

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 673 124**

51 Int. Cl.:

**C12P 19/44** (2006.01)

**C12N 9/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.12.2012 PCT/EP2012/075571**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013 WO13092421**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2012 E 12806020 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.04.2018 EP 2794865**

54 Título: **Una lactonasa derivada de Candida bombicola y sus usos**

30 Prioridad:

**20.12.2011 EP 11194538**

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

**19.06.2018**

73 Titular/es:

**UNIVERSITEIT GENT (100.0%)  
Sint-Pietersnieuwstraat 25  
9000 Gent, BE**

72 Inventor/es:

**VAN BOGAERT, INGE;  
CIESIELSKA, KATARZYNA;  
DEVREESE, BART;  
SOETAERT, WIM y  
ROELANTS, SOPHIE**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 673 124 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 lactonasa derivada de *Candida bombicola* y sus usos.

Campo técnico de la invención

5 La presente invención se refiere a una enzima derivada de *Candida bombicola* que es capaz de lactonizar o polimerizar compuestos que contienen carbohidratos, lípidos, ácidos grasos, ácidos grasos hidroxilados, alcoholes, ácidos dicarboxílicos o mezclas de estos. Por consiguiente, las células hospedantes que comprenden la enzima mencionada anteriormente pueden usarse, a través de la formación de uniones de éster intra o intermoleculares, para producir, por ejemplo, sofrolípidos lactonizados o polímeros de sofrolípidos ácidos. Por otro lado, la célula hospedante que ha perdido su capacidad de producir una enzima funcional de la presente invención se puede usar para producir un 100 % de sofrolípidos ácidos.

Técnica anterior

15 La levadura no patógena *Candida (Starmerella) bombicola* ATCC 22214 (CBS 6009) se aplica comercialmente para la producción de sofrolípidos. Estos biotensioactivos glicolipídicos están constituidos por un grupo principal soforosa (2-O-β-D-glucopiranosil-D-glucopiranososa) acoplado a un ácido graso (sub)terminal hidroxilado de C<sub>18</sub> o C<sub>16</sub> y esto mediante un enlace glicosídico entre el átomo de C anomérico del azúcar y el grupo hidroxilo del ácido graso. Los sofrolípidos típicamente se producen por medio de fermentación en presencia de una fuente de carbono hidrófoba y siempre están constituidos por una mezcla de moléculas relacionadas estructuralmente con variación en 20 1) el grado de saturación del ácido graso (saturado, monoinsaturado o diinsaturado), 2) la presencia o ausencia de grupos acetilo en los átomos en C6' y/o C6", 3) la lactonización entre el extremo carboxílico del ácido graso y el átomo en C4", C6' o C6" del grupo soforosa que resulta en un sofrolípido lactónico o la ausencia de esta lactonización que resulta en un sofrolípido abierto o ácido, 4) la longitud de cadena del ácido graso y 5) la hidroxilación en (ω) o (ω-1) del ácido graso (Asmer *et al.*, 1988).

25 Debido a esta variación estructural, los sofrolípidos exhiben muchas aplicaciones interesantes en una amplia gama de campos industriales (Banat *et al.*, 2010; Franzetti *et al.*, 2010; Kralova and Sjoblom, 2009; Mulligan, 2009). Dado que la composición estructural se refleja en las propiedades fisicoquímicas, diversas industrias están particularmente interesadas en variantes estructurales específicas. Los sofrolípidos lactonizados tienen diferentes propiedades biológicas y fisicoquímicas en comparación con las formas ácidas. En general, los sofrolípidos lactónicos tienen una mejor reducción de la tensión superficial y actividad antimicrobiana, mientras que los ácidos exhiben mejor producción de espuma y solubilidad (Lang *et al.* 2000).

30 Por otro lado, los sofrolípidos ácidos se han usado como moléculas de partida para la síntesis de, p. ej., nanopartículas dispersables (Kasture *et al.*, 2007) y derivados glicolipídicos (Azim *et al.*, 2006; Zerkowski *et al.*, 2006) o han servido como moléculas fuente para la producción de glucolípidos y ácidos grasos para usos especiales (Rau *et al.*, 2001; Saerens *et al.*, 2009), que a su vez se usan para la síntesis de polímeros (Zerkowski *et al.*, 2007) o precursores para plásticos y sabores (Rau *et al.*, 2001). La lactonización reduce la libertad rotativa de la molécula; la 35 dominancia de este tipo de sofrolípidos muy frecuentemente resulta en la formación de cristales en lugar del aceite viscoso más común, lo que hace que los sofrolípidos sean relativamente fáciles de aislar.

A la fecha, es imposible producir de manera eficaz un 100 % de sofrolípidos ácidos por medio de fermentación con *C. bombicola* ATCC22214.

40 Se sabe que, hasta cierto punto, las condiciones de fermentación influyen sobre el equilibrio lactónico/ácido, tales como el nivel de extracto de levadura, el suministro de oxígeno y el sustrato lipídico proporcionado (Garcia-Ochoa & Casas, 1999). Sin embargo, no está claro qué mecanismo determina exactamente el grado de lactonización.

45 En una fermentación de *C. bombicola* típica en glucosa y ácido oleico, el 62 % de los sofrolípidos está compuesto por formas lactónicas diacetiladas, el 4 % está compuesto por formas lactónicas monoacetiladas y el 4 % está compuesto por formas lactónicas no acetiladas mientras que los otros compuestos están constituidos por lactonas 1',6' y lactonas 1',6" (4 %), sofrolípidos ácidos (8 %) y otros lípidos al finalizar el período de cultivo (Asmer *et al.*, 1988). Hu and Ju (2001b) observaron un porcentaje relativo máximo de formas lactónicas de 50 % usando aceite de soja y de 80 % usando hexadecano. En otro experimento donde se usaron ésteres de palma, se produjo 79,1 % en la forma lactónica, pero cuando se aplicó aceite de girasol, solo se recuperan 55,6 % de sofrolípidos lactónicos (Davila *et al.*, 1994). Cuando en una fermentación por lotes alimentada con fuente de carbono mixta se agregó solo 50 aceite en la fase estacionaria, se obtuvo 13 % de sofrolípidos en forma lactónica (87 % ácidos), pero cuando se alimentó una mezcla de aceite y glucosa en la fase estacionaria, se obtuvo 65 % en forma lactónica y, además, se logró una producción mucho mayor (Davila *et al.*, 1997). La concentración del extracto de levadura y la presencia de ácido cítrico también influyen sobre la relación entre sofrolípidos lactónicos y ácidos: cuando la concentración de extracto de levadura fue de 1 g/L, se obtuvo 65 % de los sofrolípidos en forma lactónica, pero cuando la 55 concentración se aumentó hasta 20 g/L, se obtuvo solo aproximadamente 2 % en forma ácida. Sin embargo, la concentración de extracto de levadura está correlacionada de manera negativa con el rendimiento de los

