/o sales, uno o más factores de crecimiento y uno o más amortiguadores. Las células pueden ser cultivadas en condiciones aeróbicas o anaeróbicas. La temperatura puede estar en un intervalo adecuado para las células, conocido por aquellos expertos en la técnica. A manera de ejemplo para levaduras, la temperatura puede estar típicamente en el intervalo de entre 18°C y 40°C, preferiblemente entre 20°C y 37°C, más preferiblemente en el intervalo de entre 20°C y 30°C, incluso más preferiblemente en 25°C a 30°C, más preferiblemente en 30°C. El valor de pH del medio puede estar en un intervalo adecuado para la célula de levadura. Para la mayoría de células de levadura el pH adecuado puede estar en un pH neutro o ligeramente básico. Más preferiblemente, las células son cultivadas como se muestra a manera de ejemplo en los ejemplos.

Preferiblemente, el cultivo de células conduce a la reproducción de las células. La reproducción puede ocurrir desde la división celular de las células de levadura, gemación de las células de levadura, formación de esporas, formación de uno o más gametos y/o reproducción sexual. Más preferiblemente, la reproducción de las células de levadura es división celular o gemación.

El cultivo de células puede incluir el cultivo en escala de laboratorio, es decir, cultivos de varias placas de cultivo o cultivos en suspensión de varios mililitros hasta algunos litros de caldo de cultivo. Los cultivos de las células pueden incluir adicionalmente cultivos en una escala semitécnica, es decir, cultivo de cultivos en suspensión de varios litros de caldo de cultivo y cultivo en una escala industrial, es decir cultivo de cultivos en suspensión de varios litros o incluso varios metros cuadrados de caldo de cultivo. Como es usado aquí, el término "caldo de cultivo" comprende las células y el medio. Un cultivo en suspensión puede opcionalmente ser agitado o sacudido. Un cultivo en suspensión puede ser opcionalmente aireado, ventilado y/o se le puede eliminar el gas. Las células pueden ser cultivadas a una presión adecuada, la presión puede ser presión atmosférica, exceso de presión o bajo presión. Típicamente las células pueden ser cultivadas a presión atmosférica o ligero exceso de presión.

Para producción de terpeno, las células pueden ser cultivadas por cualquier tiempo, preferiblemente por lo menos 30 min, por lo menos 2 h, por lo menos 10 h, por lo menos 24 h, por lo menos 48 h, por lo menos 72 h, o incluso hasta por una semana, hasta por un mes, o hasta por varios meses. Las células pueden ser cultivadas por varias generaciones. Las células pueden ser cultivadas por más de 1 generación, por más de 5 generaciones, por más de 10 generaciones, por más de 15 generaciones, por más de 20 generaciones, por más de 25 generaciones, por más de 30 generaciones, por más de 35 generaciones, por más de 50 generaciones, por más de 100 generaciones, o incluso más.

Como es usado en el contexto de la presente invención, el término "aislamiento" en el contexto de las células se refiere, en el sentido más amplio, a la concentración de células de la presente invención. Las células pueden ser cosechadas. Las células pueden ser aisladas por cualquier método conocido en la técnica tal como, por ejemplo, centrifugación, filtración, filtración de flujo cruzado, cromatografía (por ejemplo, cromatografía de afinidad, exclusión por tamaño, intercambio iónico), o abrasión o aplicación de hisopo a una superficie sólida o una placa de cultivo. Alternativamente, las células pueden descender con el tiempo o pueden flotar debido a la formación de gases del contenedor que comprende dichas células. Alternativamente, las células no son aisladas, sino que las células y el medio son tratados adicionalmente juntos.

Las células aisladas pueden ser lavadas adicionalmente con un amortiguador o medio de cultivo adecuados. Preferiblemente, las células pueden ser lavadas por centrifugación, filtración, filtración de flujo cruzado, o cromatografía (por ejemplo, cromatografía de afinidad, exclusión por tamaño, intercambio iónico). Las células aisladas pueden ser analizadas por cualquier medio conocido en la técnica. Las células aisladas pueden ser interrumpidas, colocadas en estría sobre placas de cultivo, inoculadas en un cultivo en suspensión o pueden ser estabilizadas. Más preferiblemente, las células son aisladas como se muestra a manera de ejemplo en los ejemplos.

Como es usado en el contexto de la presente invención, el término "estabilizar" en el contexto de células se refiere, a cualquier medio de conservación de células. Preferiblemente, las células son estabilizadas en una forma que pueden ser almacenadas por un tiempo comparativamente largo y pueden ser usadas para formar un cultivo de célula viable posteriormente.

Las células pueden ser estabilizadas por congelamiento, liofilización o secado. Preferiblemente, las células son congeladas. Las células pueden ser congeladas a -20°C, -80°C, en hielo seco o en nitrógeno líquido. Preferiblemente, las células pueden ser congeladas en un medio adecuado para congelar las células de levadura. Este medio puede contener glicerol. Preferiblemente, las células pueden ser estabilizadas en amortiguadores acuosos o en agua suplementada con más de 2% (v/v), más de 5% (v/v), más de 10% (v/v), más de 20% (v/v), más de 30% (v/v), más de 40% (v/v), o más de 50% (v/v) de glicerol. A manera de ejemplo, las células de levadura

5 pueden ser congeladas en un medio que comprende 50% (v/v) de glicerol en agua. Como es usada través de la invención, la abreviación v/v se refiere a volumen por volumen. Un lote de células estabilizadas en una solución de glicerol puede ser designado como una solución madre de glicerol. Alternativamente, las células de levadura pueden ser secadas o liofilizadas, preferiblemente por la adición de un emulsificante, tal como por ejemplo, un ácido cítrico. Las células secadas o liofilizadas pueden ser almacenadas en condiciones secas a cualquier temperatura tal como, por ejemplo, a temperatura normal, a temperatura ambiente, a -4°C, -20°C, -80°C, en hielo seco o en nitrógeno líquido. Más preferiblemente, las células son estabilizadas como se muestra a manera de ejemplo en los ejemplos.

10 Las células estabilizadas pueden ser estables por lo menos por más de 1 día, preferiblemente más de 5 días, más preferiblemente más de 1 semana, incluso más preferiblemente más de 1 mes, e incluso más preferiblemente más de 1 año. Como se indica anteriormente, "estable" indica que la célula puede ser usada para formar un cultivo de célula viable después del tiempo de almacenamiento.

Alternativamente, las células no son aisladas, sino que las células y el medio son tratadas adicionalmente juntas.

15 En una realización preferida, la célula usada en el método de la presente invención es una célula de levadura, preferiblemente en la que dicha célula es una célula *Saccharomyces*, más preferiblemente en la que dicha célula es una célula *Saccharomyces cerevisiae*, en particular en la que dicha célula es derivada de una célula *Saccharomyces cerevisiae* de la cepa AH22.

Las células preferidas de la presente invención son caracterizadas en detalle anteriormente.

20 En una realización preferida adicionalmente, el paso de inserción de un gen que codifica para reductasa soluble HMG-CoA en una célula de levadura comprende la inserción de un vector que codifica para reductasa soluble HMG-CoA, en la que la expresión de dicha reductasa soluble HMG-CoA está bajo control de un promotor activo en dicha célula, preferiblemente un promotor constitutivo, en particular un promotor constitutivo fuerte.

En una realización adicional preferida, el uno o más genes que codifican para esterilaciltransferasas es/son ARE1 y/o ARE2, preferiblemente en la que ambos genes, ARE1 y ARE2, son defectuosos o eliminados.

25 Un tercer aspecto de la presente invención se relaciona con el uso de la célula de la presente invención para la producción de uno o más terpenos, preferiblemente para la producción de uno o más triterpenos, en particular para la producción de escualeno.

30 Como es usado aquí, el término "producción" puede hacer referencia a cualquier medio para obtener terpenos. La producción puede incluir producción a cualquier escala. La producción puede incluir producción a escala de laboratorio, es decir, producción de varios microgramos, varios miligramos, o varios gramos de terpenos. La producción puede incluir producción a escala semitécnica, es decir, producción de varios gramos o varios kilogramos de terpenos. Además la producción puede incluir producción a escala industrial, es decir, producción de varios kilogramos o toneladas de terpenos. La producción puede incluir adicionalmente uno o más pasos técnicos adicionales para la purificación o conservación de terpenos.

35 Como la mayoría de terpenos son altamente hidrófobos, los terpenos son típicamente acumulados en células. En un primer paso, las células pueden ser cosechadas por cualquier medio en la técnica tal como, por ejemplo, centrifugación, filtración, filtración de flujo cruzado, cromatografía (por ejemplo, cromatografía de afinidad, exclusión por tamaño, intercambio iónico), o abrasión o aplicación de hisopo a una superficie sólida o una placa de cultivo. Después, una pella de células puede ser obtenida por cualquier medio, preferiblemente por centrifugación, filtración, filtración de flujo cruzado. Alternativamente, las células pueden descender con el tiempo o pueden flotar debido a la producción de gases del recipiente que comprenden dichas células. Opcionalmente, las células son lavadas por cualquier medio conocido en la técnica tal como, por ejemplo, por centrifugación, filtración, filtración de flujo cruzado. La pella de células puede ser secada o puede no ser secada. Las células pueden ser lisadas por cualquier medio conocido en la técnica. Las células pueden ser lisadas por fuerza mecánica (por ejemplo, por homogenización (por ejemplo, por un homogeneizador de Potter o de Downs), por medio de una prensa celular, por ejemplo, una prensa Francesa), por detergentes, por tratamiento de ultrasonido, o por fagos líticos. Opcionalmente, los terpenos pueden ser extraídos por extracción con solvente, por ejemplo, con un solvente orgánico. Opcionalmente, el solvente orgánico puede ser evaporado subsecuentemente. Alternativamente o adicionalmente, los terpenos pueden ser aislados, dependiendo de su naturaleza química específica, por métodos de cromatografía (por ejemplo, cromatografía de fase, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de fase inversa, cromatografía de exclusión de tamaño, cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC), cromatografía líquida de presión ultra alta (UPLC), cromatografía de proteína rápida (FPLC)), por electroforesis, electroforesis capilar (CE), o por destilación.

Un aspecto adicional de la presente invención se relaciona con un método para la producción de uno o más

terpenos, preferiblemente triterpenos, más en particular escualeno, donde dicho método comprende:

a.) cultivo de células de la presente invención en un medio de cultivo adecuado; y

b.) aislamiento de uno o más terpenos, preferiblemente uno o más triterpenos, más en particular escualeno de las células o del cultivo de células del paso a.).

- 5 Será entendido por una persona experta en la técnica, que para la producción eficiente de terpenos, las células tienen que ser cultivadas por lo menos por varias horas, preferiblemente por lo menos por 12 h, más preferiblemente for por lo menos 24 h, incluso más preferiblemente por lo menos por 48 h o por lo menos 72 h o incluso más. Las células pueden ser cultivadas por varias generaciones. Las células pueden ser cultivadas por más de 5 generaciones, por más de 10 generaciones, por más de 15 generaciones, por más de 20 generaciones, por más de 25 generaciones, por más de 30 generaciones, por más de 35 generaciones, por más de 50 generaciones, por más de 100 generaciones, o incluso más. Un cultivo en suspensión puede ser agitado o sacudido.

Como es usado aquí, el término "aislamiento de uno o más terpenos" puede ser entendido en el sentido más amplio como la purificación de los terpenos del caldo de cultivo. Los terpenos pueden ser acumulados en las células o pueden ser secretados por las células y por lo tanto, presentes en el medio de cultivo.

- 15 Las células son cosechadas y lavadas opcionalmente como se describe anteriormente. Subsecuentemente, las células pueden ser lisadas por cualquier medio conocido en la técnica e indicado anteriormente. Opcionalmente, los terpenos pueden ser extraídos por extracción de solvente, con un solvente orgánico. Opcionalmente, el solvente orgánico puede ser evaporado subsecuentemente. Alternativamente o adicionalmente, los terpenos pueden ser aislados, dependiendo de su naturaleza química específica, por métodos cromatográficos (por ejemplo, cromatografía de fase, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de fase inversa, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC), cromatografía líquida de presión ultra alta (UPLC), cromatografía de proteína rápida (FPLC)), por electroforesis, electroforesis capilar (CE), o por destilación.

- 20 Un aspecto adicional de la presente invención se relaciona con un método para la producción de una composición farmacéutica o cosmética, un lubricante o un aceite de transformador, en particular para la producción de una composición de vacuna, donde dicho método comprende:

a.) producir uno o más terpenos de acuerdo con la presente invención; y

- b.) mezclar dichos terpenos hasta dicha composición farmacéutica o cosmética, dicho lubricante o dicho aceite de transformador, en particular hasta dicha composición de vacuna; en la que dicho uno o más terpenos es/son sometidos además opcionalmente a uno o más pasos de hidrogenación, en los que el dicho uno o más terpenos es/son preferiblemente triterpenos hidrogenados, en particular escualeno.

El término "mezclar" puede ser entendido en el sentido más amplio como la adición de los terpenos a una composición de interés.

- 35 Una composición farmacéutica puede hacer referencia a cualquier composición farmacéutica que comprende un terpeno obtenible por una célula de la presente invención. En una composición farmacéutica, el terpeno puede ser usado preferiblemente como adyuvante, como humectante de la piel, como agente mucolítico, como hormona, como fragancia, como lubricante, como agente antimicrobiano, como agente antiinflamatorio, o como antioxidante.

- 40 Una composición cosmética puede hacer referencia a cualquier composición cosmética que comprende un terpeno obtenible por la célula de la presente invención. En una composición cosmética, el terpeno puede ser usado preferiblemente como humectante de la piel, como fragancia, o como antioxidante. El terpeno también puede ser usado como aditivo de alimentos. Adicionalmente, el terpeno puede ser usado como feromona (por ejemplo, feromonas de insectos para el control de plagas), como hormona (por ejemplo, feromonas de insectos para el control de plagas), como lubricante, como aislante eléctrico, como aceite de transformador o aditivo de aceite de transformador, y como producto químico en bruto en la industria química, industria cosmética y farmacéutica.

- 45 Preferiblemente, el terpeno obtenido por el método de la presente mención es escualeno. El escualeno puede ser preferiblemente usado como aditivo en composiciones farmacéuticas y cosméticas, como humectante de piel, como lubricante, como aceite de transformador o como aditivo de aceite de transformador, como sustancia química en bruto en la industria química. Más preferiblemente, el escualeno obtenido por el método de la presente invención puede ser usado en composiciones farmacéuticas y cosméticas, en particular en la preparación de una emulsión que puede ser usada como un adyuvante de vacuna.

- 50 El terpeno puede ser usado para la producción de uno o más terpenos hidrogenados, preferiblemente uno o más triterpenos hidrogenados. En particular, el escualeno puede ser usado para la producción de escualeno. Para este propósito, el escualeno puede ser sometido a uno o más pasos de hidrogenación por cualquier método conocido en

la técnica.

Como es usado aquí, el término "paso de hidrogenación" se refiere a la hidrogenación de uno o más enlaces dobles o triples, preferiblemente uno o más enlaces dobles, en particular uno o más enlaces dobles entre átomos de carbono de un terpeno por la adición de hidrógeno. A manera de ejemplo, un terpeno puede ser hidrogenado por medio de un convertidor catalítico (por ejemplo, catalizadores basados en platino, paladio, rodio, níquel, iridio y/o rutenio), formación de gas con hidrógeno o una mezcla de gases que contiene hidrógeno, reacción con agentes reductores tales como, por ejemplo, borohidruro de sodio, un proceso enzimático (por ejemplo por enzimas que convierten, nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) y/o un fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido (NADPH)) o una combinación de dos o más de los mismos. Las enzimas que convierten NADH y/o NADPH también pueden ser clonadas dentro del genoma de una célula de la presente invención. Preferiblemente, en un terpeno hidrogenado, están hidrogenados la mayoría o incluso todos los enlaces dobles y/o triples de la molécula de terpeno, más preferiblemente están hidrogenados todos los enlaces dobles y/o triples de la molécula de terpeno. Preferiblemente, el terpeno hidrogenado es un triterpeno hidrogenado, más preferiblemente escualeno hidrogenado. Más preferiblemente, el terpeno hidrogenado es escualeno. El escualeno puede ser usado preferiblemente en una composición cosmética o farmacéutica, en particular en un producto cosmético.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la estrategia de clonación del vector pPTHTL. El fragmento HMG1 de pUC19-tHMG1 es escindido por EcoR1 y BamHI, y es integrado en el plásmido pT2b escindido con EcoRI y BamHI. El gen LEU2 es clonado como un fragmento de extremos romos. Por lo tanto, YEpl3 fue escindido con XhoI y Sall y se llenaron los extremos pegajosos. Se abrió pPT2btHMG1 por NruI.

La figura 2 muestra una descripción esquemática del vector YEph2. El casete de expresión de pPT2b-tHMG1 como fragmento de EcoRV/NruI está ligado dentro de Yep 13 abierto y llenado con SphI.

La figura 3 muestra la estrategia de clonación para el vector integrador YDpUHK3. El casete de expresión como fragmento EcoRV/NruI de YEph2 está ligado en YDpU escindido con StuI. El fragmento de HindII de pUCTK23 está ligado con YDpUH2/12 escindido con SmaI.