- soforolípidos; de hecho, con 1 g/L se obtuvieron 76 g/L de soforolípidos al finalizar el período de cultivo, mientras que se obtuvieron solo 13 g/L con la preparación con 20 g/L (Casas and Garcia-Ochoa, 1999). La adición de 5 g/L de ácido cítrico al medio aumentó el porcentaje de formas lactónicas en la mezcla de soforolípidos de *Candida apicola* (Hommel *et al.*, 1994). La presencia de citrato en el medio de cultivo se describió como absolutamente necesaria para obtener soforolípidos lactonizados. Stüwer *et al.* (1987) sugirieron que los efectos observados con el citrato son probablemente apenas un efecto de la acción de tampón de la base conjugada de un ácido débil. Los valores de pH bajos conducen a la producción de soforolípidos (= SL) ácidos y el efecto de tampón del citrato, por lo tanto, favorecería la formación de SL lactónicos. Por otro lado, el citrato es un agente quelante y los iones metálicos como el cinc o el calcio podrían ser necesarios para la acción de una enzima hipotética responsable de la apertura del anillo. La presencia de citrato en esta hipótesis evitaría la apertura del anillo y, de esta manera, favorecería la predominancia de SL lactónicos en el medio de cultivo. Otra posibilidad es que el ácido cítrico tenga algún tipo de efecto regulador, tal como se describió para la regulación de la acumulación de lípidos en levaduras oleaginosas (Evans and Ratledge, 1985).
- La relación exacta entre soforolípidos lactónicos y ácidos cambia adicionalmente durante el cultivo típicamente con más formas lactónicas después de tiempos de incubación prolongados (Casas and Garcia-Ochoa, 1999; Hu and Ju, 2001b).
- En resumen, se puede establecer que la dominancia de las formas ácidas en la mezcla de soforolípidos producida mediante *C. bombicola* natural está ligada a cultivos en condiciones subóptimas y, en consecuencia, siempre resulta en rendimientos más bajos en comparación con las condiciones estándares descritas en la literatura.
- Recientemente, se describió otra especie de levadura productora de soforolípidos similares a los de *C. bombicola*. En algunos casos, la relación lactónicos: ácidos es diferente cuando se compara con la relación para *C. bombicola* obtenida en las mismas condiciones de cultivo.
- En los soforolípidos producidos por *C. batistae*, por ejemplo, las formas ácidas componen aproximadamente el 60 % de la mezcla en comparación con el 34 % para *C. bombicola* (Konishi *et al.*, 2008). La misma tendencia se observa para *C. riodecensis*, *C. stellata* y *Candida* sp. NRRL Y-27208, que produjeron predominantemente soforolípidos ácidos libres en comparación con *C. bombicola* y *C. apicola*. Además, Imura *et al.* (2010 y JP2008247845) aislaron la cepa *Candida floricola* TM 1502, que proporciona preferencialmente soforolípidos en forma ácida diacetilados sin incluir soforolípidos en forma de lactona. La cepa mencionada anteriormente es la única descrita que produce un 100 % de soforolípidos ácidos. Sin embargo, la producción de soforolípidos total es significativamente más baja en comparación con las cantidades obtenidas con *C. bombicola*, lo que obstaculiza la aplicación industrial de esta cepa.
- El único modo de obtener soforolípidos ácidos con pureza y cantidad elevadas es a través de la conversión química de las mezclas de soforolípidos de *C. bombicola* naturales en productos ácidos mediante hidrólisis alcalina. Sin embargo, mediante esta conversión, todas las otras uniones de éster se hidrolizarán también, lo que resultará en la retirada de cualesquiera grupos acetilo presentes y la consecuente producción de solo soforolípidos ácidos no acetilados.
- Hasta ahora no estaba claro cómo y cuándo se producía la lactonización. Por otro lado, se ha observado la lactonización espontánea de disoluciones acuosas de soforolípidos ácidos no acetilados, lo que sugiere un proceso espontáneo. Además, se afirma que la presencia de citrato influye sobre la relación lactónicos: ácidos (Hommel *et al.*, 1994; Stüwer *et al.*, 1987) Por otro lado, Hommel *et al.* (1994) sugieren la participación de una lipasa unida a la pared celular en la formación de lactona. En este sentido, se demostró que la Novoenzima 435 o lipasa B comercializada de *Pseudozyma antarctica* (antiguamente *C. antarctica*) puede, en condiciones de laboratorio más bien no fisiológicas, lactonizar un éster de soforolípidos no acetilado ácido en la posición 6" en tetrahidrofurano anhidro (Bisht *et al.*, 1999; Nunez *et al.*, 2003).
- Además, Van Bogaert *et al.* (2011) recientemente revisaron la síntesis microbiana de soforolípidos. En esta revisión, los autores indican que se cree que una lactona esterasa específica media la lactonización de soforolípidos en *C. bombicola*, pero ninguna enzima de ese tipo se ha identificado.
- Tomando todo en conjunto, queda claro que la identificación de una enzima alternativa responsable de una lactonización eficaz ofrecería gran potencial en el control de la variabilidad estructural en la producción de soforolípidos y en la producción de una mezcla de soforolípidos específica.
- Sin embargo, hasta ahora no había en la técnica ni un solo indicio que indicase si se podía hallar una enzima de este tipo y dónde en el genoma de *C. bombicola* y/o cuál es la función del citrato y/o si múltiples enzimas o una única enzima son/es completamente responsable/s del proceso de lactonización.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Los principales componentes, pero no los únicos, de la nueva mezcla de soforolípidos producida mediante la cepa negativa para lactonasa. R=H o COCH<sub>3</sub> (a) ácido 17-O-soforosil-octadecanoico ácido; (b) ácido 17-O-soforosil-octadecenoico ácido.

5 Figura 2: Los soforolípidos típicamente producidos durante la fermentación se consideran una mezcla de compuestos representados por las fórmulas a) forma ácida y b) forma lactónica.

Figura 3: Los péptidos identificados de una lipasa putativa se marcan en negrita. Los péptidos abarcan el 14 % de la secuencia.

10 Figura 4: Cromatograma de HPLC-ELSD de soforolípidos producidos mediante la cepa natural (superior) y la cepa con lactonasa inactivada (inferior) sin la adición de aceite de colza. Los soforolípidos lactónicos eluyen en entre 25 y 31 minutos, los ácidos en entre 17 y 24 minutos. El análisis de LC-MS identificó los picos a los 19,4 y 20,3 min como soforolípidos ácidos no acetilados con una cadena de ácido graso de C18:1 y C18:0, respectivamente. Los picos entre 20,4 y 23,6 se originan a partir de soforolípidos ácidos mono y diacetilados. El pico en 28,8 se genera mediante soforolípidos de C18:1 lactónicos diacetilados.

15 Figura 5: Cromatograma de HPLC-ELSD de soforolípidos producidos mediante la cepa natural (superior) y la cepa con lactonasa inactivada (inferior) con la adición de aceite de colza. Los soforolípidos lactónicos eluyen en entre 25 y 31 minutos, los ácidos en entre 17 y 24 minutos. Los ácidos grasos libres derivados del aceite de colza eluyen en entre 30 y 40 min. El análisis de LC-MS identificó los picos a los 19,3 y 20,1 min como soforolípidos ácidos no acetilados con una cadena de ácido graso de C18:1 y C18:0, respectivamente. Los picos entre 20,4 y 23,6 se originan a partir de soforolípidos ácidos mono y diacetilados. El pico en 27,4 se genera mediante soforolípidos de C18:1 lactónicos diacetilados.

20

Figura 6: Parámetros importantes para el cultivo y la producción de SL de *Candida bombicola* natural (abierto) y un transformante con sobreexpresión de lipasa (relleno) cultivados en medio de producción. El pH (○ y ●), la concentración de glucosa (□ y ■) y la densidad óptica (Δ y ▲) se representan en función del tiempo. Estos resultados son las medias de dos experimentos separados.

25 Figura 7: Cromatogramas de HPLC-ELSD de muestras obtenidas a partir de un mutante de sobreexpresión de *C. bombicola* (a) y el tipo natural (b) cultivados en medio de producción sin citrato después de 8 días de incubación. Las muestras se extrajeron con etanol para no diferenciar ciertos tipos de soforolípidos.

30 Figura 8: Cromatogramas de HPLC-ELSD de muestras obtenidas a partir de una cepa natural de *C. bombicola* (a) y un transformante de sobreexpresión (b) cultivados en medio de producción estándar después de 8 días de incubación. Las muestras se extrajeron con etanol para no diferenciar ciertos tipos de SL.

Figura 9: SDS-PAGE que representa una fracción de lactonasa agrupada de la separación con SD 200 (usada para el análisis en 4.1.2.1.) S: muestra, M: marcador.

Figura 10: Cromatogramas de HPLC de los productos extraídos del ensayo enzimático con 0,6 µg/ml de lactonasa a pH 3,5 con una mezcla de los SL ácidos de la lactonasa KO.

35 Figura 11: Cromatogramas de HPLC de los productos extraídos del ensayo enzimático con 0,6 µg/ml de lactonasa a pH 6 con una mezcla de los SL ácidos de la lactonasa KO.

40 Figura 12: La actividad de la lactonasa recombinante de *Candida bombicola* (1 mg/ml) con respecto a butirato de p-nitrofenilo (pnpb) en un volumen final de 120µl (a) y 200µl (b), monitorizada en el tiempo. Se llevaron a cabo correcciones por el fondo para la placa de múltiples pocillos, así como para el color ligeramente amarillento de la enzima concentrada.

Figura 13: La actividad de la lactonasa recombinante de *Candida bombicola* (1 mg/ml) en el tiempo con respecto a acetato de p-nitrofenilo (pnpa). La liberación de p-nitrofenol en el blanco se debe a la hidrólisis natural de (pnpa).

#### Breve descripción de la invención

45 La presente invención se refiere a la identificación de una única enzima responsable de una lactonización eficaz que ofrece gran potencial en el control de la variabilidad estructural en la producción de soforolípidos y en la producción de una mezcla de soforolípidos específica, menos heterogénea, sin la necesidad de tratamientos químicos adicionales.

50 A efectos de intentar identificar una enzima alternativa responsable de una lactonización eficaz, se sometió a barrido el genoma anotado de *C. bombicola* para determinar la presencia de lipasas putativas. Veinticinco (25) proteínas previstas exhibieron dominios de lipasa putativa y 9 de estas se anotaron como lipasas putativas *sensu stricto*. Una de las 9 lipasas putativas se evaluó como una lipasa que pertenece a la Clase 3 que está compuesta por enzimas que no están relacionadas estrechamente con otras lipasas y, por lo tanto, podrían tener otras actividades

(secundarias). Sin embargo, la inactivación de este gen en *C. bombicola* no resultó en la pérdida parcial ni completa de las capacidades de lactonizar del mutante y el mutante tampoco perdió su capacidad de hidrolizar los triglicéridos del aceite de colza.

5 Otra esterasa putativa se evaluó en función de datos de experimentos proteómicos comparativos. Cuando se analizaron las fracciones proteicas extracelulares obtenidas de células de *C. bombicola* productoras de soforolípidos, se halló inesperadamente una lipasa putativa entre las proteínas más abundantes. Sorprendentemente, una única inactivación de este gen de lactonasa resultó en la ausencia completa de cualquier forma lactónica en cualquier muestra y en cualquier condición evaluada, a pesar de la presencia potencial de otros genes de lipasa funcional putativa que podrían participar en la lactonización. Además, los rendimientos totales de soforolípidos para el tipo natural y el mutante fueron comparables, lo cual es sorprendente en virtud de las manipulaciones previas de la vía biosintética de soforolípidos. De hecho, una inactivación simple del gen de acetiltransferasa, que conduce a la producción de soforolípidos no acetilados, resultó en una producción de solo 5 g/L de soforolípidos, incluso cuando se agregó aceite de colza (Saerens *et al.*, 2011b). Además, cuando se apuntó a la producción de glucolípidos al deshabilitar la segunda glucosiltransferasa de la vía biosintética de soforolípidos, nuevamente se observó una gran reducción en la producción de biotensioactivo (Saerens *et al.*, 2011a).

De manera notable, aunque se deshabilita un gen de lipasa putativa traducido y expresado de manera elevada, el aceite de colza todavía puede servir como fuente de carbono o sustrato hidrófobo para la producción de soforolípidos en la cepa negativa para lactonasa.

20 Por lo tanto, la presente invención se refiere a la identificación de un gen de lactonasa de *Candida (Starmerella) bombicola* que es, por sí mismo, completamente responsable de la lactonización de soforolípidos. De hecho, la supresión del gen resulta, sorprendentemente, en una especie de levadura que produce solo soforolípidos ácidos (véase la Figura 1). Con esta nueva composición estructural, el mutante creado ofrece una tecnología de producción en una etapa para la síntesis fermentativa de moléculas industrialmente importantes que usa sustratos renovables, económicos. Hasta la fecha, no era posible producir una mezcla de soforolípidos con esta composición estructural con *C. bombicola*. Debido a la mayor capacidad de espumado y mejor solubilidad en agua de la mezcla mutante, estos compuestos tienen propiedades únicas y exhiben mejores desempeños para diversas aplicaciones, tales como uso como detergente, en aplicaciones farmacéuticas, en aplicaciones cosméticas, etc.

30 La presente invención, por lo tanto, se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos proporcionada por la SEC ID N° 2 que tiene actividad de lactonasa, o un fragmento de este que conserva dicha actividad de lactonasa o una variante de este que tiene al menos 34 % de identidad de secuencia con la SEC ID N° 2 y que tiene dicha actividad de lactonasa. Está claro, además, que dicho polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos proporcionada por la SEC ID N° 2 o un fragmento o una variante de este es/son completamente responsables de la lactonización de los soforolípidos en *C. bombicola*. Más específicamente, la presente invención se refiere a una variante, según se indicó anteriormente, que comprende una secuencia de aminoácidos proporcionada por la SEC. ID N° 33. La secuencia de aminoácidos mencionada anteriormente corresponde a la lactonasa de *C. bombicola* de la presente invención que se produce en *Pichia pastoris* a través de métodos recombinantes (véase también, además, el Ejemplo 4). Además, la presente invención se refiere a un fragmento o una variante, según se indica anteriormente, en donde dicho fragmento o variante comprende el aminoácido serina en la posición de aminoácido correspondiente a la posición 181 de la SEC. ID N° 33. De hecho, la presente invención describe en el Ejemplo 6 (véase más adelante) que el aminoácido serina (= S o Ser) que es parte del motivo conservador GYSGGA (= SEC. ID. N° 44) y que está presente en la posición 181 de la lactonasa correspondiente a la SEC ID N°33 de la presente invención es importante para la actividad de lactonasa. Por consiguiente, dicho aminoácido es un aminoácido importante que está preferiblemente presente en los polipéptidos, fragmentos y/o variantes de la presente invención.

45 La presente invención se refiere, además, a un ácido nucleico que codifica un polipéptido, fragmento o variante, según se indica anteriormente, y más específicamente a un ácido nucleico, según se indica anteriormente, en donde dicho ácido nucleico consiste en la secuencia de ácido nucleico proporcionada por la SEC ID N° 1 o la SEC ID N° 32. La SEC ID N° 32 se describe detalladamente en el Ejemplo 4. La presente invención se refiere, además, a cualquier vector que comprende un ácido nucleico, según se indicó anteriormente, y cualquier célula hospedante que comprende el vector mencionado anteriormente. Algunos ejemplos no limitantes de vectores y células hospedante específicos se describen adicionalmente en la presente «descripción» y/o en la sección de «ejemplos».

50 La secuencia de ácido nucleico, según se representa mediante la SEC ID N° 1, corresponde al siguiente marco de lectura abierto de 1233 pares de bases y la secuencia proteica de la enzima de la presente invención se representa mediante la siguiente secuencia de 410 aminoácidos, la SEC ID N° 2:

SEC ID Nº 1:

ATGCTGGCTCTGTTTTTTTCGCTTGCGCCTCTACTTTCTCAAGCTCTCCCTTAGGCTAT  
 ACTGCGGCCCCCGCTGAATCATTCTATTTTTGGCCAGAGAACATATCCAGCCTCCAAGC  
 TGGCGAGATTTTGTAGAAAACGGGAACCTCTAACTCTCCAGACATCTTTGACTTTGGCCC  
 TAATCTGGAAAAGGTCGTACAAGTGGCTTACAAAACCCGTCTCACCGATGGCAATGACT  
 CGTTTTCCATCGCCAGTATCTTTATCCCTAAGAATCCAAGCCCAGAACTCAAACCTTACT  
 CTTATCAGACGTTTGAGGATGCCGTGCAGCTTGATTGTGCCCAAGCTATGCTTTAGAA  
 GTGGGTAACAAGTCCAGCAACTATCTTCTGTCACTAGCAATTTATCTGCCATCAGTCGA  
 GAACTTGAGAAAGGACGTCCTGATTATCCCTGATCACGAGGGCTATATTTGAGGATT  
 CTTTGCAGGACGGCAGGAGGGATATGCTGGTTTAGACGGAATTCGCGCTGCTCGAAAC  
 TATCTCAATGGCACCAACGAGACCCCAATTGGTATCTTCGGATACAGTGGAGGTGCACA  
 AGCAACGGCCTGGATTGTTGATTTGCATGACGAGTATGCTCCTGACTTGAACCTTGTG  
 GAACAGTTTCTGGAGGCACTTTGGTTGACGCTTGGGGCACTTTTCAGTATATCGACTAT  
 CCGAAGGTGTATCTAAAGGGCAGCATTCTTATCATGTATACGGGTCTTTTTTTCAGGTTAT  
 CCAGCTCAATTTGAGGTGATTTGGCCATATATTGAGCCTGTAATTAAGAAAACATGCTA  
 CTGCTACGTTTGGCGCCGAATGATTGTAACCAAAGCCCGATACTTCAAGGTTACAACAA  
 TTCAATCATGGCCGGTATACATGTGGACCTTCCCGAATTCCTGCTTCTAAGTACATATT  
 CCAGCACGAGTCCCTCCTTGCCAACCTACAGCGTAGTGCCAGTTTCCACACCGAAGTTTC  
 CTCGCTACATGTACCATGGTGGATCTGATGAGTTGGCCAAATTGAGCCTTGTGAGCAG  
 TATGTTGATCAACAATGGAATACCGGCGCTAATCTCACCTTCGTGGTGTATCCGGGTCT  
 TCTTCATGACGAGACGGCTTACCGTGGCTTTGATGCCGCGATGGATTGGCTTGATGCC  
 AGCTCGATAGTGGATACCTTCCACCTGTAACTCAACTCATAACATGA