La figura 4 muestra una descripción esquemática del casete de expresión tHMG1 integrado en locus URA3 (incubada). El vector YDpUHK3 transformado en lineal con EcoRV (A) está integrado dentro del gen cromosómico URA3 (B). El plásmido se integra como integración individual (C) o como repetición en tándem. A través de recombinación homóloga ya sea el vector completo se pierde (flecha discontinua) o una parte del plásmido se pierde (flecha continua). Si el casete de expresión permanece, la situación mostrada abajo D es ejecutada en el locus URA3.

La figura 5 muestra una descripción esquemática del procedimiento, que fue usado para eliminar los genes ARE1, ARE2 en la cepa AH22tH3ura8

La figura 6 muestra una descripción esquemática de los plásmidos pUG6 (Fig. 6A) y pSH47 (Fig. 6B).

La figura 7 muestra los resultados de cultivo de la cepa AH22tH3ura8Aare1Δare2HUL en un fermentador de escala de laboratorio (5 litros). La figura 7A muestra el crecimiento de la levadura con el tiempo. Se ilustra el peso de células secas (CDW) en g/L y la densidad óptica (OD_{600nm} /mL) en el curso de la fermentación. La figura 7B muestra la productividad de escualeno después de 66 h y 72 h. Las producciones de escualeno son descritas en porcentaje por peso de células secas y productividad volumétrica en g/L de caldo de fermentación en el curso de la fermentación.

La figura 8 muestra una cromatografía de capa delgada de extractos de lípidos completos de cepas mutantes construidas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Ejemplos

[0122] Los siguientes ejemplos así como las figuras acompañantes pretenden proporcionar realizaciones ilustrativas de la presente invención descritas y reivindicadas aquí. Estos ejemplos no pretenden proporcionar cualquier limitación en el alcance del tema objeto de la invención.

Ejemplo 1

Construcción de la cepa AH22tH3ura8Δare1Δare2

1.1 Cepa AH22tH3ura8 base (Polakowski et al., 1998)

La AH22tH3ura8 está basada en la cepa AH22 (Hinnen et al., 1978) que es un derivado de S288c (Mortimer y

Johnston, 1986). La cepa S288c y la cepa AH22 pueden ser obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC). La cepa S288c es obtenible de la ATCC bajo el número ATCC 26108. La cepa AH22 es obtenible de la ATCC bajo el número ATCC: 38626.

La AH22 está caracterizada como sigue:

5 genotipo: MATa leu2-3 leu2-112 his4-519 can1

fenotipo: leu2, his4

La cepa AH22 de la *Saccharomyces cerevisiae* de la levadura pertenece al grupo de microorganismos que generalmente se reconocen como seguros (nivel 1 de bioseguridad). Se prepararon soluciones madre de glicerol de la cepa AH22.

10 La cepa AH22tH3ura8 se construyó por integración de un casete de expresión tHMG 1 dentro del locus URA3 (Polakowski et al., 1998). Este casete de expresión comprende una versión truncada, constitutiva del promotor ADH1, una versión truncada del gen HMG1 y terminador TRP1 (véase abajo para detalles de construcción).

La cepa AH22tH3ura8 está caracterizada como sigue:

genotipo: MATa leu2-3 leu2-112 his4-519 can1 ura3::tHMG1

15 fenotipo: ura3, leu2, his4

1.2. Integración del casete de expresión tHMG1 dentro del locus URA3 (Estrategia de clonación e integración)
Estrategia de clonación para el vector pPTHTL

20 La secuencia de ADN para tHMG1 (Basson et al., 1988) fue simplificada través de PCR desde ADN genómico de la cepa S288c de *Saccharomyces cerevisiae* (Mortimer y Johnston, 1986) con uso de métodos estándar. Los cebadores que fueron usados para este propósito son los oligómeros tHMG-5' y tHMG-3' de ADN (Tabla 1). El fragmento de ADN que se obtuvo (SEQ ID NO:2) se introdujo dentro del sitio SmaI del vector de clonación pUC19 (Yanisch-Perron et al., 1985) después de un tratamiento de Klenow, y dio el vector pUC19-tHMG1 producido (véase figura 1).

25 Después del aislamiento del plásmido y restricción de pUC19-tHMG1 con endonucleasas EcoR1 y BamH1, fue introducido el fragmento obtenido dentro del vector de expresión de levadura pPT2b (Lang y Looman, 1995), que también fue tratado con EcoR1 y BamH1. El plásmido resultante pPT2b-tHMG1 contiene el promotor ADH1 truncado (Bennetzen y Hall, 1982 y el terminador TRP1 (Tschumper y Carbon, 1980) y entre la región tHMG1 que codifica. El gen LEU2 fue escindido del vector de levadura YEpl3 (Parent et al., 1985) con XhoI y Sall y se ligaron los extremos romos dentro del vector pPT2b-tHMG1 (que contiene el promotor también llamado ADH1 de longitud media, el gen tHMG1 y el terminador TRP1) restringidos con Nru1 que resulta en vector pPTHTL (véase figura 1).

La estrategia de clonación para el vector YEPh2.

El vector YEPh2 (véase figura 2) se construyó por ligación de extremos romos del vector (con SphI) transformado en lineal YEpl3 con el casete de expresión tHMG1 (forma corta del promotor ADH1; corriente abajo del sitio EcoRV, Bennetzen y Hall, 1982) cortado desde el vector pPT2b-tHMG1 (figura 1) con EcoRV y Nru1.

35 La estrategia de clonación para el vector integrador YDpUHK3.

[0131] Se introdujo el casete de expresión tHMG1 cortada del vector YEPh2 (véase figura 2) con EcoRV y Nru1 (ligada) dentro del vector YDpU (Berben et al., 1991), que fue tratada con StuI. El vector resultante YDpUH2/12 (véase figura 3) fue tratado con endonucleasa SmaI y ligado con un fragmento HindIII del vector pUCTK23 que codifica para la resistencia de kanamicina (Webster y Dickson, 1983). La estructura que se produce (YDpUHK3, véase figura 3) fue tratado con EcoRV antes a la transformación de levadura. La cepa AH22 de levadura de *Saccharomyces cerevisiae* (Hinnen et al., 1978) fue transformada con esta estructura a través del método de acetato de litio descrito por Gietz et al. (Gietz, D., et al., 1992). La transformación de la levadura con este vector transformado en lineal da como resultado una integración cromosómica del vector total en el locus del gen URA3 (véase figura 4). Para eliminar las áreas del vector integrado que no son parte del casete de expresión (origen *E. coli*, gen de resistencia a la ampicilina de *E. coli*, promotor TEF y gen de resistencia de kanamicina), las levaduras transformadas fueran sometidas a la presión de selección por 5-FOA (Boeke et al., 1987) que promueve la levadura auxotrófica para uracilo. La cepa auxotrófica para uracilo que fue seleccionada en placas que contienen 5-FOA (AH22tH3ura8) exhibe el casete de expresión tHMG1 como integración cromosómica en el locus URA3 (véase figura 4).

50 La SEQ ID NO:3 representa la secuencia del casete de expresión tHMG1 integrada dentro del locus URA3 en la

cepa AH22tH3ura8 (que incluye regiones que codifican URA3 (véase Fig. 4D)).

1.3. Eliminación de los genes ARE1, ARE2 en la cepa AH22tH3ura8

El casete de eliminación con el gen marcador kanMX (que codifica para la resistencia de genitocina) se amplificó desde el plásmido pUG6 (Guldener et al., 1996) (véase figura 6) con cebadores (are1crelox hacia delante (fw), are1crelox en reversa (rev) y are2crelox fw, are2crelox rev, respectivamente; Tabla 1) introduciendo secuencias cortas de flaqueo, que son homólogas al objetivo locus ARE1 y ARE2 (véase Figura 5). Los casetes de eliminación (secuencias de SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:5) fueron transformados dentro de levaduras a través del método de acetato de litio descrito por Gietz et al. (Gietz, D., et al., 1992).

Después de la integración del casete dentro del locus objetivo, que conduce a una pérdida del gen correspondiente, se recuperó el gen marcador kanMX por el procedimiento de crececombinasa (Guldener et al., 1996) con el fin de ser capaz de rehusar este marcador para eliminaciones o integraciones cromosómicas, respectivamente.

El procedimiento de crececombinasa requiere la transformación de las cepas de levadura con el plásmido pSH47 (véase figura 6), que porta un gen para la crececombinasa de enzima. Esta enzima es capaz de recombinar los dos sitios loxP flanqueando el gen de resistencia kanMX. Este evento de recombinación conduce a una pérdida de este gen marcador dejando un sitio loxP en el locus objetivo.

Las colonias, que han perdido el plásmido pSH47 fueron identificadas a través de selección en contador en placas con ácido 5-fluoroorótico (Guldener et al., 1996) y recogidas para propósitos de construcción adicionales o como cepas finales.

Tabla 1: Oligonucleótidos (cebador) usados para construir la cepa AH22tH3ura8Δare1Δare2

| Número | Nombre | Secuencia |
|--------|----------------|---|
| 1 | tHMG-5' | ACTATG GACCAATTGGTGAAAACCTG |
| 2 | tHMG-3' | AGTCACATGGTGCTGTTGTGCTT |
| 3 | are1crelox fw | ATGACGGAGACTAAGGATTTGTTGCAAGACG AAGAGTTTCccagctgaagcttcgtacgc |
| 4 | are1crelox rev | TCATAAGGTCAGGTACAACGTCATAATGATAC TGGGCCCTgcataggccactagtgatctg |
| 5 | are2crelox fw | ATGGACAAGAAGAAGGATCTACTGGAGAACG AACAATTTCCcagctgaagcttcgtacgc |
| 6 | are2crelox rev | TTAGAATGTCAAGTACAACGTACACATGACAC TTGGTCCCgcataggccactagtgatctg |

Se prepararon 10 soluciones madre de glicerol de la cepa AH22tH3ura8Δare1Δare2. Las letras mayúsculas en la Tabla 1 representan las áreas homólogas del loci objetivo, en el que el casete de gen integrador respectivo es integrado/ha sido integrado. Estas áreas pueden ser responsables de la integración cromosómica del casete de gen en el loci objetivo (a través de recombinación homóloga; por ejemplo, ARE1 y ARE2, respectivamente). En consecuencia, estas áreas pueden estar localizadas en el inicio y en el final de un casete de integración.

Ejemplo 2

La composición neutra de lípido y los esteroides libres de las cepas construidas se evaluaron a través de cromatografía de capa delgada (TLC). Se ejecutaron la extracción de lípido completa y cromatografía de capa delgada de acuerdo al protocolo de abajo.

30 Análisis de TLC (cromatografía de capa delgada):

Procedimiento de cultivo:

El procedimiento de cultivo de las cepas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para análisis de TLC fue:

Precultivo: se inocularon 20 ml del medio WMVIII en un matraz de agitación de 100 ml, con 50 µl de la correspondiente solución madre de glicerol y se cultivaron por 48 h a 30°C y 150 rpm.

Cultivo principal: se inocularon 50 ml del medio WMVIII en un matraz de agitación de 250 ml con deflectores, con 1 % del precultivo y se cultivaron por 72 h a 30°C y 150 rpm.

5 Preparación de la muestra:

Se cosecharon 3 x 0.5 mL del caldo de cultivo en tubos Eppendorf (triplicados) y se transformaron en pellas través de centrifugación a 4000 rpm, 5 min. Se descartó el sobrenadante. Las pellas de levadura fueron suspendidas nuevamente en 200 µL de amortiguador TE (pH = 8,0). Se añadieron 200 µL de perlas de vidrio y 200 µL de cloroformo/metanol (80:20 (% en vol.)).

- 10 Las muestras se agitaron en vórtice por 5 x 1 min (en los intervalos enfriados sobre hielo). Se hizo un hueco en el fondo del tubo de Eppendorf con una aguja. Se colocó el tubo de reacción en otro tubo Eppendorf de 1.5 ml y se centrifugó (1000 g por 2 min). Se descartó el tubo Eppendorf superior con las perlas de vidrio. Se cerró el tubo Eppendorf inferior y se centrifugó (13,000 g, 15 min). Durante la centrifugación se formó una fase encima y debajo de la pella. La fase orgánica inferior fue transferida dentro a un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se analizó a través de
- 15 cromatografía de capa delgada. TLC (cromatografía de capa delgada):

Fase estacionaria: gel de sílica 60 F254, 10 x 20 cm, espesor de la capa de sílica de 0.2 mm.

Fase móvil: éter de petróleo: dietiléter : ácido acético (90 : 10 :1 (% en vol.))

Cantidad de la muestra: 10 µL

Tiempo de ejecución: hasta 1 cm debajo de la parte superior de la placa.

- 20 Detección: tinción con vapor de yodo (detección de escualeno, triacilgliceroles, esteroles y esteril ésteres).

Resultados:

- 25 La figura 8 muestra la composición de lípido completa/neutra de la cepa de tipo silvestre AH22ura3, la cepa con la reductasa HMG-CoA AH22tH3ura8 desregulada y la cepa AH22tH3ura8Δare1Δare2 de eliminación doble. La figura 8 indica que la cepa de tipo silvestre (AH22ura3, carril 1 y 2) produjo cantidades muy bajas de escualeno en comparación con las cepas en el carril 3 a 6, que expresa la reductasa HMG-CoA desregulada y produce altas cantidades de escualeno. La eliminación de los genes que codifican para las enzimas responsables de la formación de esteril ésteres (ARE1, ARE2) resultaron en una completa carencia de estos componentes en la cepa correspondiente (indicado por el cuadro negro superior en el carril 5 a 6). La eliminación de los genes que codifican para las enzimas responsables de la formación de esteril ésteres (ARE1, ARE2) no condujo a una acumulación de esteroles libres (comparar carril 3 y 4 con carril 5 y 6; indicado por la caja negra más baja). Esto fue sorprendente,
- 30 en la medida que se esperaba que el contenido de esteroles libres incrementara en una cepa que carece de la habilidad de guardar esteroles como esteril ésteres.

Los componentes lípidos fueron identificados a través de los estándares de escualeno, colesteril 1-oleato, trioleato, oleato y ergosterol (no mostrados).

35 **Ejemplo 3**

Construcción de la cepa prototrófica AH22tH3ura8Δare1Δare2 (cepa final 1) y producción y almacenamiento de banco de células.

3.1. Detalles de construcción de la cepa, cebador y secuenciación

Construcción de la cepa AH22tH3ura8Δare1Δare2H (cepa intermedia 1):

- 40 Un clon prototrófico HIS4 (de reversión) de la cepa AH22tH3ura8Δare1Δare2 fue seleccionado sobre una placa que carece de histidina después de formar estrías en un cultivo líquido de AH22tH3ura8Δare1Δare2 con un bucle inoculante (véase abajo).

Construcción de la cepa AH22tH3ura8Δare1Δare2HL (cepa intermedia 2):

- 45 La región que codifica del gen LEU2 fue amplificada desde ADN genómico de la cepa S288c con cebador 1 y cebador 2 (véase Tabla 2 para secuencias de cebadores). El casete de gen resultante fue transformada en la cepa AH22tH3ura8Δare1Δare2 H. La integración correcta dentro del locus objetivo LEU2 (YCL018W) a través de recombinación homóloga fue verificada a través de análisis de PCR con cebador 3 y cebador 2 (fusión por PCR en

la región 5' UTR del locus LEU2 y en la región que codifica LEU2; véase Tabla 2 para secuencias de cebadores).

Construcción de la cepa AH22tH3ura8Δare1Δare2HUL (cepa final 1):

5 El casete de expresión nativo del gen completo URA3 (que incluye el promotor y terminador nativo) fue amplificado desde ADN genómico de la cepa S288c con cebador 4 y cebador 5 que introducen secuencias sobresalientes 5' y 3' (40 pb en longitud), que son homólogas al locus de integración objetivo. El locus nativo del gen URA3 no fue usado como locus objetivo, porque el casete de expresión tHMG está integrado dentro de este locus en la cepa AH22tH3ura8Δare 1Δare2HL. Se escogió como locus de expresión cromosómica alternativo el locus HO. Fue transformado el casete de expresión URA3 (que incluyen el promotor y terminador nativo) en la cepa AH22tH3ura8Δare1Δare2 HL. Se verificó la integración correcta dentro del locus objetivo HO (YDL227C) a través de recombina-
10 ción homóloga a través de análisis de PCR con cebador 6 y cebador 7 (fusión por PCR en la región 5' UTR y en la región 3' UTR del locus HO; véase Tabla 2 para secuencias de cebador).

Secuenciamiento:

15 La reversión de la mutación his4-519 (mutación de desplazamiento de marco, contiene inserción base que resulta en secuencia 5'-GGGG-3' mRNA en lugar del codón de glicina 5'-CCC-3' de tipo silvestre (Gaber y Culbertson, 1982)) se comprobó a través del secuenciamiento de un producto de amplificación por PCR, que fue generado por amplificación de la secuencia que codifica HIS3 correspondiente desde ADN genómico de la cepa AH22tH3ura8Δare1Δare2HUL con cebador 8 y cebador 9 (fusión por PCR en la mitad de la reacción que codifica HIS4 y en la región 3' UTR del locus HIS4; véase Tabla 2 para secuencias de cebadores).

20 Resultado: la secuencia es correcta (corresponde a la secuencia de S288c, que está depositada en <http://www.yeastgenome.org>). Ocurrió reversión de la mutación his4-519. En caso de la mutación his4-519, la reversión del fenotipo auxotrófico para histidina también puede ocurrir a través de una mutación de supresor extragenética en glicina tARN (Gaber y Culbertson, 1982).

25 Se comprobó la secuencia correcta de la región que codifica LEU2 en el locus LEU2 (YCL018W) en la cepa AH22tH3ura8Δare1Δare2HUL a través del secuenciamiento de un producto de amplificación de PCR, que fue generado por amplificación de toda la secuencia que codifica LEU2 incluyendo una parte del 5' UTR del locus LEU2 del ADN genómico de la cepa AH22tH3ura8Δare1Δare2HUL con cebador 3 y cebador 2 (véase Tabla 2 para secuencias de cebadores).

Resultado:

30 La a secuencia es correcta (corresponde a la secuencia de S288c, que está depositada en <http://www.yeastgenome.org>).

35 Se comprobó la secuencia correcta del casete de expresión nativa del gen URA3 (que incluye el promotor y terminador nativo) integrada dentro del locus HO (YDL227C) en la cepa AH22tH3ura8Δare1Δare2HUL a través del secuenciamiento de un producto de amplificación por PCR, que fue generado por amplificación del casete de expresión del gen URA3 desde ADN genómico de la cepa AH22tH3ura8Δare1Δare2HUL con cebador 6 y cebador 7 (fusión por PCR en la región 5' UTR y la región 3' UTR del locus HO; véase la Tabla 2 para secuencias de cebadores).

Resultado:

40 La secuencia es correcta (corresponde a la secuencia de S288c, que está depositada en <http://www.yeastgenome.org>).

Tabla 2: Oligonucleótidos (cebador) usados para construir la cepa AH22tH3ura8Δare1Δare2HUL

| | Nombre | Secuencia |
|---|-------------|---|
| 1 | LEU2 fw | ATGTCTGCCCTAAGAAGATC |
| 2 | LEU2 rev | TTAAGCAAGGATTTTCTTAAC TTC |
| 3 | 5' LEU2 fw | GGTGGTTAGCAATCGTCTTAC |
| 4 | ho::URA3 fw | ATGCTTTCTGAAAACACGACTATTCTGATGGC TAACGGTGAATGTGGCTGTGGTTTCAGGGTC |

| | | |
|---|----------------|--|
| 5 | ho::URA3 rev | TTAGCAGATGCGCGCACCTGCGTTGTTACCAC AACTCTTATCCTTTTTATAAAGGCCATGAAGC |
| 6 | 5' HO fw | CATAAGCAGCAATCAATTCTATC |
| 7 | 3' HO rev | ATTTCTACTCCAGCATTCTAG |
| 8 | HIS4 mitad fw. | TCTGAATATGAAGCATCTGAAG |
| 9 | 3' HIS4 rev. | ATGGCGCTAATGTCTTCAATAC |

3.2 Preparación de soluciones madre de glicerol de la cepa intermedia 1 AH22tH3ura8Δare1Δare2H

Se preparó medio WMVIII como es mostrado por Lang y Looman (Lang y Loomann, 1995).

- 5 Se inoculó la cepa AH22tH3ura8Δare1Δare2 con 50 µl de una solución madre de glicerol en 20 mL de medio WMVIII suplementado con uracilo (100 mg/L) y leucina (400 mg/L) en un matraz de agitación de 100 mL sin deflectores y se incubó por 72 h a 30°C y 150 rpm (Inóculo 0).

El Inóculo 0 fue colocado en estrías con un bucle de inoculación en una placa de agar WMVIII suplementada con uracilo (100 mg/L) y leucina (400 mg/L) (no histidina), que fue incubada por 72 h a 30°C (placa 1). El número de colonia (número de reversiones) no fue determinado.

- 10 El Inóculo 1 fue inoculado con una colonia recogida de la placa 1 en 20 mL de medio WMVIII suplementado con uracilo (100 mg/L) y leucina (400 mg/L) en un matraz de agitación de 100 mL sin deflectores y se incubó por 72 h a 30°C y 150 rpm (Inóculo 1).

- 15 El Inóculo 2 fue inoculado con 350 µl de Inóculo 1 en 35 mL de medio WMVIII suplementado con uracilo (100 mg/L) y leucina (400 mg/L) en un matraz de agitación de 100 mL sin deflectores y se incubó por 48 h a 30°C y 150 rpm (Inóculo 2).

Se usó el Inóculo 2 para preparar soluciones madre de glicerol de cepa 1 intermedia (AH22tH3ura8Δare1Δare2H). Se prepararon las soluciones madre de glicerol por mezcla de 0.5 mL de Inóculo 2 con 0.5 mL de solución de glicerol (50% (v/v) glicerol en agua). Se pudieron transportar 10 soluciones madre de glicerol en cepa intermedia 1 AH22tH3ura8Δare1Δare2H sobre hielo seco.

- 20 Prueba del Inóculo 2:

a) Densidad óptica del Inóculo 2:

DO₆₀₀/mL: 39.44

b) Viabilidad de las células del Inóculo 2 (antes de la preparación de soluciones madre de glicerol):

- 25 Se calculó la viabilidad de las células del Inóculo 2 en % por división de las unidades formadoras de colonia por el número de células (x100). El número de células se determina por recuento en una cámara de recuento Thoma. Las unidades formadoras de colonia se determinaron por colocación de estrías de una dilución apropiada del Inóculo 2 en una placa de agar WMVIII suplementada con uracilo (100 mg/L) y leucina (400 mg/L).

c.) La cámara de recuento Thoma: dilución 1:10 del Inóculo 2

1. recuento: 34; 31; 38; 32; 39

- 30 2. recuento: 31; 37; 31; 33; 31

$$33.7 \text{ células} \times 1.25 \times 10^6 \times 10 = 4.2 \times 10^8 \text{ células / mL inóculo 2}$$

d.) colonias en placa:

50 µl de una dilución 10⁻⁵ del Inóculo 2 aplicada en una placa WMVIII

contadas: 207 colonias x 10⁵ x 20 = 4.14 x 10⁸ colonias / mL del Inóculo 2

- 35 viabilidad: $4.1 \times 10^8 \times 100 / 4.2 \times 10^8 \rightarrow 98.6\%$

Viabilidad de las células del Inóculo 2: 98.6%

e.) Pureza y fenotipo:

Tabla 3: 50 µl de Inóculo 2 (diluido a 10^{-5} con agua o sin diluir como se indicó) fueron colocados en estrías en placas indicadas e incubadas por 48 h a temperaturas indicadas para determinar pureza y fenotipo (auxotrofías)

| Cepa (Inóculo 2) | Placas | Temperatura de incubación | Observación |
|-------------------------|--------------------------|---------------------------|---|
| AH22tH3ura8Δare1Δar e2H | YE | 30°C | colonias de levadura individuales (Inóculo 2 se diluyo a 10^{-5} antes de aplicación por estría en una placa) |
| | WMVIII + Ura + Leu | 30°C | colonias de levadura individuales (Inóculo 2 se diluyo a 10^{-5} antes de aplicación por estría en una placa) |
| | LB | 37°C | sin crecimiento (no diluido) |
| | WMVIII (sin aminoácidos) | 30°C | sin crecimiento (no diluido) |
| | WMVIII + Ura + His | 30°C | sin crecimiento (no diluido) |
| | WMVIII + Ura + His | 30°C | sin crecimiento (no diluido) |

5

En el Inóculo 2 se evaluó también contaminaciones bacterianas bajo el microscopio → No se pudo detectar contaminación bacteriana.

3.3 Construcción de la cepa 2 intermedia y preparación de soluciones madre de glicerol de la cepa 2 intermedia AH22tH3ura8Δare1Δare2HL

10 Construcción (procedimiento técnico):

Se ejecuta la transformación y prueba de PCR en integración correcta del casete de expresión LEU2 dentro del locus LEU2 por medios bien conocidos en la técnica y descritos abajo.

Resultados de transformación de levadura:

15 La transformación fue llevada a cabo como se describe por Gietz et al. (Gietz, D., et al., 1992). La eficiencia de transformación (transformación integradora) varía entre 10^2 - 10^3 transformante es por µg de ADN.

La muestra 1 cultivada en una placa de control (AH22tH3ura8Δare1Δare2H y sin ADN) no conduce al crecimiento de colonia. El cultivo de muestra 2 en el que el casete AH22tH3ura8Δare1Δare2H + LEU2 fue insertado conduce a colonias con diferencias detectables.

20 Se recogieron 15 colonias en una placa nueva WMVIII y se incubaron por 72 h a 30°C. Se evaluaron cinco colonias por PCR. La colonia más grande fue seleccionada para preparación de solución madre de glicerol. La evaluación experimental de las cinco colonias reveló que todas las cinco colonias eran usables. Todas las cinco muestras mostraron que el ADN analizado contenía el gen LEU2.

PCR:

25 Se obtuvo la plantilla de colonias de Transformación de Levadura, del Inóculo 2 en placas de agar nuevas. Se usan PuRe Taq Ready To Go-Beads (GE Healthcare: Lot: 384777) como una polimerasa de Taq en un volumen de 25 µl.

ES 2 582 637 T3

Esto conduce a perlas disueltas en 23 μ l de H₂O-HPLC estéril y adición de 1 μ l de cada cebador fw./ rev. (véase Tabla). La máquina de PCR usada fue obtenida de Flex Cycle Analytik, Jena.

Programa de PCR

paso 1: 94°C 3 min

5 paso 2: 94°C 30 seg

paso 3: 53°C 30 seg

paso 4: 72°C 2 min a paso 2 40 ciclos

paso 5: 72°C 3 min

paso 6: 4°C

10 La PCR fue ejecutada con colonias 1, 2, 3, 4 y 5 de AH22tH3ura8 Δ are1 Δ are2HL y cada 1 μ l de cebador (10 pmom/ μ l de dilución) de cebadores 5'LEU2 fw y LEU2 rev. El producto de amplificación tiene una longitud de aproximadamente 1185 pb. Electroforesis en gel en un gel de agarosa al 1%:

15 Se cargaron en un carril 0.5 g de Agarosa Seakem LE de Biozym en un matraz de agitación de 100 mL + 50 mL 1 x amortiguador TAE, 6 μ L de una escalera de 1 kb (NEB) (500 ng/carril). Adicionalmente 10 μ L de la muestra de cada amplificación fue mezclada con 2 μ L 6 x carga de amortiguador y la mezcla fue cargada en un gel de agarosa. El gel fue ejecutado a 120 V por 45 min en 1 x amortiguador TAE. A continuación, el gel fue incubado en un baño de bromuro de etidio (EtBr) por 20 min (Solución madre de EtBr conc.: 10 mg/ mL: baño: 30 μ L /300 mL 1x amortiguador TAE). Finalmente, el gel fue analizado por documentación fotográfica (Alfa innotech: OrgBal 48; ajustes opcionales: exp. 0.12 s, compartimiento 1x1, b: 0, w: 66, g: 0.95).

20 Resultados:

25 Todos los 5 carriles cargados con la muestra mostraron que la cepa fue una cepa AH22tH3ura8 Δ are1 Δ are2HL. Las cinco colonias mostraron productos amplificados de aproximadamente 1200 pb. De acuerdo con la electroforesis de gel, los resultados para todas las cinco colonias analizadas contienen el inserto correcto. Por lo tanto, la amplificación del gen LEU2 dio resultados positivos en todas las 5 colonias de la cepa AH22tH3ura8 Δ are1 Δ are2HL.

Preparación de las soluciones madre de glicerol de la cepa AH22tH3ura8 Δ are1 Δ are2HL

30 La cepa AH22tH3ura8 Δ are1 Δ are2HL fue inoculada con la colonia escogida de una placa de agar WMVIII suplementada con uracilo (100 mg/L) (placa 1; véase abajo; no igual a la placa de transformación) en 20 mL de medio WMVIII suplementado con uracilo (100 mg/L) en un matraz de agitación de 100 mL sin deflectores e incubado por 72 h a 30°C y 150 rpm (Inóculo 1).

La placa 1 fue generada por escogencia de colonias individuales para la placa de transformación (véase figura 1), la cual fue generada por transformación de la cepa AH22tH3ura8 Δ are1 Δ are2H con un fragmento de ADN que comprende la secuencia LEU2 que codifica. Se usó la placa uno, no la placa de transformación, para procedimientos adicionales.

35 El Inóculo 2 fue inoculado con 350 μ L del Inóculo 1 en 35 mL de medio WMVIII suplementado con uracilo (100 mg/L) en un matraz de agitación de 100 mL sin deflectores e incubada por 48 h a 30°C y 150 rpm (Inóculo 2).

40 El Inóculo 2 se usó para preparar soluciones madre de glicerol de la cepa 2 intermedia (AH22tH3ura8 Δ are1 Δ are2HL). Las soluciones madre de glicerol fueron preparadas por mezcla de 0.5 mL del Inóculo 2 con 0.5 mL de solución de glicerol (50% (v/v) glicerol en agua). Se pudieron transportar 10 soluciones madre de glicerol en hielo seco.

Prueba del Inóculo 2:

a) Densidad óptima del Inóculo 2:

DO₆₀₀/ml: 37.04

b) Viabilidad de las células del Inóculo 2 (antes de preparación de las soluciones madre de glicerol):

45 Se calculó la viabilidad de las células del Inóculo 2 en % por división de las unidades formadoras de colonia por el número de células (x100). El número de células se determina por recuento en una cámara de recuento Thoma. Las

unidades formadoras de colonia se determinaron por colocación de estrías de una dilución apropiada del Inóculo 2 en una placa de agar WMVIII suplementada con uracilo (100 mg/L).

c.) Cámara de recuento de Thoma: dilución 1:10 del Inóculo 2

1. recuento: 33; 36; 32; 37; 39

5 2. recuento: 28; 37; 41; 33; 31

$$34.7 \text{ células} \times 1.25 \times 10^6 \times 10 = 4.3 \times 10^8 \text{ células / mL inóculo 2}$$

d.) Colonias en placa:

50 µl de una dilución 10⁻⁵ veces del Inóculo 2 aplicado en una placa WMVIII, resulto en:

recuento de 142 colonias $\times 10^5 \times 20 = 2.8 \times 10^8$ colonias/mL del Inóculo 2,

10 viabilidad: $2.8 \times 10^8 \times 100 / 4.3 \times 10^8$, resultados en 65.1%

Viabilidad de las células del Inóculo 2: 65.1%

e. Pureza y fenotipo:

Tabla 4: 50 µl de Inóculo 2 (diluido a 10⁻⁵ con agua o sin diluir como se indicó) fueron colocados en estrías en placas indicadas e incubadas por 48 h a temperaturas indicadas para determinar pureza y fenotipo (auxotrofías)

| Cepa (Inóculo 2) | Placas | Temperatura de incubación | Observación |
|------------------------|--------------------------|---------------------------|--|
| AH22tH3ura8Δare1ΔareHL | YE | 30°C | colonias de levadura individuales (Inóculo 2 se diluyo a 10 ⁻⁵ antes de colocación de estría en una placa) |
| | WMVIII +Ura | 30°C | colonias de levadura individuales (Inóculo 2 se diluyo a 10 ⁻⁵ antes de colocación de estría puesto en una placa) |
| | LB | 37°C | sin crecimiento (no diluido) |
| | WMVIII (sin aminoácidos) | 30°C | sin crecimiento (no diluido) |

15

En el Inóculo 2 se evaluó también contaminaciones bacterianas bajo el microscopio. No se pudo detectar contaminación bacteriana.

3.4. Construcción de preparación del terreno de la cepa final de soluciones madre de glicerol de la cepa 1 final AH22tH3ura8Δare1Δare2HUL

20 Construcción (procedimiento técnico):

Transformación y prueba de PCR en integración correcta del casete de expresión URA3 dentro del locus HO.

Resultados de Transformación de Levadura:

La transformación fue llevada a cabo como se describe por Gietz et al. (Gietz, D., et al., 1992). La eficiencia de transformación (transformación integradora) varía entre 10²-10³ transformantes por µg de ADN.

ES 2 582 637 T3

El cultivo de muestra 1 conduce a una placa de control (AH22tH3ura8Δare1Δare2HL y sin ADN) sin crecimiento de colonia, mientras que la muestra 2 que comprende células con el casete AH22tH3ura8Δare1Δare2HL + URA 3 conduce a la formación de diferentes colonias.

- 5 Se recogieron 15 colonias y se inocularon en una placa nueva WMVIII y se incubaron por 72 h a 30°C. Se usaron transformantes positivos para la reparación de soluciones madre de glicerol (colonia 6 y 8). Las colonias grandes fueron recogidas seleccionadas en otra placa, y evaluadas a través de PCR y usadas para la preparación de soluciones madre de glicerol.