SEC ID Nº 2:

MLALFFSLAPLLSQALPLGYTAAPAESFYFWPENISSLQAGEIFRKRELLTLPDIFDFGNLEK  
 VVQVAYKTRRLTDGNSDFSIASIFIPKNPSPKLYSYQTFEDAVQLDCAPSYALEVGNKSSNY  
 LPVTSNLSAISRELEKGRHCIIPDHEGYISGFFAGRQEGYAGLDGIRAARNYLNGTNETPIGIF  
 GYSGGAQATAWIVDLHDEYAPDLNFVGTVSGGLVDAWGTFQYIDYPKVYLKGSILIMYTLG  
 FSGYPAQFEVIWPYIEPVIQENMLLLRLAPNDCNQSPILQGYNNSIMAGIHVDLPEFPASKYIF  
 QHESLLANYSVVPVSTPKFPRYMYHGGSDDELAKLSLVEQYVDQQWNTGANLTFVYPGLL  
 HDETAYRGFDAAMDWLDLDAQLDSGYLPPVNSTHT

El término «ácido nucleico» y un «fragmento» o una «variante» de este corresponde, por ejemplo, a ADN, ADNc, ARN, ácidos nucleicos codificantes y no codificantes y similares.

El término «fragmento» específicamente se refiere a una secuencia de ácido nucleico que contiene menos nucleótidos que la secuencia de ácido nucleico que se representa mediante la SEC ID Nº 1 o SEC ID Nº 32 y que codifica una proteína que conserva dicha actividad de lactonasa. El término «variante» específicamente se refiere a un ácido nucleico que codifica una proteína que tiene al menos 34 % de identidad de secuencia, preferiblemente, que tiene al menos 51-70 % de identidad de secuencia, más preferiblemente, que tiene al menos 71-90 % de identidad de secuencia o, lo más preferiblemente, que tiene al menos 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % de identidad de secuencia con respecto a la SEC ID Nº 2 o SEC ID Nº 32 o con un fragmento de esta, y que codifica una proteína que conserva dicha actividad de lactonasa.

El término «fragmento» se refiere, además, a una proteína (o péptido o polipéptido) que contiene menos aminoácidos que la secuencia de aminoácidos que se representa mediante la SEC ID Nº 2 y que conserva dicha actividad de lactonasa. Dicho fragmento puede ser, por ejemplo, una proteína con una supresión del 10 % o menos de la cantidad total de aminoácidos en el extremo C y/o N. Algunos fragmentos específicos de la presente invención comprenden el aminoácido serina en la posición de aminoácido correspondiente a la posición 181 de la SEC ID Nº

33, según se indicó anteriormente. El término «variante» se refiere a una proteína que tiene al menos 34 % de identidad de secuencia, preferiblemente, que tiene al menos 51-70 % de identidad de secuencia, más preferiblemente, que tiene al menos 71-90 % de identidad de secuencia o, lo más preferiblemente, que tiene al menos 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99 % de identidad de secuencia con respecto a la SEC ID N° 2 o un fragmento de esta, y que codifica una proteína que conserva dicha actividad de lactonasa. Una variante específica de la presente invención es el polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos proporcionada por la SEC ID N° 33, según se indicó anteriormente.

Por consiguiente, los ortólogos o genes en otros géneros o especies (distintos de la cepa *Candida bombicola* ATCC 22214 de la cual derivan la SEC ID N° 1 y 2) que codifican un polipéptido con al menos 34 % de identidad a nivel de aminoácidos y que tienen la función descrita son parte de la presente invención. El porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se determina mediante la alineación de las dos secuencias y la identificación de la cantidad de posiciones con aminoácidos idénticos dividida entre la cantidad de aminoácidos en la más corta de las secuencias x 100. La «variante» mencionada anteriormente también puede diferir de la proteína que se representa en la SEC ID N° 2 solo en sustituciones y/o modificaciones conservadoras, de manera que se retenga la capacidad de la proteína de tener actividad de lactonasa. Una «sustitución conservadora» es una en la que un aminoácido se sustituye por otro aminoácido que tiene propiedades similares, de manera que un experto en la técnica de la química proteica esperaría que la naturaleza de la proteína no cambiara sustancialmente. En general, los siguientes grupos de aminoácidos representan cambios conservadores: (1) ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; y (5) phe, tyr, trp, his.

Las variantes también (o alternativamente) pueden ser proteínas según se describen en la presente memoria modificadas mediante, por ejemplo, la supresión o adición de aminoácidos que tienen una influencia mínima sobre la actividad de lactonasa, según se definió anteriormente, la estructura secundaria y la naturaleza hidropática de la enzima. Adicionalmente, el término variantes también se refiere a cualquier proteína glicosilada o fragmentos de esta, según se describieron anteriormente.

Además, la identificación del gen de lactonasa como el único gen responsable de la lactonización de soforolípidos permite la creación de un mutante de sobreexpresión, donde los soforolípidos lactonizados se enriquecen notablemente, por lo tanto, con la mezcla mutante siendo privada de soforolípidos ácidos. Debido a la reducción de la tensión superficial y la actividad antimicrobiana significativamente mejores, dicha mezcla mutante llama la atención en las industrias farmacéutica y médica. Por consiguiente, la presente invención se refiere al uso de un polipéptido, un fragmento y/o una variante, según se define anteriormente, para lactonizar o polimerizar compuestos que contienen carbohidratos, lípidos, ácidos grasos, ácidos grasos hidroxilados, alcoholes, ácidos dicarboxílicos o mezclas de estos y, más específicamente, al uso, según se define anteriormente, en donde dichos compuestos que contienen carbohidratos son preferiblemente soforolípidos. La presente invención se refiere, además, a métodos para lactonizar o polimerizar compuestos que contienen carbohidratos, lípidos, ácidos grasos, ácidos grasos hidroxilados, alcoholes, ácidos dicarboxílicos o mezclas de estos que comprenden: a) proporcionar un polipéptido aislado, fragmento o variante, según se define anteriormente, y b) poner en contacto dichos compuestos que contienen carbohidratos, lípidos, ácidos grasos, ácidos grasos hidroxilados, alcoholes, ácidos dicarboxílicos o mezclas de estos con dicho polipéptido aislado, fragmento o variante, según se definieron anteriormente. Los compuestos que contienen carbohidrato son preferiblemente soforolípidos. Algunas realizaciones específicas, pero no limitantes, de los métodos o ensayos mencionados anteriormente se describen en la sección de ejemplos adicionalmente (p. ej., el ejemplo 3 relacionado con el uso de una levadura que sobreexpresa lactonasa y el ejemplo 5 relacionado con ensayos de actividad con la lactonasa).

Por lo tanto, la presente invención se refiere a una célula hospedante modificada que se transforma con un ácido nucleico exógeno, según se definió anteriormente. También se describen células que sobreexpresan un ácido nucleico endógeno, según se definió anteriormente.

En otras palabras, la presente invención se refiere al uso de las proteínas/polipéptidos/péptidos/fragmentos/variantes que tienen actividad de lactonasa, según se describe anteriormente, para lactonizar compuestos que contienen carbohidrato tales como soforolípidos, celobiosalípidos, alquilglucósidos; o lípidos, ácidos grasos, ácidos grasos hidroxilados. En otras palabras, para formar uniones de éster intramoleculares.