PCR:

Plantilla: colonias de Transformación de Levadura

- 10 Cepa de levadura: AH22tH3ura8Δare1Δare2HUL

Se usó PuRe Taq Ready To Go-Beads (GE Healthcare: Lot: 384777) como una polimerasa de TAQ en un volumen de 25 µl. Las perlas fueron disueltas en 23 µl de H₂O-HPLC estéril y se añadió 1 µl de cada cebador fw./ rev. (véase Tabla 6). La máquina de PCR usada fue obtenida de Flex Cycle Analytik, Jena.

Programa de PCR

- 15 1. paso:94°C 3 min
 2. paso:94°C 30 seg
 3. paso:51°C 30 seg, nueva temperatura de fusión por PCR
 4. paso:72°C 2 min A paso 2 por 40 ciclos
 5. paso:72°C 3 min
 20 6. paso:4°C

Tabla 5. Desempeño de PCR

| Muestra | Cepa | Par de cebadores de cada dirección 1 µl de 10pmol/ µl de dilución |
|---------|--|--|
| 1 | AH22tH3 ura8 Δare1Δare2HUL colonia 1 | |
| 2 | " colonia 2 | 5'HO fw. |
| 3 | " colonia 3 | 3'HO rev. |
| 4 | " colonia 4 | Integración del casete URA 3 en locus HO, el fragmento tiene 1435 pb en caso de integración correcta, si no entonces 1902 pb |
| 5 | " colonia 5 | |
| 6 | " colonia 6 | |
| 7 | " colonia 7 | |
| 8 | " colonia 8 | |
| 9 | " colonia 9 | |
| 10 | " colonia 10 | |
| 11 | " colonia 6 | 3'HO rev. |
| 12 | " colonia 7 | URA 3 Not 1 fw. |
| 13 | " colonia 8 | |
| 14 | " colonia 9 | |

ES 2 582 637 T3

| Muestra | Cepa | Par de cebadores de cada dirección 1 µl de 10pmol/ µl de dilución |
|---------|--------------|---|
| 15 | " colonia 10 | |

Se preparó gel de 1% de Agarosa:

Se cargó 1.0 g de Agarosa Seakem LE de Biozym en matraz de agitación de 250 ml + 100 mL 1 x amortiguador TAE, 6 mL de una escalera de 1 kb (NEB) (500 ng/carril) en un carril. Adicionalmente 10 µL de la muestra de cada amplificación fue mezclada con 2 µL 6 x carga de amortiguador y la mezcla fue cargada en el gel de agarosa. El gel fue ejecutado a 120 V por 45 min en 1 x amortiguador TAE. A continuación, el gel fue incubado en un baño de bromuro de etidio (EtBr) por 20 min (Solución madre de EtBr conc.: 10 mg/ mL: baño: 30 µL /300 mL 1x amortiguador TAE). Finalmente, el gel fue analizado por documentación fotográfica.

Resultados:

Se usaron adicionalmente los productos de amplificación que tienen el tamaño correcto de aproximadamente 1435 pb.

Preparación de las soluciones madre de la cepa AH22tH3ura8Δare1Δare2HUL:

La cepa AH22tH3ura8Δare1Δare2HUL fue inoculada con una colonia recogida de una placa de agar WMVIII (colonia 6, véase figura 4 y 5; placa 1; véase abajo; no igual a la placa de transformación, sin suplementación) en 20 mL de medio WMVIII (sin suplementación) en un matraz de agitación de 100 mL sin deflectores e incubada for 72 h a 30°C y 150 rpm (Inóculo 1).

La placa 1 fue generada recogiendo colonias individuales de la placa de transformación (véase figura 4), la cual fue generada por transformación de la cepa a AH22tH3ura8Δare1Δare2HL con un fragmento de ADN que comprende el casete de expresión URA3 nativa que codifica. Se usó la placa uno, no la placa de transformación, para procedimientos adicionales.

El Inóculo 2 fue inoculado con 350 µL del Inóculo 1 en 35 mL de medio WMVIII suplementado (sin suplementación) en un matraz de agitación de 100 mL sin deflectores e incubada por 48 h a 30°C y 150 rpm (Inóculo 2).

El Inóculo 2 se usó para preparar soluciones madre de glicerol de la cepa 1 final (AH22tH3ura8Δare1Δare2HUL). Las soluciones madre de glicerol fueron preparadas por mezcla de 0.5 mL del Inóculo 2 con 0.5 mL de solución de glicerol (50% (v/v) glicerol en agua). Se pudieron transportar 10 soluciones madre de glicerol en hielo seco.

Prueba del Inóculo 2:

a) Densidad óptica del Inóculo 2:

[0199] DO₆₀₀/ml: 42.68

b) Viabilidad de las células del Inóculo 2 (antes de preparación de soluciones madre de glicerol):

Se calculó la viabilidad de las células del Inóculo 2 en % por división de las unidades formadoras de colonia por el número de células (x100). El número de células se determina por recuento en una cámara de recuento Thoma. Las unidades formadoras de colonia se determinaron por colocación de estrías de una dilución apropiada del Inóculo 2 en una placa de agar WMVIII suplementada con uracilo (100 mg/L).

c.) Cámara de recuento de Thoma: dilución 1:10 dilución del Inóculo 2

1. recuento: 26; 29; 37; 30; 229

2. recuento: 39; 36; 28; 27; 33

$$31.4 \text{ células} \times 1.25 \times 10^6 \times 15 = 5.9 \times 10^8 \text{ células / mL inóculo 2}$$

d.) Colonias en placa:

50 µl de una dilución 10⁻⁵ del Inóculo 2 aplicado en una placa de WMVIII

contadas: 280 colonias x 10⁵ x 20 = 5.6 x 10⁸ colonias/mL del Inóculo 2

viabilidad: $5.6 \times 10^8 \times 100 / 5.9 \times 10^8$. Esto conduce a 94.9%.

Viabilidad de las células del Inóculo 2: 94.9%

e) Pureza y Fenotipo:

5 Tabla 6: 50 µl de Inóculo 2 (diluido a 10^{-5} con agua o sin diluir como se indicó) fueron colocados en estrías en placas indicadas e incubadas por 48 h a temperaturas indicadas para determinar pureza y fenotipo (auxotrofías)

| Cepa (Inóculo 2) | Placas | Temperatura de incubación | Observación |
|--------------------------|-------------------------|---------------------------|--|
| AH22tH3ura8Δare1Δare2HUL | YE | 30°C | colonias de levadura individuales (Inóculo 2 se diluyo 10^{-5} antes de colocación de estría en una placa) |
| | LB | 37°C | sin crecimiento (no diluido) |
| | WMVIII (no aminoácidos) | 30°C | colonias de levadura individuales (Inóculo 2 se diluyo 10^{-5} antes de colocación de estría en una placa) |

En el Inóculo 2 se evaluó también contaminaciones bacterianas bajo el microscopio. No se pudo detectar contaminación bacteriana.

3.5 Conclusiones

10 Los fragmentos integrados (casete de expresión LEU2 y URA3) fueron evaluados a través de PCR en el lado correcto y en la integración correcta en el correspondiente loci objetivo (LEU2 y HO). Los resultados de PCR mostraron tamaños correctos e integración correcta de fragmentos.

15 Los resultados de secuenciación de los fragmentos integrados (casete de expresión LEU2 y URA3) amplificados desde el locus de integración (LEU2 y HO) del ADN genómico de la cepa final AH22tH3ura8Δare1Δare2HUL, mostraron que las secuencias son correctas (estos corresponden a las secuencias de S288c, que están depositadas en <http://www.yeastgenome.org>). Ocurrió la reversión de mutación de his4-519, en la medida que esta secuencia fue evaluada también como se describe anteriormente en la cepa final AH22tH3ura8Δare1Δare2HUL. La cepa final AH22tH3ura8Δare1Δare2HUL exhibe el fenotipo correcto (prototrófica), se completó satisfactoriamente la construcción de la cepa prototrófica final AH22tH3ura8Δare1Δare2HUL.

20 Esta cepa fue construida satisfactoriamente usando genes no heterólogos, que entonces simplifica la ejecución industrial, en comparación con el caso cuando se usan cepas que llevan genes heterólogos.

Ejemplo 4

Evaluación de crecimiento y productividad de escualeno de la cepa de levadura prototrófica AH22tH3ura8Δare1Δare2HUL en comparación con la cepa de levadura auxotrófica AH22tH3ura8Δare1Δare2

25 Se evaluaron dentro del siguiente experimento el desempeño del crecimiento y la productividad de escualeno de la cepa prototrófica en comparación con la cepa auxotrófica.

30 Adicionalmente se evaluó la estabilidad de las dos cepas con referencia al desempeño del crecimiento y productividad del escualeno en un ciclo de producción. Para ello se prepararon soluciones madre de glicerol (después de las soluciones madre) de cultivos (inoculado con las soluciones madre de glicerol iniciales: soluciones madre anteriores), que fueron mantenidas en por lo menos 30 generaciones. Las 30 generaciones representan un ciclo de producción (cultivo en fermentador a escala industrial). Después de cultivar por 30 generaciones, las muestras fueron probadas nuevamente (soluciones madre posteriores). Es una característica preferida la estabilidad que hace referencia al crecimiento y productividad durante el cultivo en por lo menos 30 generaciones que debería exhibir una cepa para producción industrial. Para la evaluación de la estabilidad, se evaluaron en paralelo de cultivos inoculados con cultivos madre anteriores y posteriores.

35 Determinación de CDW (Peso de Células Secas):

Se cosechó 3 x 6 mL de caldo de cultivo en tubos falcon de 15 mL pesados (triplicados) y en forma de pellas a través de centrifugación a 4000 rpm, 5 min. Se descartó el sobrenadante y la pella fue usada para análisis adicional. Se lavaron las pella 2 veces con 5 mL de agua. Las pellas lavadas se secaron a 80 °C por 24 h y se enfriaron en un desecador antes de ser pesadas.

5 Extracción y determinación cuantitativa de escualeno a través de análisis de GC-MS:

Extracción:

Se transfirieron 250 µl de caldo de cultivo a un tubo Eppendorf. El caldo se sometió a vórtice (agitación) por algunos segundos a máxima velocidad (Vortex-Genie 2, Scientific Industries). Se añadieron 250 µl de perlas de vidrio (diámetro que varía desde 450 µm hasta 500 µm, Sartorius BBI-8541701). A continuación, se añadieron 400 µl de cloroformo:metanol (80:20; v:v). La solución se sometió a vórtice por 5 minutos a máxima velocidad (Vortex-Genie 2, Scientific Industries) antes de la centrifugación por 5 min a 13,200 rpm (centrífuga laboratorio Hettich Mikro 200 R). Se secaron bajo flujo de nitrógeno 50 µl de la fase orgánica inferior y se disolvieron los residuos en 1.5 ml de acetonitrilo. Se transfirió 1 ml de la solución de acetonitrilo a un vial GC y se inyectó.

Preparación de estándares externos para cuantificación:

15 Se colocaron 10 mg de escualeno (Sigma, S3626, pureza mínima de 98%) dentro de un tubo Greiner de 15 ml. Se añadieron 10 ml de acetonitrilo (solución madre de escualeno, 1 mg/ml) y se prepararon diferentes concentraciones como se describe abajo:

1. 5 µg/mL de escualeno: se transfieren por pipeta 5 µL de solución madre de escualeno a 995 µL acetonitrilo
2. 10 µg/mL de escualeno: se transfieren por pipeta 10 µL de solución madre de escualeno a 990 µL acetonitrilo
- 20 3. 20 µg/mL de escualeno: se transfieren por pipeta 20 µL de solución madre de escualeno a 980 µL acetonitrilo
4. 40 µg/mL de escualeno: se transfieren por pipeta 40 µL de solución madre de escualeno a 960 µL acetonitrilo
3. 80 µg/mL de escualeno: se transfieren por pipeta 80 µL de solución madre de escualeno a 920 µL acetonitrilo

Análisis de GC-MS:

25 Se ejecutó el análisis de GC-MS en un sistema Agilent 6890N GC acoplado a un detector selectivo de masa cuadrupolo Agilent 5975B VL MSD. La columna usada para análisis fue una Agilent HP-5MS. Se operó el MS a modo de barrido (iniciar después de 4 min, intervalo de masa de 29 a 500 u.m.a a 3,1 barridos/s). La temperatura fue sostenida inicialmente a 70 °C por 0.5 min y después fue elevada a 120 °C con un gradiente de 20 °C /min seguido por un incremento a 325 °C con un gradiente de 10 °C/min, que fue sostenido por 20 min. El flujo a través de la columna se mantuvo constante a 1 ml He/min. El volumen de inyección fue 1 µl (modo de no división). La temperatura de entrada y la temperatura en la interfaz fue 280 °C.

30 4.1 Generación de soluciones madre de glicerol posteriores desde soluciones madre de glicerol anteriores después de cultivo por lo menos por 30 generaciones:

a.) Procedimiento de cultivo

Tabla 7: Cepas usadas por generación de soluciones madre posteriores

| No. | Cepa | Fenotipo | Suplementos |
|-----|--------------------------|----------------------------|-------------|
| 1 | AH22tH3ura8Δare1Δare2HUL | prototrófica | --- |
| 4 | AH22tH3ura8Δare1Δare2 | auxotrófica, (his ura leu) | His;Ura;Leu |

35 El Inóculo 1 fue inoculado desde las soluciones madre de glicerol (100 µl) en 20 mL de medio WMVIII en un matraz de agitación de 100 mL sin deflectores e incubado por 48 h a 30°C y 150 rpm (suplementación de aminoácido listada en la Tabla 7).

40 El Inóculo 2 fue inoculado desde el Inóculo 1 (1%) en 20 mL de medio WMVIII en un matraz de agitación de 100 mL sin deflectores e incubado por 48 h a 30°C y 150 rpm (suplementación de aminoácido listada en la Tabla 7).

El Inóculo 3 fue inoculado desde el Inóculo 2 (1%) en 50 mL de medio WMVII en 250 mL de un matraz de agitación con deflectores e incubada por 48 h a 30°C y 150 rpm (suplementación de aminoácido listada en la Tabla 7).

El Inóculo 4 fue inoculado desde el Inóculo 3 (1%) en 50 mL de medio WMVIII en 250 mL de un matraz de agitación con deflectores e incubada por 48 h a 30°C y 150 rpm (suplementación de aminoácido listada en la Tabla 7).

El Inóculo 5 fue inoculado desde el Inóculo 4 (1%) en 50 mL de medio WMVIII en 250 mL de un matraz de agitación con deflectores e incubada por 48 h a 30°C y 150 rpm (suplementación de aminoácido listada en la Tabla 7).

5 El Inóculo 6 fue inoculado desde el Inóculo 5 (1%) en 50 mL de medio WMVIII en 250 mL de un matraz de agitación con deflectores e incubada por 48 h a 30°C y 150 rpm (suplementación de aminoácido listada en la Tabla 7).

b.) recuento de células para determinar el número de generaciones:

Tabla 8: Número de células por mL de cultivo (Inóculo 1-6) a 0 horas (t=0 h; después de inoculación) y 48 horas (t=48 h) de cultivo

| Número de cepa | 1 | 2 | 3 | 4 |
|---------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| Inóculo 1, t = 48 h | 3.68 x 10 ⁸ | 3.78 x 10 ⁸ | 3.50 x 10 ⁸ | 4.89 x 10 ⁸ |
| Inóculo 2, t = 0 h | 6.38 x 10 ⁶ | 6.38 x 10 ⁶ | 6.50 x 10 ⁶ | 7.63 x 10 ⁶ |
| Inóculo 2, t = 48 h | 3.4.6 x 10 ⁸ | 3.58 x 10 ⁸ | 3.86 x 10 ⁸ | 3.66 x 10 ⁸ |
| Inóculo 3, t = 0 h | 8.13 x 10 ⁶ | 9.00 x 10 ⁶ | 9.75 x 10 ⁶ | 10.38 x 10 ⁶ |
| Inóculo 3, t = 48 h | 3.39 x 10 ⁸ | 3.41 x 10 ⁸ | 3.44 x 10 ⁸ | 5.15 x 10 ⁸ |
| Inóculo 4, t = 48 h | 3.03 x 10 ⁸ | 3.04 x 10 ⁸ | 2.99 x 10 ⁸ | 3.87 x 10 ⁸ |
| Inóculo 5, t = 48 h | 3.09 x 10 ⁶ | 3.46 x 10 ⁸ | 3.79 x 10 ⁸ | 4.15 x 10 ⁸ |
| Inóculo 6, t = 48 h | 5.61 x 10 ⁸ | 5.39 x 10 ⁸ | 5.74 x 10 ⁸ | 6.73 x 10 ⁸ |

10

Número total de generaciones:

Inóculos 1 a 5: aproximadamente 5.5 generaciones

Inóculo 6: aproximadamente 6.0 generaciones

Suma: aproximadamente 33.5 generaciones

15 c.) Preparación de soluciones madre de glicerol después de la producción:

Se prepararon las soluciones madre de glicerol después de la producción por mezcla de 0.5 mL del Inóculo 6 después de 48 horas de cultivo (de cepas listadas en la Tabla 7) con 0.5 mL de solución de glicerol (50% (v/v) glicerol en agua).