Además, la presente invención se refiere al uso de las proteínas con una secuencia idéntica (parcial) o similar a la SEC ID N° 2 o SEC ID N° 33 para la polimerización de soforolípidos ácidos, glicolípidos, ácidos grasos, ácidos grasos hidroxilados, ácido dicarboxílico o mezclas de estos. En otras palabras, la presente invención se refiere a la formación de uniones de éster intermoleculares.

El término «actividad de lactonasa», por lo tanto, se refiere a la formación de uniones de éster intramoleculares o intermoleculares, según se indica anteriormente.

Por consiguiente, la presente invención se refiere al uso de una cepa hospedante modificada que expresa una proteína que tiene actividad de lactonasa, según se describió anteriormente, para lactonizar o polimerizar compuestos que contienen carbohidratos tales como soforolípidos, celobiosalípidos, alquilglucósidos; o lípidos,

ácidos grasos, ácidos grasos hidroxilados, alcoholes, ácidos dicarboxílicos o mezclas de estos. En este sentido, la presente invención se refiere al uso, según se describió anteriormente, en donde dicha cepa hospedante modificada se transforma con una secuencia de ácido nucleico exógena, según se describió anteriormente. También se describe el uso de una cepa hospedante modificada en donde dicha cepa hospedante modificada sobreexpresa una secuencia de ácido nucleico endógena, según se describió anteriormente. De esta manera, la presente invención se refiere al uso, según se describió anteriormente, en donde dicha cepa hospedante modificada es una bacteria, un hongo, una levadura, una célula de insecto, una célula vegetal o una célula animal.

La presente invención se refiere, además, al uso de una célula hospedante modificada, según se describió anteriormente, para producir soforolípidos o, más específicamente, para producir al menos 90 % de soforolípidos lactónicos de la producción de soforolípidos total. De hecho, la presente invención describe (véase, p. ej., el ejemplo 3) que el uso de un mutante de sobreexpresión es capaz de resultar en un aumento comercialmente importante del rendimiento total de soforolípidos. La presente invención, además, describe (véase también, p. ej., el ejemplo 3) que los soforolípidos producidos por el mutante de sobreexpresión se enriquecieron en gran medida en las formas lactónicas. El término «enriquecido en gran medida» significa más de 50 %, 60 % o 70 %, preferiblemente, más de 75 %, 80 % u 85 % y, más preferiblemente, más de 90 %, 95 % o 99 % de formas lactónicas con respecto a la cantidad total de soforolípidos.

La presente invención se refiere, además, al uso de una célula hospedante modificada, según se describió anteriormente, para producir al menos 50 % de soforolípidos lactónicos en un medio que carece de citrato. Una realización no limitante, específica, del aspecto mencionado anteriormente de la invención se describe adicionalmente en el Ejemplo 3 (resultado 3.2.1).

La presente invención se refiere, además, a una célula hospedante modificada que comprende un ácido nucleico, según se definió anteriormente, que ha perdido su capacidad de codificar un polipéptido, fragmento o variante, según se definió anteriormente, o en donde dicho polipéptido, fragmento o variante, según se definió anteriormente, ha perdido su actividad de lactonasa. La presente invención se refiere, además, al uso de una célula hospedante modificada, según se definió anteriormente, para producir soforolípidos ácidos. La presente invención se refiere, además, específicamente, según también se describe adicionalmente, al uso de una célula hospedante modificada, según se definió anteriormente, para producir al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o, lo más preferiblemente, 100 % de soforolípidos ácidos en comparación con la cantidad total de soforolípidos que se produce mediante dicha célula hospedante.

El término «célula hospedante» se refiere a cualquier célula hospedante posible, pero se refiere específicamente a una «especie fúngica capaz de producir soforolípidos» que se refiere a un grupo de levaduras filogenéticamente diversas (predominantemente Ascomicetos y unos pocos Basidiomicetos) que sintetizan de manera espontánea soforolípidos constituidos por el azúcar soforosa acoplado a un ácido graso hidroxilado (véase la Figura 2). Dicho grupo de levaduras filogenéticamente diversas comprende la especie *Candida apicola* (Gorin *et al.*, 1961) que inicialmente se identificó como *Torulopsis magnolia*, *C. bombicola* (Spencer *et al.*, 1970; recientemente denominada *Starmerella bombicola*), *Wickerhamiella domericqiae* (Chen *et al.*, 2006), *Rhodotorula bogoriensis* (Tulloch *et al.*, 1968; inicialmente denominada *Candida bogoriensis*), *Candida batistae* (Konishi *et al.*, 2008), *Candida floricola* (Imura *et al.*, 2010), *Candida riocensis*, *Candida stellata* y *Candida sp.* NRRL Y-27208 (Kurzman *et al.*, 2010) y otras especies del subtipo llamado *Starmerella* que incorpora más de 40 especies. Más específicamente, la presente invención se refiere a células hospedante, según se describieron anteriormente, donde dicha *Candida* (*Starmerella*) *bombicola* es la cepa *Candida* (*Starmerella*) *bombicola* ATCC 22214 (CBS 6009).

El término «modificado/a» específicamente se refiere a una especie de levadura o cepa de levadura modificada caracterizada porque tiene al menos una mutación en una molécula de ácido nucleico de la presente invención que codifica una lactonasa de la presente invención. El término «mutación» se refiere a una mutación espontánea y/o a una mutación inducida en el genoma de dicha cepa de levadura. Dicha mutación puede ser una mutación puntual, supresión, inserción o cualquier otro tipo de mutación. El término se refiere lo más específicamente a inactivaciones (KO, por sus siglas en inglés) a través de la inserción de un casete de KO. Inducir una mutación en el genoma de una cepa de levadura se puede llevar a cabo mediante cualquier método en la técnica conocido por un experto, tal como la inserción de un casete de KO en un gen de interés. De manera similar, rastrear o detectar si hay una mutación en el genoma de una cepa modificada, en comparación con la cepa natural, también se puede determinar mediante cualquier método conocido en la técnica.

El término «soforolípidos» (véase la Figura 2) se refiere a biotensioactivos anfífilos basados en carbohidrato que están constituidos por el azúcar soforosa acoplado a una cadena de ácido graso hidroxilado/alquilo, es decir, cadenas de ácido graso hidroxilado/alquilo en donde la cadena de ácido graso/alquilo contiene 5 a 26 átomos de carbono. Preferiblemente y especialmente en relación con *C. bombicola*, dicha cadena de ácido graso está compuesta por 16 o 18 átomos de C. Más específicamente, el término se refiere a biotensioactivos glicolípidicos que están constituidos por un grupo principal soforosa (2-O-β-D-glucopiranosil-β-D-glucopiranososa) del cual el átomo de C anomérico está acoplado a un ácido graso C<sub>10</sub>, C<sub>12</sub>, C<sub>14</sub>, C<sub>16</sub>, C<sub>18</sub>, C<sub>22</sub> o C<sub>24</sub> hidroxilado en (ω) o (ω-1). Se producen como estructuras de anillo abierto (forma ácida) o como lactonas (estructura de anillo cerrado o forma lactónica o

forma lactonizada) con una intraesterificación entre el grupo carboxilo de ácido graso y el átomo de carbono en 4", 6' o 6" del grupo principal soforosa. Además, se pueden acoplar grupos acetilo en las posiciones 6' y/o 6" (Asmer *et al.*, 1988).

5 El término «soforolípidos ácidos» se refiere a soforolípidos sin un extremo carboxílico de ácido graso libre, de manera que el extremo carboxílico del ácido graso no está esterificado intramolecularmente en C4", C6", C6' ni en ningún otro átomo.

10 El término «la producción de soforolípidos ácidos» se refiere a la producción de una mezcla que es menos compleja (como se muestra en la Figura 1) en comparación con la mezcla que se obtiene en una fermentación de *Candida bombicola* natural típica (Asmer *et al.*, 1988). De hecho, la mezcla de la presente invención carece preferiblemente de formas lactónicas. En otras palabras, no se pueden detectar formas lactónicas, usando métodos conocidos, en la mezcla de la presente invención. Por consiguiente, la mezcla de la presente invención comprende al menos 50 %, es decir, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % de soforolípidos ácidos.

15 La presente invención, por lo tanto, se refiere a una cepa fúngica modificada que pertenece a una cepa fúngica capaz de producir soforolípidos, según se describió anteriormente, caracterizada porque dicha cepa fúngica, en comparación con una cepa natural no modificada: a) tiene al menos una mutación en el gen que codifica la lactonasa de la presente invención, y b) produce una mezcla que comprende al menos 50 % de soforolípidos completamente ácidos, preferiblemente, 100 % de soforolípidos completamente ácidos.

La presente invención se refiere al uso, según se describió anteriormente, en donde dicha mutación es una supresión en la lactonasa de la presente invención.

20 Por lo tanto, la presente invención se refiere al uso de una molécula de ácido nucleico, según se definió anteriormente, que ha perdido su capacidad de codificar una lactonasa funcional, o, al uso de un polipéptido, según se definió anteriormente, que ha perdido su actividad de lactonasa para producir una mezcla que comprende soforolípidos completamente no acetilados. Una molécula de ácido nucleico que ha perdido su capacidad de codificar una lactonasa funcional, según se definió anteriormente, se puede obtener mediante mutación o mediante  
25 cualquier medio conocido para silenciar la transcripción o traducción de dicho ácido nucleico, tal como la inserción de un fragmento de ácido nucleico, un gen marcador u otros en la parte codificante o no codificante funcional del gen de lactonasa, una mutación o extracción de la parte codificante o no codificante del gen de lactonasa, el uso de ARNip, miARN específicos, combinaciones de estos o de cualquier otro modo. De manera similar, un polipéptido, según se definió anteriormente, que ha perdido su actividad de lactonasa se puede obtener mediante cualquier compuesto (pequeño) u otro medio para alterar la función de la lactonasa de la presente invención. Los medios para silenciar la transcripción o la traducción o los medios para alterar la función de la lactonasa de la presente invención o los medios para alterar la función de una proteína reguladora/activadora necesaria de la lactonasa comprenden,  
30 por lo tanto, el uso de cualquier molécula, tal como, pero sin limitarse a, un anticuerpo, un aminoácido, un péptido, una molécula pequeña, un aptámero, una ribozima, una secuencia oligorribonucleotídica, tal como un ARNbc usado para iniciar la interferencia por ARN (iARN) o un ácido nucleico no codificante. Por lo tanto, dicha molécula es capaz de unirse a una proteína lactonasa o a una proteína activadora/reguladora de esta o es capaz de interferir en la síntesis celular de la lactonasa o de un activador/regulador de esta, por ejemplo, al unirse y degradar la codificación del ARNm de una proteína lactonasa o un activador/regulador de esta.

40 La presente invención y los usos indicados anteriormente se ilustrarán mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

## Ejemplos

Ejemplo 1: Presencia de un gen de lipasa putativa en el secretoma de células de *C. bombicola* que producen soforolípidos

### 1.1 Material y métodos

#### 45 1.1.1 Preparación de secretoma

50 Se cultivó *C. bombicola* ATCC 22214 durante 8 días en 150 ml de medio Lang (Lang *et al.*, 2000). Las células se separaron del medio mediante centrifugación a 4000 rpm durante 15 min (4 °C). El líquido del medio posteriormente se filtró dos veces en un filtro de 0,22 µm para excluir cualquier traza celular. Se agregó un cóctel inhibidor de proteasa (completo, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche) para evitar la degradación proteica. En consecuencia, la fracción proteica en el medio recogido se enriqueció y concentró hasta un volumen de 30 ml usando una Stirred Ultrafiltration Cell (Modelo 8200) con una membrana de corte de peso molecular de 10 kDa (Sartorius stedim 14439-63-D). A continuación, las proteínas se concentraron adicionalmente mediante ultrafiltración en columnas Vivaspín 15R (corte de peso molecular 10 kDa, Vivaproducts) hasta un volumen de 5 ml. La centrifugación se llevó a cabo a 4000 rpm a 4 °C y. La muestra se mezcló cada 15 min para evitar la precipitación.

## 1.1.2 SDS-PAGE

Se mezclaron cinco  $\mu\text{l}$  de la muestra con 20  $\mu\text{l}$  de tampón Laemmli, se hirvieron durante 5 min y se cargaron en un gel de SDS-PAGE al 12,5 %. El gel se tiñó con azul de Coomassie brillante G250 durante toda la noche y después se destiñó en MeOH al 30 %.

## 5 1.1.3 Digestión triptica

El carril de gel de SDS-PAGE total se dividió en 17 fracciones. Las piezas de gel se destiñeron mediante ciclos de incubación de 3x20 min a 30 °C con 150  $\mu\text{l}$  de una mezcla de acetonitrilo (ACN) al 50 %/200mM de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ . Las proteínas se digirieron en gel (de acuerdo con Shevchenko *et al.*, 2007) mediante la adición de 8  $\mu\text{l}$  de 0,002  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de tripsina (Promega) con 50mM de  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$  en incubación durante toda la noche a 37 °C. Los péptidos se recogieron del sobrenadante. Las piezas de gel se extrajeron adicionalmente con 60 $\mu\text{l}$  de ACN al 60 %/FA al 0,1 % durante una incubación de 20 min a 30 °C. A continuación, las muestras se sometieron a agitación vorticial durante 3 min, se centrifugaron durante un tiempo reducido y la extracción se repitió con 20  $\mu\text{l}$  de ACN al 60 %/FA al 0,1 %. Estos extractos se agruparon con el sobrenadante y la mezcla peptídica resultante se secó usando centrifugación al vacío y se disolvió en 15  $\mu\text{l}$  de ACN al 2 %/FA al 0,1 %.

## 15 1.1.4 Análisis MS NanoLC-ESI-FT

Se cargaron cinco  $\mu\text{l}$  de los péptidos extraídos en una columna analítica Zorbax300SB-C18 de 150 mm x 75  $\mu\text{m}$  (Agilent) conectada a un sistema cromatográfico Agilent 1200 (Agilent, Santa Clara, CA, EE. UU.) acoplado a un espectrómetro de masas LTQ-FTUltra (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), según se describió en de Graaf *et al.* (2010). La separación se llevó a cabo mediante cromatografía de fase inversa usando un gradiente lineal en 50 min que variaba de 2 % de tampón A a 80 % de tampón B a una velocidad de flujo de 300 nl/min. El tampón A de fase móvil era 99,9 % de agua con 0,1 % de ácido fórmico. La fase móvil B era 99,9 % de acetonitrilo con 0,1 % de ácido fórmico. El eluyente de LC se acopló directamente a una fuente TriversaNanoMate ESI (Advion, Ithaca, NY), funcionando en modo nanoLC y equipada con D-chips sobre los que se aplicaba un voltaje de 1,55 kV.

El analizador de masas FT-ICR adquirió barridos de MS a una resolución de 100 000 durante la separación LC. Los tres péptidos precursores más intensos para cada barrido de MS se seleccionaron automáticamente y se fragmentaron mediante el analizador de masas con trampa iónica LTQ.

## 1.1.5 Búsqueda en base de datos

Los datos de LC-MS/MS no procesados recibidos de las mediciones de MS FTICR se analizaron usando Mascot Daemon versión 2.3.2. Para identificar las proteínas, se llevaron a cabo búsquedas con Mascot versión 2.3.01 con respecto al genoma primario anotado de *C. bombicola* disponible internamente que contenía 4617 genes, previsto a partir de 3 cóntigos usando el algoritmo Augustus, junto con su base de datos señuelo creada al vuelo mediante el programa informático Mascot. Los datos de MS/MS para las bandas de 17SDS-PAGE se fusionaron en un único archivo de búsqueda. Se aplicaron los siguientes ajustes de búsqueda: los datos se importaron con el filtro Thermo Finnigan LCQ/DECA RAW, se permitió un máximo de 2 escisiones de tripsina perdidas y se configuró una oxidación (M) como modificación variable. Como parámetro de instrumento, se seleccionó el instrumento ESI-FTICR con una tolerancia de error de MS/MS de 0,5 Da y una tolerancia de error de péptidos de 10 ppm. Todos los péptidos con un umbral de significación mayor que 0,01 y un corte de puntuación iónica menor que 30 se descartaron. Se aceptaron proteínas con dos o más coincidencias peptídicas dentro de los criterios indicados anteriormente. La abundancia proteica, expresada como un valor emPAI (Rappsilber *et al.*, 2002), se calculó mediante Mascot usando la cantidad de péptidos observables  $N_{\text{obsd}}$  y la cantidad de péptidos observados  $N_{\text{obsbl}}$  para un ion primario:

$$\text{emPAI} = 10^{\text{PAI}} - 1 \text{ donde } \text{PAI} = N_{\text{obsd}} / N_{\text{obsbl}}$$

El contenido proteico en porcentajes molar y de fracción de peso se describen como:

$$\text{Contenido proteico (\%mol)} = (\text{emPAI} / \sum \text{emPAI}) \times 100$$

45

$$\text{Contenido proteico (\% peso)} = (\text{emPAI} \times M_r) / \sum (\text{emPAI} \times M_r) \times 100$$

Donde  $M_r$  es el peso molecular de la proteína y  $\sum \text{emPAI}$  es la suma de los valores emPAI para todas las proteínas identificadas.