Tabla 9: Denotación de soluciones madre de glicerol después de la producción

| No. | Cepa (soluciones madre posteriores a la producción) | Fenotipo | Suplementos |
|-----|---|--------------|-------------|
| 1 | AH22tH3ura8Δare1Δ are2 posterior | auxotrófica | His;Ura;Leu |
| 2 | AH22tH3ura8Δare1Δ are2HUL posterior | prototrófica | --- |

20

Se almacenaron las soluciones madre de glicerol después de la producción por lo menos por 24 horas a -80°C antes del cultivo para el análisis de estabilidad.

4.2. Análisis (producción anterior y posterior) de estabilidad de la cepa

a.) Procedimiento de cultivo

25 –El Inóculo 1 fue inoculado desde la solución madre de glicerol (100 µl) listadas en las tablas 7 y 3 (producción anterior y posterior de células de 2 cepas = 4 soluciones madre) en 20 mL de medio WMVIII en un matraz de agitación de 100 mL sin deflectores e incubado por 48 h a 30°C y 150 rpm (suplementación de aminoácido listada en la Tabla 7).

–El Inóculo 2 fue inoculado desde el Inóculo 1 (1%) en 50 mL de medio WMVII en un matraz de agitación de 250 mL con deflectores e incubado por 72 h a 30°C y 150 rpm (suplementación de aminoácido listada en la Tabla 7).

Tabla 10: Cepas usadas para crecimiento y análisis de productividad de escualeno

| No. | Cepa | |
|-----|------------------------------------|--|
| 1 | AH22tH3ura8Δare1Δare2 anterior | (cepa auxotrófica; solución madre anterior) |
| 2 | AH22tH3ura8Δare1Δare2 posterior | (cepa auxotrófica; solución madre posterior) |
| 3 | AH22tH3ura8Δare1Δare2HUL anterior | (cepa prototrófica ; solución madre anterior) |
| 4 | AH22tH3ura8Δare1Δare2HUL posterior | (cepa prototrófica ; solución madre posterior) |

5 b.) Resultados

Después de 72 horas las células (Inóculo 2) se cosecharon y evaluaron haciendo referencia al crecimiento y productividad. Para este propósito, fue determinado el peso de células secas (CDW):

10 Se cosechó 3 x 6 mL de caldo de cultivo en tubos falcon de 15 mL pesados (triplicados) y en forma de pellas a través de centrifugación a 4000 rpm, 5 min. Se descartó el sobrenadante y la pella fue usada para análisis adicional. Se lavaron la pellas 2 veces con 5 mL de agua. Las pellas lavadas se secaron a 80 °C por 24 h y se enfriaron en un desecador antes de ser pesadas.

La determinación de peso de células secas (CDW) se llevó a cabo en triplicados y extracción, y la extracción y análisis de escualeno fue llevada a cabo en triplicados.

15 La medición de la densidad óptica a 600 nm (DO_{600nm}) de las cepas ilustradas en la Tabla 10 muestra que la cepa AH22tH3ura8Δare1Δare2HUL prototrófica fue más estable que la cepa AH22tH3ura8Δare1Δare2 auxotrófica. Después de 72 h, se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 11: Crecimiento de las cepas después de la incubación

| No. | Cepa | Densidad óptica a 600 nm (DO_{600nm}) / mL |
|-----|------------------------------------|--|
| 1 | AH22tH3ura8Δare1Δare2 anterior | 58 |
| 2 | AH22tH3ura8Δare1Δare2 posterior | 51 |
| 3 | AH22tH3ura8Δare1Δare2HUL anterior | 58 |
| 4 | AH22tH3ura8Δare1Δare2HUL posterior | 59 |

20 La medición de peso de células secas (CDW) de las cepas listadas en la Tabla 10 muestra que la cepa AH22tH3ura8Δare1Δare2HUL prototrófica fue más estable que la cepa AH22tH3ura8Δare1Δare2 auxotrófica. Después de 72 h, se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 12: Peso de células secas (CDW) después de la incubación

| No. | Cepa | Peso de célula seca [g/L] |
|-----|---------------------------------|---------------------------|
| 1 | AH22tH3ura8Δare1Δare2 anterior | 12.4 |
| 2 | AH22tH3ura8Δare1Δare2 posterior | 10.2 |

| No. | Cepa | Peso de célula seca [g/L] |
|-----|------------------------------------|---------------------------|
| 3 | AH22tH3ura8Δare1Δare2HUL anterior | 13.0 |
| 4 | AH22tH3ura8Δare1Δare2HUL posterior | 13.1 |

5 La medición de la productividad de escualeno de las cepas listadas en la Tabla 10 muestra que la cepa AH22tH3ura8Δare1Δare2HUL prototrófica fue más estable que la cepa AH22tH3ura8Δare1Δare2 auxotrófica y produce cantidades mayores de escualeno. Después de 72 h, se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 13: Peso de células secas (CDW) después de la incubación

| No. | Cepa | Escualeno [g/L de caldo de cultivo] | Escualeno [% por peso de célula seca] |
|-----|------------------------------------|-------------------------------------|--|
| 1 | AH22tH3ura8Δare1Δare2 anterior | 0.68 | 5.48 |
| 2 | AH22tH3ura8Δare1Δare2 posterior | 0.49 | 4.81 |
| 3 | AH22tH3ura8Δare1Δare2HUL anterior | 0.90 | 6.97 |
| 4 | AH22tH3ura8Δare1Δare2HUL posterior | 0.88 | 6.84 |

4.3 Conclusiones

10 [0227] La cepa AH22tH3ura8Δare1Δare2HUL prototrófica produjo más escualeno en comparación con la cepa AH22tH3ura8Δare1Δare2 auxotrófica con referencia al rendimiento volumétrico, específico y total. Adicionalmente, el peso de células secas de la cepa prototrófica al final del cultivo, fue más alto comparado con la cepa auxotrófica. En contraste con la cepa auxotrófica, la cepa prototrófica fue estable con referencia al desempeño de crecimiento y productividad de escualeno en por lo menos 33 generaciones.

Ejemplo 5

15 Evaluación de AH22tH3ura8Δare1Δare2HUL

5.1. Fermentación de escala de laboratorio de AH22tH3ura8Δare1Δare2HUL

Cepa: *Saccharomyces cerevisiae* AH22tH3ura8Δare1Δare2HUL

Medio: medio básico WMVIII esterilizado (20 min/121°C) suplementada con filtrado esteril (0.22 μm) de elementos de traza y vitaminas

20 Precultivo:

Inóculo 1: 20 mL de medio WMVIII (matraz de Erlenmeyer de 100 mL con deflectores) inoculado con 20 μL de solución madre de glicerol de la cepa AH22tH3ura8Δare1Δare2HUL. Incubación: 48 h / 30°C /150 rpm

Inóculo 2: 150 mL de medio WMVIII (matraz de Erlenmeyer de 500 mL con deflectores) inoculado con 1.5 mL (1%) de Inóculo 1. Incubación: 48 h / 30°C /150 rpm

25 Cultivo principal:

3 L de medio WMVIII (fermentador Applikon de 5 L) inoculado con 100 mL (3.33%) de Inóculo 2 e incubado por 72 h a 30°C y 250-585 rpm. No hubo control de pH. Se aplicaron a la incubadora 10 L/h de aire comprimido.

Agitación: controlada por pO₂ (si el valor de pO₂ fue menos de 25%, la agitación fue incrementada satisfactoriamente hasta el máximo de 700 rpm).

Fermentación

Las células de AH22tH3ura8Δare1Δare2HUL se fermentaron en la semana 39 del calendario (2010).

parámetros registrados: pH y pO₂ al inicio de la incubación

inicio: 0 h

5 pH: 5.24

pO₂: 99%

rata de agitación: 250 rpm

ventilación: 10 L/h de aire comprimido

10 Se analizaron durante la incubación de muestras para análisis químico y medición de densidad óptica. Los tiempos de muestreo fueron después de 0 h, 11 h, 15 h, 19 h, 22 h, 37 h, 40 h, 44 h, 62 h, 66 h, 1 y 72 h.

parámetros registrados: pH y pO₂ al final de la incubación

final: 72 h

pH: 5.26

pO₂: 59%

15 rata de agitación: 250 rpm

ventilación: 10 L/h de aire comprimido

Resultados

20 Los resultados son dibujados en la figura 7. La cinética de crecimiento fue extensivamente lineal por más de 60 h de incubación. La productividad de escualeno del cultivo aumentó hasta 60 h. La productividad de escualeno fue 1.07 g L⁻¹ (título) respectivamente 7.8% (escualeno por CDW) después de 72 horas del tiempo de fermentación.

Listado de secuencias

<110> Organobalance GmbH

25 <120> Una Célula de Levadura Para la Producción de Terpenos y Usos de los Mismos

<130> S67598PCEP

<150> EP 11001629.2

<151> 2011-02-28

30 <160> 7

<170> version 3.5 de PatentIn

<210> 1

<211> 1578

<212> ADN

35 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> reductasa HMG CoA truncada

<400> 1

ES 2 582 637 T3

atggaccaat tggtgaaaac tgaagtcacc aagaagtctt ttactgctcc tgtacaaaag 60
gcttctacac cagttttaac caataaaaca gtcatttctg gatcgaaagt caaaagtta 120
tcatctgogc aatcgagctc atcaggacct tcatcatcta gtgaggaaga tgattccogc 180
gatattgaaa gcttggataa gaaaatacgt cctttagaag aattagaagc attattaagt 240
agtggaaata caaaacaatt gaagaacaaa gaggtcogctg ccttggttat tcacggtaag 300
ttacctttgt acgctttgga gaaaaaatta ggtgatacta cgagagcggg tgcggtagct 360
aggaaggctc tttcaatfff ggcagaagct cctgtattag catctgatcg tttaccatat 420
aaaaattatg actacgaccg cgtatftggc gcttgttgtg aaaatgttat aggttacatg 480
cctttgcccg ttggtgttat aggccccttg gttatcgatg gtacatctta tcatatacca 540
atggcaacta cagaggggtg tttggtagct tctgccatgc gtggctgtaa ggcaatcaat 600
gctggcgggtg gtgcaacaac tgttttaact aaggatggta tgacaagagg cccagtagtc 660
cgtttcccaa ctttgaaaag atctggtgcc tgtaaagatat ggtagactc agaagagggg 720
caaaacgcaa ttaaaaaagc ttttaactct acatcaagat ttgcacgtct gcaacatatt 780
caaacttgtc tagcaggaga tttactcttc atgagattta gaacaactac tggtagcgc 840
atgggtatga atatgatftc taaagggtgc gaatactcat taaagcaat ggtagaagag 900
tatggctggg aagatatgga ggttgtctcc gtttctggta actactgtac cgacaaaaaa 960
ccagctgcca tcaactggat cgaaggctgt ggtaagagtg tcgtcgcaga agctactatt 1020
cctggtgatg ttgtcagaaa agtgftaaaa agtgatgftt ccgcattggg tgagttgaac 1080
attgctaaga atftggttgg atctgcaatg gctgggtctg ttggtggatt taacgcacat 1140
gcagctaatt tagtgacagc tgtfttcttg gcattaggac aagatcctgc acaaaatgtt 1200
gaaagttcca actgtataac attgatgaaa gaagtggacg gtgatttgag aatttccgta 1260
tccatgccat ccatcgaagt aggtaccatc ggtgggtgta ctgftctaga accacaaggt 1320
gccatgfttg acttattagg tftaagaggc ccgcattgta ccgctcctgg taccaacgca 1380
cgtcaattag caagaatagt tgcctgtgcc gtcttggcag gtgaattatc cttatgtgct 1440
gccctagcag ccggccattt ggttcaaagt catatgacc ccaacaggaa acctgctgaa 1500
ccaacaaaac ctaacaatft ggacgccact gatataaatc gtttgaaaga tgggtccgctc 1560
acctgcatta aatcctaa 1578

<210> 2

<211> 1635

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 582 637 T3

<223> basado en el vector pUC19

<400> 2

| | |
|--|------|
| actatggacc aattggtgaa aactgaagtc accaagaagt cttttactgc tcctgtacaa | 60 |
| aaggcttcta caccagtttt aaccaataaa acagtcattt ctggatcgaa agtcaaaaagt | 120 |
| ttatcatctg cgcaatcgag ctcatcagga ccttcatcat ctagtgagga agatgattcc | 180 |
| cgcgatattg aaagcttggg taagaaaata cgtcctttag aagaattaga agcattatta | 240 |
| agtagtgga atacaaaaca attgaagaac aaagaggtcg ctgccttggg tattcacggt | 300 |
| aagttacctt tgtacgcttt ggagaaaaaa ttaggtgata ctacgagagc ggttgccgta | 360 |
| cgtaggaagg ctctttcaat tttggcagaa gctcctgtat tagcatctga tcgtttacca | 420 |
| tataaaaatt atgactacga ccgcttattt ggcgcttggt gtgaaaatgt tataggttac | 480 |
| atgcctttgc ccgcttggtg tataggcccc ttggttatcg atggtacatc ttatcatata | 540 |
| ccaatggcaa ctacagaggg ttgtttggtg gcttctgcca tgcgtggctg taaggcaatc | 600 |
| aatgctggcg gtggtgcaac aactgtttta actaaggatg gtatgacaag aggcccagta | 660 |
| gtccgtttcc caactttgaa aagatctggt gcctgtaaga tatggttaga ctcagaagag | 720 |
| ggacaaaacg caattaaana agcttttaac tctacatcaa gatttgcacg tctgcaacat | 780 |
| attcaaactt gtctagcagg agatttactc ttcattgagat ttagaacaac tactggtgac | 840 |
| gcaatgggta tgaatatgat ttctaaaggt gtcgaatact cattaaagca aatggtagaa | 900 |
| gagtatggct ggggaagatat ggaggttgtc tccgtttctg gtaactactg taccgacaaa | 960 |
| aaaccagctg ccatcaactg gatcgaaggt cgtggtaaga gtgtcgtcgc agaagctact | 1020 |
| attcctgggt atggtgtcag aaaagtgtta aaaagtgatg tttccgcatt gggttgagttg | 1080 |
| aacattgcta agaatttggt tggatctgca atggctgggt ctggttggtgg atttaacgca | 1140 |

ES 2 582 637 T3

actatggacc aattggtgaa aactgaagtc accaagaagt cttttactgc tcctgtacaa 60
aaggettcta caccagtttt aaccaataaa acagtcattt ctggatcgaa agtcaaaagt 120
ttatcatctg cgcaatcgag ctcatcagga ccttcatcat ctagtgagga agatgattcc 180
cgcgatattg aaagcttggg taagaaaata cgtccttttag aagaattaga agcattatta 240
agtagtgga atacaaaaca attgaagaac aaagaggtcg ctgccttggg tattcacggt 300
aagttacctt tgtacgcttt ggagaaaaaa ttaggtgata ctacgagagc ggttgcggta 360
cgtaggaagg ctctttcaat tttggcagaa gctcctgtat tagcatctga tcgtttacca 420
tataaaaatt atgactacga ccgcgtattht ggcgcttggg gtgaaaatgt tataggttac 480
atgcctttgc ccgcttgggtg tataggcccc ttggttatcg atggtacatc ttatcatata 540
ccaatggcaa ctacagaggg ttgtttggtg gcttctgccg tgcgtggctg taaggcaatc 600
aatgctggcg gtggtgcaac aactgtttta actaaggatg gtatgacaag aggccagta 660
gtccgtttcc caactttgaa aagatctggt gcctgtaaga tatggttaga ctcagaagag 720
ggacaaaacg caattaaaaa agcttttaac tctacatcaa gatttgcacg tctgcaacat 780
attcaaactt gtctagcagg agatttactc ttcatgagat ttagaacaac tactggtgac 840
gcaatgggta tgaatatgat ttctaaagggt gtcgaatact cattaagca aatggtagaa 900
gagtatggct gggaagatat ggaggttgtc tccgtttctg gtaactactg taccgacaaa 960
aaaccagctg ccatcaactg gatcgaaggt cgtggttaaga gtgtcgtcgc agaagctact 1020
attcctgggtg atgttgtcag aaaagtgtta aaaagtgatg tttccgcatt ggttgagttg 1080
aacattgcta agaatttggg tggatctgca atggctgggt ctggttgggtg atttaacgca 1140

<210> 3

<211> 4820

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> casete de expresión integrado dentro del locus URA3