## 1.2 Resultados

50 En la fracción proteica secretada (secretoma) de *C. bombicola* obtenida después de 8 días de cultivo se identificaron 31 proteínas. Entre ellas, se halló una lipasa putativa con una puntuación proteica de 14222 (corte de puntuación=30)

y 7 péptidos únicos. En la Figura 3 están marcados estos péptidos. En la Tabla 1 se puede encontrar información detallada sobre estos péptidos, incluidas las puntuaciones de Mascot que indican la calidad de la identificación.

Tabla 1. Péptidos de lactonasa detectados y su valor esperado y puntuación iónica calculada mediante Mascot versión 2.3.01

N.º	Puntuación	Esperado	Péptidos
1	51	8,6e-006	K.NPSPELK.L (SEC ID Nº 21)
2	56	3,3e-006	K.VVQVAYK.T (SEC ID Nº 22)
3	91	1,3e-009	R.QEGYAGLDGIR.A (SEC ID Nº 23)
4	70	1e-007	R.YMYHGGSEDELA.L (SEC ID Nº 24)
5	36	0,00026	R.YMYHGGSEDELA.L (SEC ID Nº 24)
6	39	0,00014	R.YMYHGGSEDELA.L + Oxidación (M) (SEC ID Nº 25)
7	67	1,9e-007	R.YMYHGGSEDELA.L + Oxidación (M) (SEC ID Nº 25)
8	94	7,4e-010	R.ELLTLPDIFDFGNLEK.V (SEC ID Nº 26)
9	62	1,2e-006	R.ELLTLPDIFDFGNLEK.V (SEC ID Nº 27)
10	80	2,3e-008	K.RELLTLPDIFDFGNLEK.V (SEC ID Nº 28)
11	73	9,4e-008	R.KRELLTLPDIFDFGNLEK.V (SEC ID Nº 29)
12	43	6,8e-005	R.KRELLTLPDIFDFGNLEK.V (SEC ID Nº 29)

5 El programa informático Mascot calcula automáticamente el factor anemPAI para cada proteína. Para la lipasa, el factor emPAI calculado es 1,39 que corresponde a 3,72 %mol y 3,17 % en peso, respectivamente, para el contenido proteico del secretoma de 8 días.

10 Ejemplo 2: creación de una cepa de *C. bombicola* negativa para lactonasa para la producción de soforolípidos ácidos

## 2.1 Material y métodos

### 2.1.1 Cepas y condiciones de cultivo

15 Se usó *Candida bombicola* ATCC 22214 como la cepa genitora o natural. Se derivó *Candida bombicola* PT36, un mutante autótrofo *ura3* de esta cepa genitora y se usó para construir las cepas con inactivación y sobreexpresión. Cuando se previó la producción de soforolípidos, se usó el medio descrito por Lang *et al.* (2000). Se agregaron 37,5 g/L de aceite de colza dos días después de la inoculación. Los cultivos de levadura se incubaron a 30 °C y 200 rpm durante un tiempo total de 10 días.

20 Se usaron células de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  en todos los experimentos de clonación y se cultivaron en medio Luria-Bertani (LB) (tripton al 1 %, extracto de levadura al 0,5 % y cloruro de sodio al 0,5 %) complementado con 100 mg/L de ampicilina. Los cultivos de *E. coli* líquidos se incubaron a 37 °C y 200 rpm.

### 2.1.2 Aislamiento y secuenciación de ADN

El ADN plasmídico bacteriano se aisló con el kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen). Todas las secuencias de ADN se determinaron en LGC genomics, (Berlín, Alemania).

### 2.1.3 Transformación

Las células de *C. bombicola* se transformaron mediante electroporación. Los transformantes se seleccionaron en placas de dextrosa sintética (SD) [base de nitrógeno de levadura al 0,67 % sin aminoácidos (DIFCO) y glucosa al 2 %]. Las células de *E. coli* se transformaron según lo descrito por Inoue *et al.* (1990).

#### 2.1.4 Creación del casete de inactivación

- 5 Se amplificó un fragmento total de 1944bp que comprendía el CDS de lactonasa completo con los cebadores lip2for3 y lip2rev3 (Tabla 2) y se clonó en el vector pGEM-T® (Promega). El vector creado de 4946 bp se digirió con *MfeI* y *NarI*, suprimiendo de este modo 282 bp de la región codificante de la lactonasa.

- 10 El marcador autótrofo Ura3 de *Candida bombicola* (Van Bogaert *et al.*, 2008<sup>a</sup>) se amplificó con los cebadores ura3MfeIFor y ura3NarIrev (Tabla 2), que alojaban los sitios de restricción para *MfeI* y *NarI*, respectivamente, en sus extensiones en 5'. El fragmento de PCR purificado de 2064bp se cortó con las enzimas de restricción mencionadas y se ligó al vector digerido. El vector resultante de 6717 bp se usó como plantilla para generar el casete de inactivación de lactonasa con los cebadores lip2for3 y lip2rev3. El fragmento de 3806 bp contiene el marcador ura3 con aproximadamente 0,8 kb de la secuencia de lactonasa en cada sitio, necesarios para la recombinación de homólogos en el locus de lactonasa. Este fragmento lineal se usó para transformar *Candida bombicola* PT36.

- 15 Tabla 2. Cebadores usados para inactivar el gen de lactonasa de soforolípidos de *C. bombicola*. Todos los cebadores se obtuvieron de Sigma Genosys. Las regiones subrayadas marcan sitios de restricción.

Nombre	Característica	Secuencia
lip2for3	clonación de lactonasa	CAGCGCTGGGATTCATCTGCTC (SEC ID N° 3)
lip2rev3	clonación de lactonasa	GCTAAGCAGCCTTGGGAGTTTC (SEC ID N° 4)
ura3MfeIFor	marcador ura3 de amplificación	<u>TACAATTG</u> -GCCTATAAGGCTAAAGAAAGTA (SEC ID N° 5)
ura3NarIrev	marcador ura3 de amplificación	AT <u>GGCGCC</u> -GATGCCGAGGAACTGTCATTGC (SEC ID N° 6)
koLip2FlankFor	verificar genotipo KO en 5'	CAGACGCATTGGCTGCCTTC (SEC ID N° 7)
ura3OutBeginRev	verificar genotipo KO en 5'	ACTGCCATCATGGTTCAACCTCAC (SEC ID N° 8)
koLip2FlankRev	verificar genotipo KO en 3'	TACTGCTCTGCCGATCGTTG (SEC ID N° 9)
Ura3OutEndFor	verificar genotipo KO en 3'	TAAAGAAACGAAGGCCAGCAGTC (SEC ID N° 10)

#### 2.1.5 Muestreo

- 20 Se extrajeron muestras de soforolípidos diarias de la siguiente manera: Se agregaron 3 ml de etanol a 1 ml de caldo de cultivo y se agitaron vigorosamente durante 5 min. Después de la centrifugación a 9000 g durante 5 min, se recogió el sobrenadante. Al finalizar el período de incubación, se agregaron 3 volúmenes de etanol al caldo de cultivo para la extracción total de los soforolípidos. Los restos de células se retiraron mediante centrifugación a 1500 g durante 10 min.