<400> 3

ES 2 582 637 T3

| | |
|--|------|
| atgtcgaaag ctacatataa ggaacgtgct gctactcatc ctagtcctgt tgctgccaaag | 60 |
| ctatttaata tcatgcacga aaagcaaaca aacttggtg cttcattgga tgttcgtacc | 120 |
| accaaggaat tactggagtt agttgaagca ttaggtccca aaatttgttt actaaaaaca | 180 |
| catgtggata tcttgactga tttttccatg gagggcacag ttaagccgct aaaggcatta | 240 |
| tccgccaagt acaatttttt actcttcgaa gacagaaaat ttgctgacat tggtaataca | 300 |
| gtcaaattgc agtactctgc ggggtgtatac agaatagcag aatgggcaga cattacgaat | 360 |
| gcacacggtg tgggtggccc aggtattggt agcggtttga agcaggcggc agaagaagta | 420 |
| acaaggaac ctagaggcga acgccagcaa gacgtagccc agcgcgtcgg ccgccatgcc | 480 |
| ggcgataatg gcctgcttct cgccgaaacg tttggtggcg ggaccagtga cgaaggcttg | 540 |
| agcgagggcg tgcaagattc cgaataccgc aagcgacagg ccgatcatcg tcgcgctcca | 600 |
| gcgaaagcgg tcctcgccga aatgacca gagcgtgcc ggcacctgtc ctacgagttg | 660 |
| catgataaag aagacagtca taagtgcggc gacgatagtc atgccccgcg cccaccggaa | 720 |
| ggagctgact gggttgaagg ctctcaaggg catcggtcga cgctctccct tatgcgactc | 780 |
| ctgcattagg aagcagccca gtagtagggt gaggccgttg agcaccgccg ccgcaaggaa | 840 |
| tggtgccaac gccagcaaga cgtagcccag cgcgtcggcc gccatgccgg cgataatggc | 900 |
| ctgcttctcg ccgaaacggt tgggtggcggg accagtgacg aaggcttgag cgagggcgtg | 960 |
| caagattccg aataccgcaa gcgacaggcc gatcatcgtc gcgctccagc gaaagcggtc | 1020 |

ES 2 582 637 T3

ctcgccgaaa atgacccaga gcgctgccgg cacctgtcct acgagttgca tgataaagaa 1080
 gacagtcata agtgccggcga cgatagtcac gccccgcgcc caccggaagg agctgactgg 1140
 gttgaaggct ctcaagggca tcggtcgacg ctctccotta tgcgactcct gcattaggaa 1200
 gcagcccagt agtaggttga ggccggtgag caccgcccgc gcaaggaatg gtgcatgcaa 1260
 ggagatggcg cccaacagtc ccccggccac ggggcctgcc accataccca cgccgaaaca 1320
 agcgtcatg agcccgaagt ggcgagcccg atcttcccca tcggtgatgt cggcgatata 1380
 ggcgccagca accgcacctg tggcgccggg gatgcgggcc acgatgcgtc cggcgtagag 1440
 gatcttttat gcttgctttt caaaaggcct gcaggcaagt gcacaaaca tacttaata 1500
 aatactactc agtaataacc tatttcttag catttttgac gaaatttgct attttgttag 1560
 agtcttttac accatttgtc tccacacctc cgcttacatc aacaccaata acgccattta 1620
 atctaagcgc atcaccaaca ttttctggcg tcagtccacc agctaacata aatgtaagc 1680
 ttgcatgcct gcaggtcgac tctagaggat cccagtcac atggtgctgt tgtgcttctt 1740
 tttcaagaga ataccaatga cgtatgacta agtttaggat ttaatgcagg tgacggaccc 1800
 atctttcaaa cgatttatat cagtggcgtc caaattgta ggttttggtt gttcagcagg 1860
 tttcctggtg tgggtcatat gactttgaac caaatggccg gctgctaggg cagcacataa 1920
 ggataattca cctgccaaaga cggcacaggc aactattctt gctaattgac gtgcgttggt 1980
 accaggagcg gtagcatgtg ggcctcttac acctaataag tccaacatgg caccttgtgg 2040
 ttctagaaca gtaccaccac cgatggtacc tacttcgatg gatggcatgg atacggaaat 2100
 tctcaaatca cgtccactt cttccatcaa tgttatacag ttggaacttt caacattttg 2160
 tgcaggatct tgtcctaag ccaagaaaac agctgtcact aaattagctg catgtgcggt 2220
 aatccacca acagaccag ccattgcaga tccaacaaa ttcttagcaa tgttcaactc 2280
 aaccaatgcg gaaacatcac tttttaacac ttttctgaca acatcaccag gaatagtagc 2340
 ttctgcgacg aactcttac cacgacctc gatccagttg atggcagctg gttttttgtc 2400
 ggtacagtag ttaccagaaa cggagacaac ctccatatct tcccagccat actcttctac 2460
 catttgcttt aatgagtatt cgacacctt agaaatcata ttcataccca ttgcgtcacc 2520
 agtagttggt ctaaactca tgaagagtaa atctcctgct agacaagttt gaatatggtg 2580
 cagacgtgca aatcttgatg tagagttaa agctttttta attgcgtttt gtcctcttc 2640
 tgagtctaac catatcttac aggcaccaga tcttttcaaa gttgggaaac ggactactgg 2700
 gcctcttgtc ataccatcct tagttaaacc agttggtgca ccaccgccag cattgattgc 2760
 cttacagcca cgcatggcag aagctaccaa acaaccctct gtagttgcca ttggtatatg 2820
 ataagatgta ccatcgataa ccaaggggccc tataacacca acgggcaaag gcatgtaacc 2880
 tataacattt tcacaacaag cgccaaatac gcggtcgtag tcataatttt tatatggtaa 2940

ES 2 582 637 T3

acgatcagat gctaatacag gagcttctgc caaaattgaa agagccttcc tacgtaccgc 3000
 aaccgctctc gtagtatcac ctaatttttt ctccaaagcg tacaaaggta acttaccgtg 3060
 aataaccaag gcagcgacct ctttgttott caattgtttt gtatttccac tacttaataa 3120
 tgcttctaata tcttctaaag gacgtatttt cttatccaag ctttcaatat cgcgggaatc 3180
 atcttcctca ctagatgatg aaggtcctga tgagctcgat tgcgcagatg ataaactttt 3240
 gactttcgat ccagaaatga ctgttttatt ggttaaaact ggtgtagaag ccttttgtac 3300
 aggagcagta aaagacttct tgggtgacttc agttttcacc atttgggtcca tagtgggtac 3360
 cgagctcgaa ttccttgatt gtatgcttgg tatagcttga aatattgtgc agaaaaagaa 3420
 acaaggaaga aagggaacga gaacaatgac gaggaacaa aagattaata attgcaggtc 3480
 tatttatact tgatagcaag acagcaaact tttttttatt tcaaattcaa gtaactggaa 3540
 ggaaggccgt ataccgttgc tcattaaaga gtagtgtgcy tgaatgaagg aaggaaaaag 3600
 tttcgtgtgc ttcgagatac ccctcatcag ctctggaaca acgacatctg ttggtgctgt 3660
 ctttgtcgtt aattttttcc tttagtgtct tccatcattt ttttgtcatt gcggatatgg 3720
 tgagacaaca acgggggaga gagaaaagaa aaaaaaagaa aagaagttgc atgcgcctat 3780
 tattacttca atagatggca aatggaaaaa gggtagtgaa acttcgatat gatgatggct 3840
 atcaagtcta gggctacagt attagtctgt tatgtaccac catcaatgag gcagtgtaat 3900
 tgggtgtagtc ttgttttagcc cattatgtct tgtctggtat ctgttctatt gtatatctcc 3960
 cctccgccac ctacatgtta gggagaccaa cgaaggtatt ataggaatcc cgatgtatgg 4020
 gtttggttgc cagaaaagag gaagtcata ttgtacacc ggaaacaaca aaaggatcaa 4080
 ggagatggcg cccaacagtc cccccggcca cggggcctgc caccataccc acgccgaaac 4140
 aagcgtcat gagcccgaag tggcgagccc gatcttcccc atcgggtgatg tcggcgatat 4200
 aggcgccagc aaccgcacct gtggcgccgg tgatgccggc cacgatgcgt ccggcgtaga 4260
 ggatccacag gacgggtgtg gtcgccatga tcgcgtagtc gatagtggct ccaagtagcg 4320
 aagcgagcag gactgggcyg cggccaaagc ggtcggacag tgctccgaga acgggtgcgc 4380
 atagaaattg catcaacgca tatagcgcta gcagcacgcc atagtactg gcgatgctgt 4440
 cggaatggac gatccttttg atgttagcag aattgtcatg caagggctcc ctatctactg 4500
 gagaatatac taagggtact gttgacattg cgaagagcga caaagatttt gttattggct 4560
 ttattgctca aagagacatg ggtggaagag atgaaggtta cgattggttg attatgacac 4620
 ccggtgtggg tttagatgac aagggagacg cattgggtca acagtataga accgtggatg 4680
 atgtggtctc tacaggatct gacattatta ttgttggag aggactattt gcaaagggaa 4740
 gggatgctaa ggtagagggg gaacgttaca gaaaagcagc ctgggaagca tatttgagaa 4800

gatgcgcca gcaaaactaa

4820

<210> 4

<211> 1694

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> casete integrador usado para la eliminación del gen ARE1

<400> 4

ES 2 582 637 T3

atgacggaga ctaaggattt gttgcaagac gaagagtffc ccagctgaag cttcgtacgc 60
 tgcaggatoga caaccctaa tataacttcg tataatgtat gctatacгаа gttattaggt 120
 ctagagatct gtttagcttg cctcgtcccc gccgggtcac ccggccagcg acatggaggc 180
 ccagaatacc ctccttgaca gtcttgacgt gcgcagctca ggggcatgat gtgactgtcg 240
 cccgtacatt tagcccatac atccccatgt ataatcattt gcattccatac attttgatgg 300
 ccgcacggcg cgaagcaaaa attacggctc ctcgctgcag acctgcgagc agggaaacgc 360
 tcccctcaca gacgcgttga attgtcccca cgccgcgcc ctgtagagaa atataaaagg 420
 ttaggatttg cactgaggt tcttctttca tataacttct tttaaaatct tgctaggata 480
 cagttctcac atcacatccg aacataaaca accatgggta aggaaaagac tcacgtttcg 540
 aggccgcgat taaattcaa catggatgct gatttatatg ggtataaatg ggctcgcgat 600
 aatgtcgggc aatcaggtgc gacaatctat cgattgtatg ggaagcccga tgcgccagag 660
 ttgtttctga aacatggcaa aggtagcgtt gccaatgatg ttacagatga gatggtcaga 720
 ctaaactggc tgacggaatt tatgcctctt ccgaccatca agcattttat ccgtactcct 780
 gatgatgcat ggttactcac cactgcgatc cccggcaaaa cagcattcca ggtattagaa 840
 gaatatcctg attcaggtga aatatattgt gatgcgctgg cagtgttctt gcgccggttg 900
 cattcgattc ctgtttgtaa ttgtcctttt aacagcgatc gcgtatttcg tctcgtcag 960
 gcgcaatcac gaatgaataa cggtttggtt gatgcgagtg attttgatga cgagcgtaat 1020
 ggctggcctg ttgaacaagt ctggaaagaa atgcataagc ttttgccatt ctcaccggat 1080
 tcagtcgtca ctcattggtga tttctcactt gataacctta tttttgacga ggggaaatta 1140
 ataggttgta ttgatgttgg acgagtcgga atcgcagacc gataccagga tottgccatc 1200
 ctatggaact gcctcgggtga gttttctcct tcattacaga aacggctttt tcaaaaatat 1260
 ggtattgata atcctgatat gaataaattg cagtttcatt tgatgctcga tgagtttttc 1320
 taatcagtac tgacaataaa aagattcttg ttttcaagaa cttgtcattt gtatagtttt 1380
 tttatattgt agttgttcta ttttaataca atgtagcgt gatttatatt ttttttcgcc 1440
 tcgacatcat ctgcccagat gcgaagttaa gtgcgcagaa agtaatatca tgcgtcaatc 1500
 gtatgtgaat gctggctcgt atactgctgt cgattcgata ctaacgccgc catccagtgt 1560
 cgaaaacgag ctctcgagaa cccttaatat aacttcgtat aatgtatgct atacgaagtt 1620
 attaggtgat atcagatcca ctagtggcct atgcagggcc cagtatcatt atgacgttgt 1680
 acctgacctt atga 1694

<210> 5

<211> 1694

5 <212> ADN

ES 2 582 637 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> casete integrador usado para la eliminación del gen ARE2

<400> 5

tttatattgt agttgttcta ttttaatcaa atgtagcgt gatttatatt ttttttcgcc 1440

tcgacatcat ctgcccagat gcgaagttaa gtgcgagaa agtaatatca tgcgtcaatc 1500

gtatgtgaat gctggtcgct atactgctgt cgattcgata ctaacgcgc catccagtgt 1560

cgaaaacgag ctctcgagaa cccttaatat aacttcgtat aatgtatgct atacgaagtt 1620

attaggtgat atcagatcca ctagtggcct atgcgggacc aagtgtcatg tgtacgttgt 1680

5 acttgacatt ctaa 1694

<210> 6

<211> 1095

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> casete integrador integrado dentro del locus LEU2

<400> 6

ES 2 582 637 T3

| | |
|--|------|
| atgtctgccc ctaagaagat cgtcgttttg ccaggtgacc acgttggtca agaaatcaca | 60 |
| gccgaagcca ttaaggttct taaagctatt tctgatgttc gttccaatgt caagttcgat | 120 |
| ttcgaaaatc atttaattgg tgggtgctgct atcgatgcta caggtgttcc acttccagat | 180 |
| gaggcgctgg aagcctccaa gaaggctgat gccgttttgt taggtgctgt ggggtggtcct | 240 |
| aaatggggta ccggtagtgt tagacctgaa caaggtttac taaaaatccg taaagaactt | 300 |
| caattgtacg ccaacttaag accatgtaac tttgcatccg actctctttt agacttatct | 360 |
| ccaatcaagc cacaatttgc taaaggtact gacttcgttg ttgtcagaga attagtggga | 420 |
| ggtatttact ttggtaagag aaaggaagac gatggtgatg gtgtcgcttg ggatagtgaa | 480 |
| caatacaccg ttccagaagt gcaaagaatc acaagaatgg ccgctttcat ggccctacaa | 540 |
| catgagccac cattgcctat ttggtccttg gataaagcta atgttttggc ctcttcaaga | 600 |
| ttatggagaa aaactgtgga ggaaaccatc aagaacgaat tccctacatt gaaggttcaa | 660 |
| catcaattga ttgattctgc cgccatgatc ctagttaaga acccaaccca cctaaatggt | 720 |
| attataatca ccagcaacat gtttgggtgat atcatctccg atgaagcctc cgttatccca | 780 |
| ggttccttgg gtttgttgcc atctgcgtcc ttggcctctt tgccagacaa gaacaccgca | 840 |
| tttggtttgt acgaaccatg ccacggttct gctccagatt tgccaaagaa taagggtcaac | 900 |
| cctatcgcca ctatcttgtc tgctgcaatg atggtgaaat tgtcattgaa cttgcctgaa | 960 |
| gaaggtaagg ccattgaaga tgcagttaaa aaggttttgg atgcaggtat cagaactggt | 1020 |
| gatttaggtg gttccaacag taccaccgaa gtcggtgatg ctgtcgccga agaagttaag | 1080 |
| aaaatccttg cttaa | 1095 |

<210> 7

<211> 1295

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> casete integrador integrado dentro del locus HO

<400> 7

ES 2 582 637 T3

atgctttctg aaaacacgac tattctgatg gctaacggtg aatgtggctg tggtttcagg 60
 gtccataaag cttttcaatt catctttttt ttttttgttc ttttttttga ttccggtttc 120
 tttgaaattt ttttgattcg gtaatctcog agcagaagga agaacgaagg aaggagcaca 180
 gacttagatt ggtatatata cgcatatgtg gtggtgaaga aacatgaaat tgcccagtat 240
 tcttaaccca actgcacaga acaaaaacct gcaggaaacg aagataaatc atgtcgaag 300
 ctacatataa ggaacgtgct gctactcadc ctagtccctgt tgctgccaag ctatttaata 360
 tcatgcacga aaagcaaaca aacttgtgtg cttcattgga tgttcgtacc accaaggaat 420
 tactggagtt agttgaagca ttaggtcca aaatttgttt actaaaaca catgtggata 480
 tcttgactga tttttccatg gagggcacag ttaagccgct aaaggcatta tccgccaagt 540
 acaatttttt actcttcgaa gacagaaaat ttgctgacat tggtaataca gtcaaattgc 600
 agtactctgc ggggtgtatac agaatagcag aatgggcaga cattacgaat gcacacggtg 660
 tgggtgggccc aggtattggt agcggtttga agcaggcggc ggaagaagta acaaaggaac 720
 ctagaggcct tttgatgta gcagaattgt catgcaaggg ctccctagct actggagaat 780
 atactaaggg tactggtgac attgcgaaga gcgacaaaga ttttgttatc ggctttattg 840
 ctcaaagaga catgggtgga agagatgaag gttacgattg gttgattatg acaccggtg 900
 tgggtttaga tgacaagga gacgcattgg gtcaacagta tagaacctg gatgatgtgg 960
 tctctacagg atctgacatt attattggtg gaagaggact attgcaaag ggaagggatg 1020
 ctaaggtaga ggggtgaacgt tacagaaaag caggctggga agcatatttg agaagatgcg 1080
 gccagcaaaa ctaaaaaact gtattataag taaatgcatg tataactaac tcacaaatta 1140
 gagcttcaat ttaattatat cagttattac ccgggaatct cggtcgtaat gatttctata 1200
 atgacgaaaa aaaaaaatt ggaagaaaa agcttcatgg cttttataaa aaggataaga 1260
 gttgtggtaa caacgcaggt gcgcgcatct gctaa 1295

Referencias

EP 0 486 290 A2

- 5 Basson ME, Thorsness M, Finer-Moore J, Stroud RM, Rine J (1988); Structural and functional conservation between yeast and human 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductases, the rate-limiting enzyme of sterol biosynthesis; Mol. Cell. Biol. 8:3797-3808.
- 10 Bennetzen JL, Hall BD (1982); The primary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* gene for alcohol dehidrogenase; J Biol Chem. 257:3018-3025.
- Berben G, Dumont J, Gilliquet V, Bolle PA, Hilger F (1991); The YDp plásmidos: a uniform set of vectors bearing versatile gene disruption cassettes for *Saccharomyces cerevisiae*; Yeast. 7:475-477.
- 15 Boeke JD, Trueheart J, Natsoulis G, Fink GR (1987); 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics; Metods Enzymol. 154:164-175.

- Gaber RF, Culbertson MR (1982); Frameshift suppression in *Saccharomyces cerevisiae*. IV. New suppressors among spontaneous co-revertants of the Group II his4-206 and leu 2-3 frameshift mutations; *Genetics* 101:345-367.
- 5 Gietz Dust Jean A, Woods RA, Schiestl RH (1992); Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells; *Nucleic Acids Res.* 20:1425.
- Guldener U, Heck S, Fielder T, Beinhauer J, Hegemann JH (1996); A new efficient gene disruption cassettes for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* 24:25119-24.
- 10 Hinnen A, Hicks JB, Fink GR (1978); Transformation of yeast. *Proc Natl Acad Sci USA.* 75:1929-1933.
- Lang C and Looman AC (1995); Efficient expression and secretion of *Aspergillus niger* RH5344 polygalacturonase in *Saccharomyces cerevisiae*; *Appl Microbiol Biotechnol* 44:147-156.
- 15 Mortimer RK, Johnston JR (1986); Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center; *Genetics* 1113:35-43.
- Parent SA, Fenimore CM, Bostian KA (1985); Vector systems for the expression, analysis and cloning of ADN sequences in *S. cerevisiae*; *Yeast* 1:83-138.
- 20 Polakowski T, Stahl U, Lang C (1998); Overexpression of a cytosolic hidroximetilglutaril-CoA reductase leads to escualeno accumulation in yeast; *Appl Microbiol Biotechnol.* 49:66-71.
- Pronk JT (2002); Auxotrófica yeast strains in fundamental and applied research; *Appl Environ Microbiol.* 68:2095-2100.
- 25 Tschumper G, Carbon J (1980); Sequence of a yeast ADN fragment containing a chromosomal replicator and the TRP1 gene; *Gene* 10:157-166.
- Webster TD, Dickson RC (1983); Direct selection of *Saccharomyces cerevisiae* resistant to the antibiotic G418 following transformation with a ADN vector carrying the kanamycin-resistance gene of Tn903; *Gene* 26:243-252.
- 30 Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J (1985); Improved M13 fage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors; *Gene* 33:103-119. Erratum in *Gene* 114:81-83.

REIVINDICACIONES

1. Una célula de levadura, en la que
 - a) dicha célula comprende un gen funcional que codifica para hidroximetilglutaril-coenzima-A (HMG-CoA) reductasa soluble;
- 5 b) uno o más genes que codifican para esterilaciltransferasas en dicha célula son defectuosos o eliminados; y
 - c) dicha célula es prototrófica para histidina, leucina y uracilo.
2. La célula de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha célula es una célula de una línea de células estables, preferiblemente más estables que la célula correspondiente que es por lo menos auxotrófica para histidina, leucina o uracilo, más preferiblemente auxotrófica para histidina y leucina, histidina y uracilo, o leucina y uracilo, incluso más preferiblemente auxotrófica para histidina, leucina y uracilo.
- 10 3. La célula de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que dicha célula es una célula modificada genéticamente.
4. La célula de acuerdo con por lo menos una de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicha célula es una célula *Saccharomyces*, más preferiblemente en la que dicha célula es una célula *Saccharomyces cerevisiae*, en particular en la que dicha célula es derivada de una célula *Saccharomyces cerevisiae* de la cepa AH22.
- 15 5. La célula de acuerdo con por lo menos una de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la reductasa soluble HMG-CoA está caracterizada porque
 - a) es una proteína de reductasa soluble HMG-CoA truncada que carece de la región de unión de membrana;
 - b) está codificada en un vector bajo el control transcripcional de un promotor que es activo en dicha célula; y/o
 - c) esta expresada bajo el control de un promotor constitutivo, en particular bajo el control de un promotor
- 20 constitutivo fuerte.
6. La célula de acuerdo con por lo menos una de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el uno o más genes que codifican para esterilaciltransferasas es/son ARE1 y/o ARE2, preferiblemente en la que ambos genes, ARE1 y ARE2, son defectuosos o eliminados.
7. La célula de acuerdo con por lo menos una de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la productividad de terpeno, preferiblemente la productividad de triterpeno, en particular la productividad de escualeno de dicha célula es por lo menos equivalente, preferiblemente incrementada en comparación con la de la célula correspondiente de tipo silvestre y/o la célula correspondiente que es por lo menos auxotrófica para histidina, leucina o uracilo, preferiblemente auxotrófica para histidina y leucina, histidina y uracilo, o leucina y uracilo, más preferiblemente auxotrófica para histidina, leucina y uracilo.
- 25 8. La célula de acuerdo con por lo menos una de las reivindicaciones 1 a 7, en la que dicha célula produce cantidades reducidas de esteril acil ésteres, preferiblemente en la que dicha célula es deficiente para la producción de esteril acil ésteres.
9. Un método de generación de una célula de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde dicho método comprende:
 - a) insertar un gen que codifica para reductasa soluble HMG-CoA dentro de una célula de levadura;
 - b) seleccionar células que comprenden un gen que codifica para dicha reductasa soluble HMG-CoA ;
 - c) eliminar o mutar uno o más genes que codifican para esterilaciltransferasas de dicha célula;
 - d) convertir dicha célula dentro de una célula que es por lo menos prototrófica para histidina, leucina y uracilo, por medio de
- 35 (i) insertar casetes de genes que codifican para una o más enzimas para la producción de histidina, leucina y/o uracilo, y/o
- 40 (ii) mutagénesis de reversión de uno o más genes defectuosos que codifican para enzimas para la producción de histidina, leucina y/o uracilo, en particular por mutagénesis de reversión de un gen defectuoso que codifica para una enzima para la producción de histidina y por inserción de casetes de genes que codifican para enzimas para la
- 45 producción de leucina y uracilo;

- e) seleccionar células que son prototróficas para histidina, leucina y uracilo; y opcionalmente
- f) cultivar células del paso e.); y opcionalmente
- g) aislar y estabilizar las células del paso e.) o f.).

5 10. El método acuerdo con la reivindicación 9, en el que dicha célula es una célula *Saccharomyces*, más preferiblemente en el que dicha célula es una célula *Saccharomyces cerevisiae*, en particular en el que dicha célula es derivada de una célula *Saccharomyces cerevisiae* de la cepa AH22.

10 11. El método de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, en el que el paso a.) comprende la inserción de un vector que codifica para reductasa soluble HMGCoA, en la que la expresión de dicha reductasa soluble HMG-CoA está bajo control de un promotor activo en dicha célula, preferiblemente un promotor constitutivo, en particular un promotor constitutivo fuerte.

12. El método de acuerdo con por lo menos una de las reivindicaciones 9 a 11, en el que el uno o más genes que codifican para esterilaciltransferasas es/son ARE1 y/o ARE2, preferiblemente en el que ambos genes, ARE1 y ARE2, son defectuosos o eliminados.

15 13. El uso de la célula de por lo menos una de las reivindicaciones 1 a 8 o una célula generada por el método de por lo menos una de las reivindicaciones 9 a 12 para la producción de uno o más terpenos, preferiblemente para la producción de uno o más triterpenos, en particular para la producción de escualeno.

14. Un método para la producción de uno o más terpenos, preferiblemente triterpenos, más en particular escualeno, donde dicho método comprende:

20 a) cultivar las células de por lo menos una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 o una célula generada por el método de por lo menos una o una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 en un medio de cultivo adecuado; y

b) aislar uno o más terpenos, preferiblemente uno o más triterpenos, más en particular escualeno de las células o del cultivo de célula del paso a.).

15. Un método para la producción de una composición farmacéutica o cosmética, un lubricante o aceite de transformador, en particular para la producción de una composición de vacuna, donde dicho método comprende:

25 a) producir uno o más terpenos de acuerdo con la reivindicación 14; y

b) mezclar dichos terpenos con dicha composición farmacéutica o cosmética, dicho lubricante o dicho aceite de transformador, en particular con dicha composición de vacuna; en la que dicho uno o más terpenos es/son opcionalmente sometidos además a uno o más pasos de hidrogenación, en el que dicho uno o más terpenos es/son preferiblemente triterpenos hidrogenados, en particular escualeno.

30

Fig. 1

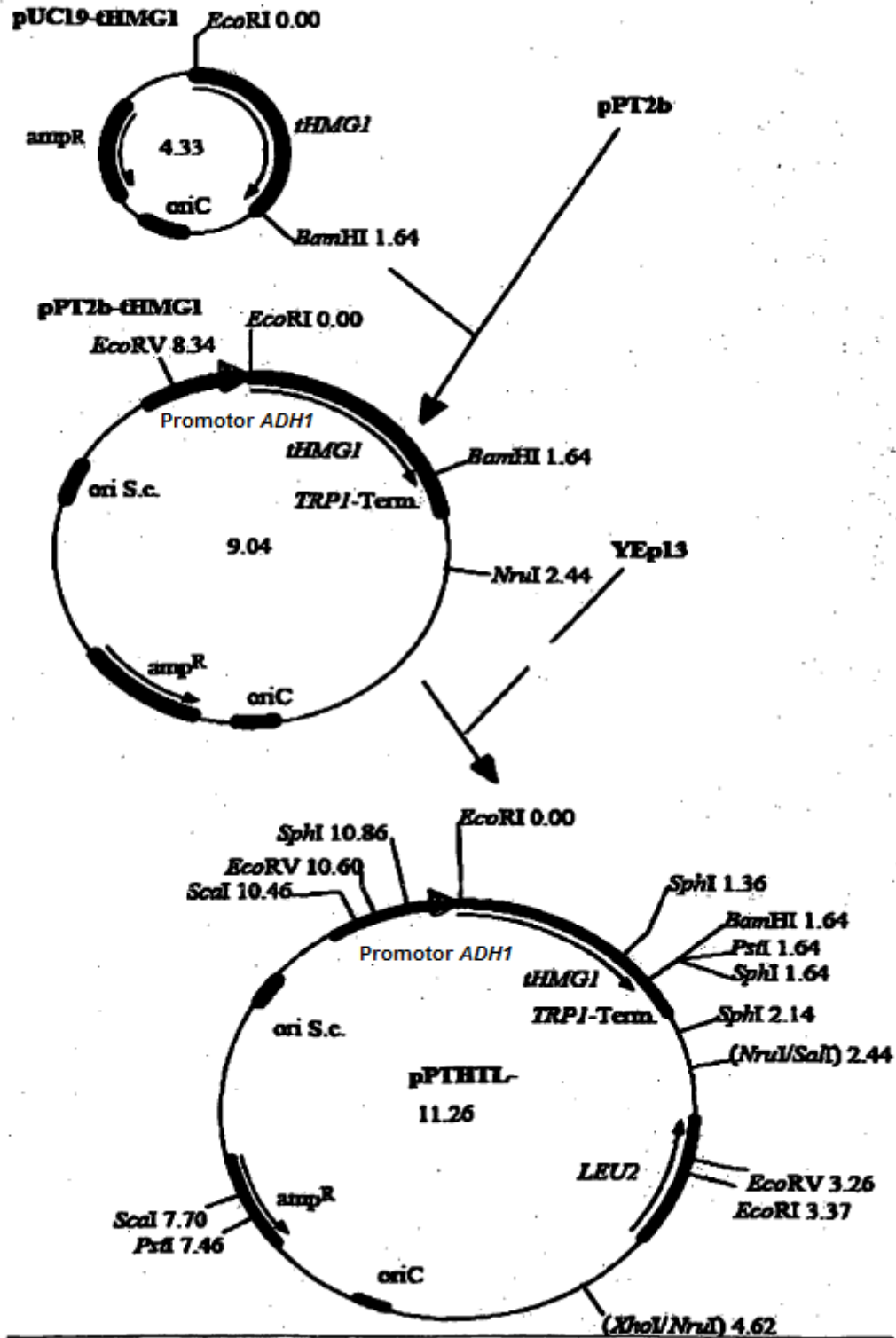


Fig. 2

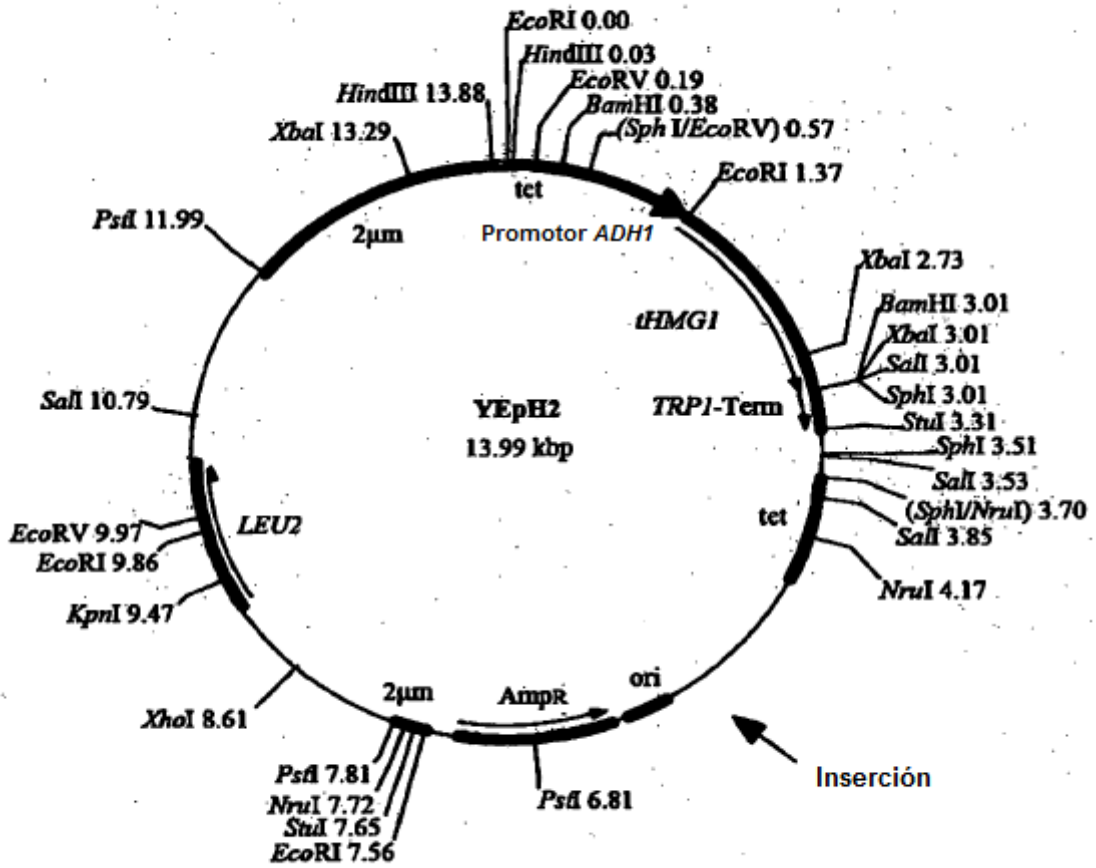


Fig. 3

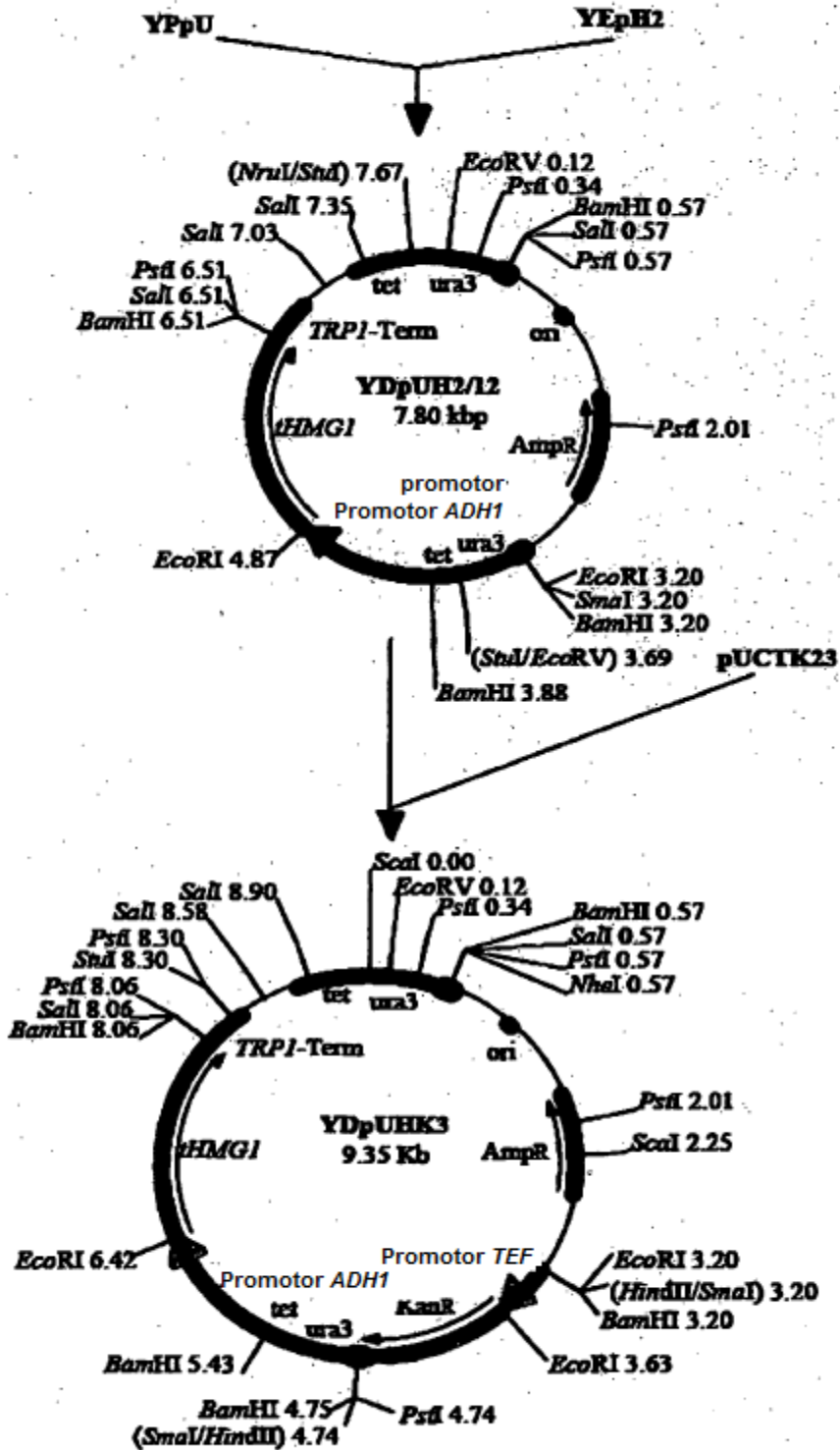


Fig. 4

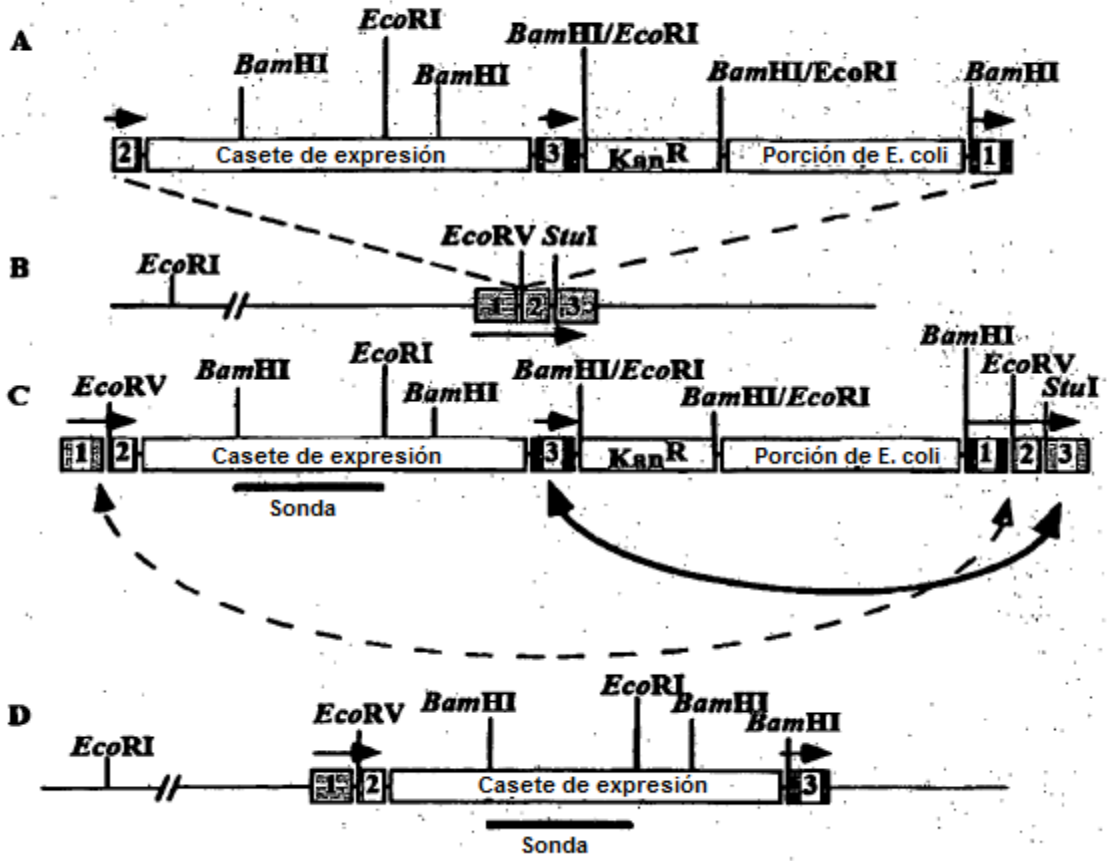


Fig. 5

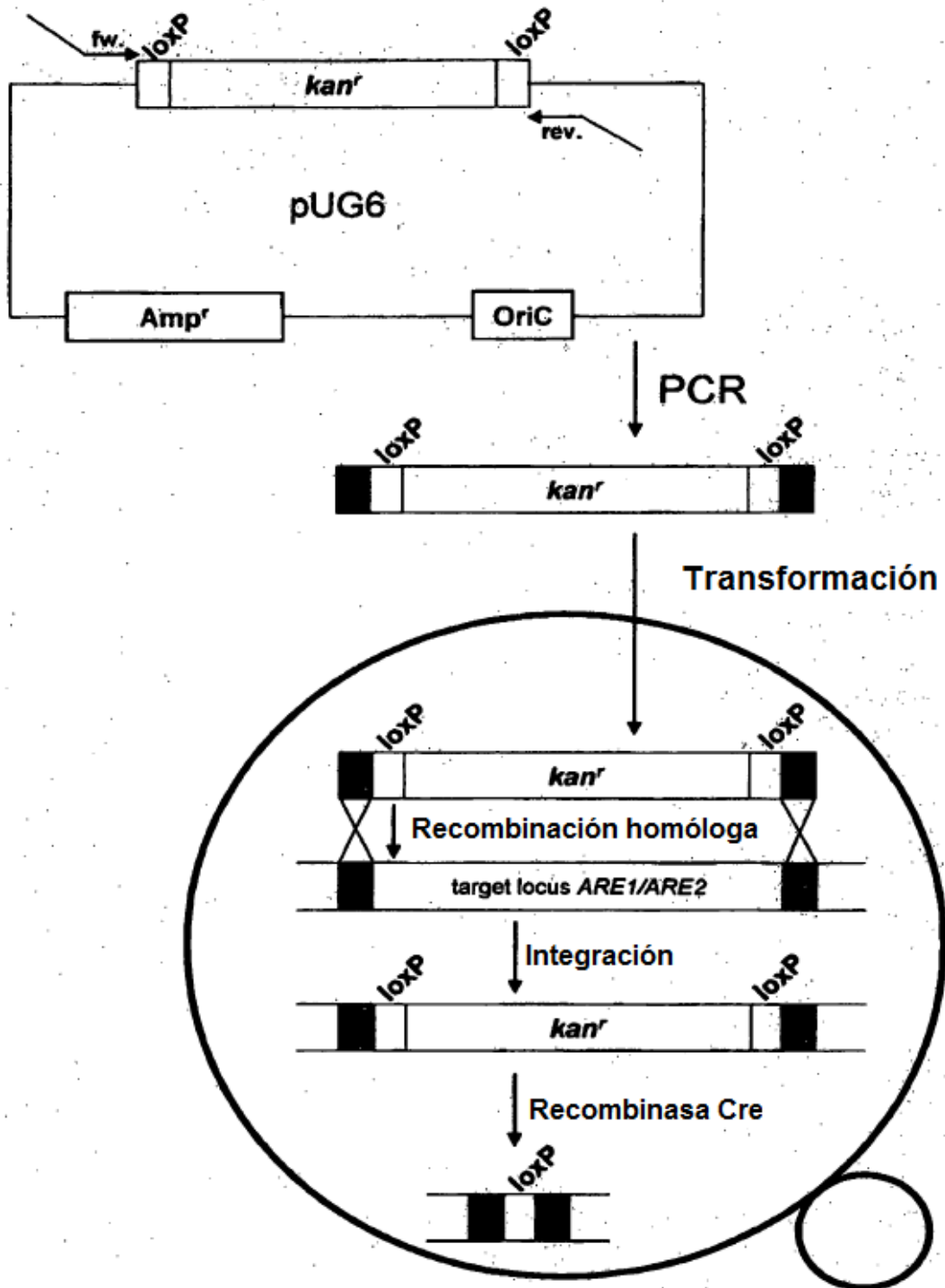


Fig. 6A

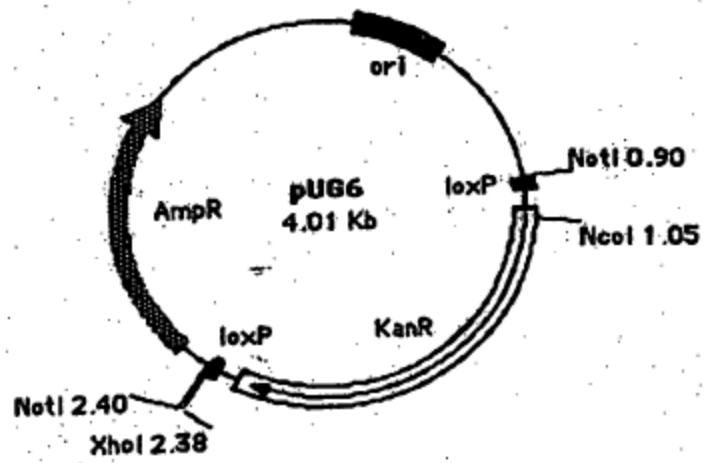


Fig. 6B

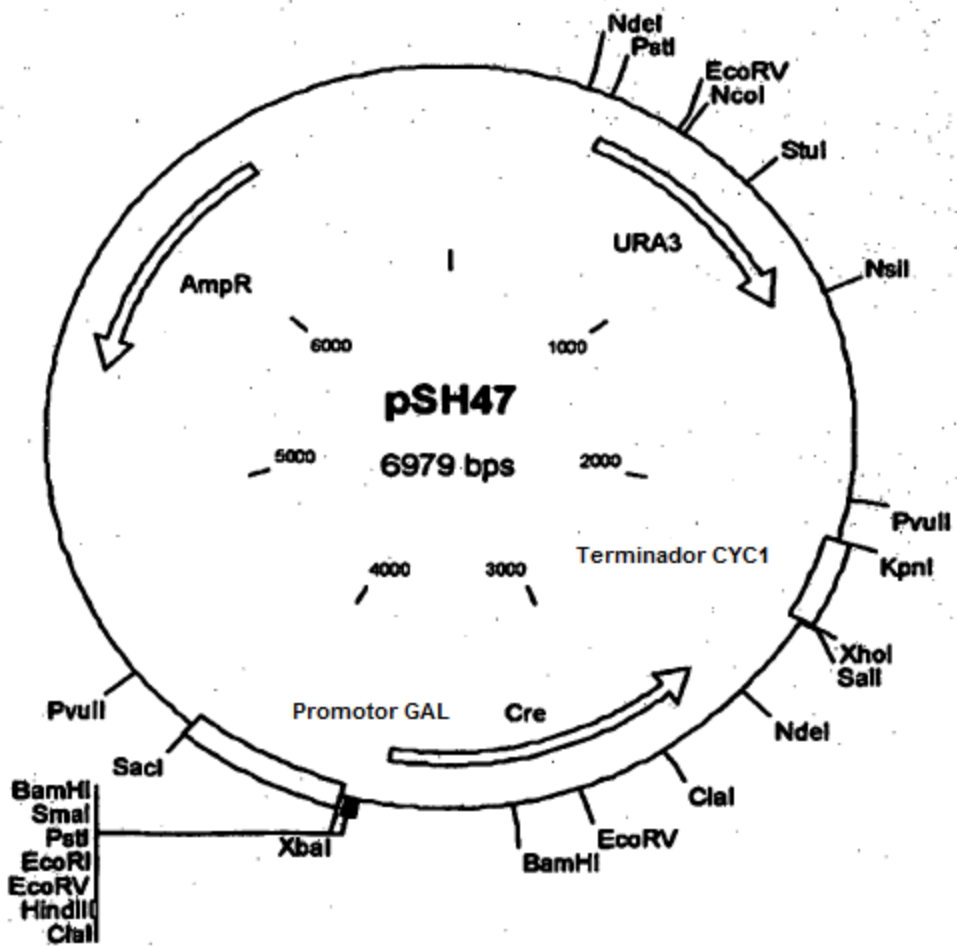


Fig. 7A

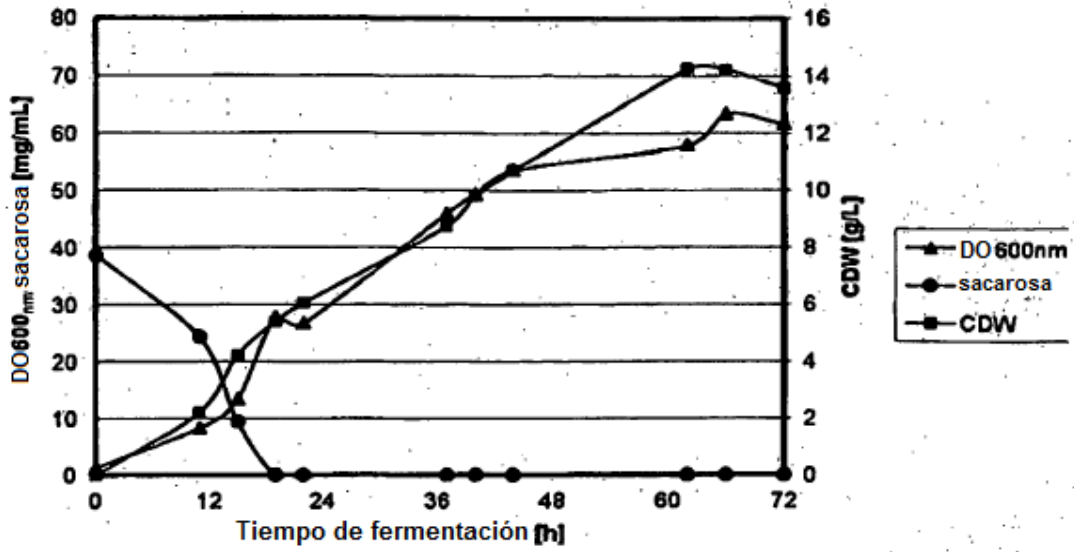


Fig. 7B

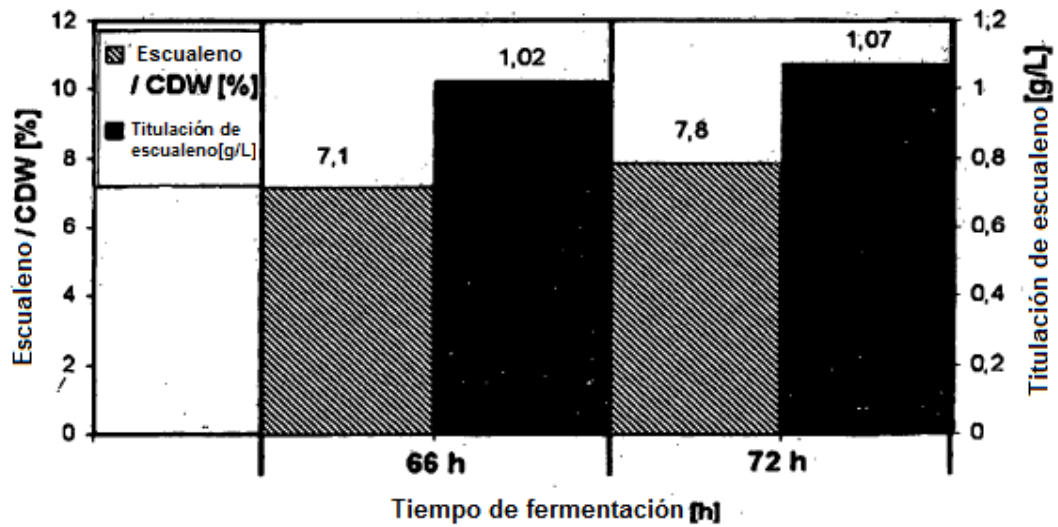


Fig. 8