- 25 Para un análisis gravimétrico adicional, se evaporaron los sobrenadantes de la mezcla agua-etanol de la extracción total. Se agregaron 2 volúmenes de etanol para disolver los soforolípidos y la fuente de carbono hidrófoba residual. La mezcla se filtró para retirar los compuestos solubles en agua y se evaporó nuevamente. Se agregó 1 volumen de agua y se fijó a pH 7, luego se agregó 1 volumen de hexano y después de una agitación vigorosa se dejó que la mezcla se separara. Se recogieron las diferentes fracciones, se evaporaron y se determinó la masa. La fase de hexano contendrá aceite residual, mientras que la fase de agua contiene los soforolípidos. Las muestras se  
30 analizaron mediante HPLC y detección de dispersión de luz evaporativa.

La concentración de glucosa en los sobrenadantes de cultivo se determinó mediante análisis con el 2700 Select Biochemistry Analyzer (YSI Inc.).

Las unidades formadoras de colonias (UFC) se determinaron al colocar en placas diluciones decimales sobre placas de agar con glucosa al 10 %, extracto de levadura al 1 % y urea al 0,1 % que se incubaron a 30 °C durante tres días.

- 35 2.1.6 Análisis HPLC y LC-MS de glicolípidos

Las muestras de soforolípidos se analizaron mediante HPLC en un sistema Varian Prostar HPLC usando una columna Chromolith® Performance RP-18e de 100-4,6 mm de Merck KGaA a 30 °C y detección de dispersión de luz evaporativa (Alltech). Se debió usar un gradiente de dos eluyentes, una disolución acuosa de ácido acético a 0,5 % y acetonitrilo, para separar los componentes. El gradiente comenzó con acetonitrilo al 5 % y aumentó linealmente hasta 95 % en 40 min. La mezcla se mantuvo de este modo durante 10 min y luego se llevó nuevamente a acetonitrilo al 5 % en 5 min. Se aplicó una velocidad de flujo de 1 mL/min. A efectos de poder comparar y cuantificar las diferentes muestras, se analizaron diluciones de un estándar en paralelo.

El análisis de cromatografía líquida y espectrometría de masas (LCMS) se llevó a cabo en Intertek ASG (Manchester, RU) con un Micromass Quattro Ultima LIMS 1107 (Waters). El intervalo de detección se fijó en m/z 100 a 1000 y se aplicó el modo de ion negativo. Se usaron la misma columna y las condiciones de LC para el análisis de HPLC.

## 2.2 Resultados

El casete de inactivación de lactonasa se construyó como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Este fragmento lineal se usó para transformar la cepa *Candida bombicola* PT36 negativa para *ura3*. El genotipo de los transformantes se verificó mediante PCR de colonia de levadura con dos pares de cebadores (Tabla 2).

La primera combinación, *koLip2for3* y *ura3OutBeginRev*, verifica el evento de recombinación anterior; *koLip2FlankFor* se une al ADN genómico que precede a la región de integración y *ura3OutBeginRev* se une al gen marcador del casete de alteración. El segundo par verifica la parte posterior del mismo modo: *KoLip2FlankRev* se une a la región genómica, mientras que *ura3OutEndFor* se une al gen marcador. Se obtuvieron varios mutantes correctos.

Si la lactonasa participa en el cierre del anillo de los soforolípidos ácidos, la inactivación del gen debería resultar en una reducción en la cantidad relativa de soforolípidos lactónicos. La producción de soforolípidos del inactivado se comparó con el natural en medio con y sin adición de aceite de colza. El crecimiento y la viabilidad celular no fueron afectados; las UFC para los mutantes no fueron significativamente diferentes con respecto al natural y esto durante todo el período de producción. Además, la velocidad de consumo de glucosa también fue comparable a la del natural, lo cual indica que la síntesis de soforolípidos se está llevando a cabo; un proceso bioquímico que consume mucha glucosa. Durante la fase estacionaria y al finalizar el tiempo de cultivo, se recogieron muestras de soforolípidos. Sorprendentemente, una única inactivación del gen de lactonasa resultó en la ausencia completa de cualquier forma lactónica en cualquier muestra y esto tanto en la preparación complementada como en la no complementada con aceite (Figura 4 y 5). Los experimentos se repitieron varias veces en diferentes momentos y para los cultivos sin la adición de aceite se obtuvieron entre 20 y 30 g/L de soforolípidos, mientras se confirmó en la literatura que el rendimiento era mayor cuando se agregaba aceite de colza. En este último caso, se obtuvieron entre 45 y 60 g/L.

De manera inesperada, los rendimientos para el tipo natural y el mutante fueron comparables, a diferencia de las manipulaciones previas de la vía biosintética de soforolípidos. De hecho, una inactivación simple del gen de acetiltransferasa, que conduce a la producción de soforolípidos no acetilados, resultó en una producción de solo 5 g/L de soforolípidos, incluso cuando se agregó aceite de colza (Saerens *et al.*, 2011b). Además, cuando se apuntó a la producción de glucolípidos al deshabilitar la segunda glucosiltransferasa de la vía biosintética de soforolípidos, nuevamente se observó una gran reducción en la producción de biotensioactivo (Saerens *et al.*, 2011a).

Como se puede observar en los cromatogramas de la Figura 5, los ácidos grasos libres derivados del aceite de colza se detectan tanto en el tipo natural como en el inactivado, lo que significa que los triglicéridos del aceite de colza todavía se hidrolizan incluso si se deshabilita una enzima con una función de lipasa putativa.

Este hallazgo indica que al menos una otra enzima lipasa es responsable de la hidrólisis de los triglicéridos del aceite de colza y que, en consecuencia, el aceite de colza todavía puede servir como fuente de carbono o sustrato hidrófobo para la producción de soforolípidos en la cepa negativa para lactonasa.

Ejemplo 3: Creación de una cepa de *C. bombicola* con sobreexpresión de lactonasa para la producción de soforolípidos completamente lactonizados

La producción de una mezcla de soforolípidos enriquecida con moléculas de soforolípidos lactónicas se obtiene mediante el uso de una cepa de levadura productora de soforolípidos como hospedante para la sobreexpresión del gen de lactonasa de *C. bombicola*. Para *C. bombicola* ATCC 22214, por ejemplo, se crea un casete de sobreexpresión en el que el gen de lactonasa está bajo el control del promotor constitutivo y con elevada actividad GKI (fosfoglicerato cinasa). Estas construcciones de sobreexpresión se clonan en un vector que ya comprende el marcador de selección URA3 de *C. bombicola* con secuencias anteriores y posteriores para recombinación en el genoma (Van Bogaert *et al.*, 2008a) y se usan posteriormente para la transformación de una cepa de *C. bombicola* deficiente para *ura3*. Expresar la lactonasa de este modo conduce a una mezcla de soforolípidos notablemente enriquecida con formas lactónicas.

3.1 Material y métodos

3.1.1 Cepa y condiciones de cultivo; aislamiento y secuenciación de ADN; transformación Véanse las secciones 2.1.1, 2.1.2 y 2.1.3.

5 También se usaron otros medios que promueven la producción de soforolípidos ácidos tales como un medio sin adición de citrato.

Los experimentos en biorreactor se llevaron a cabo en un recipiente de cultivo Biostat® B (Sartorius-BBI Systems) con un volumen de trabajo máximo de 1,5 a 3 L. La temperatura (30 °C), el pH (3,5), la velocidad de agitación (800 rpm) y la velocidad del flujo de aire (1 vvm) se controlaron mediante la unidad de control Biostat® B. Se usaron 100 mL de un cultivo durante toda la noche en matraz de agitación para inocular el fermentador. Para mantener el pH a 3,5, se usó 5 N NaOH. No hubo corrección para un pH demasiado alcalino y las fermentaciones se iniciaron a pH 5,8 y en consecuencia se dejaron bajar espontáneamente hasta 3,5. La alimentación de la fuente de carbono hidrófoba se inició 48 horas después de la inoculación y a partir de ese momento se agregaron 25 g de aceite de colza cada 24 horas. Se agregó glucosa adicional 150 horas después de la inoculación. Para las fermentaciones del tipo natural, la velocidad de agitación se debió bajar hasta 600 rpm después de 5 días de cultivo para controlar la formación de espuma dado que la adición de la fuente de carbono hidrófoba ya no ayudaba.

3.1.4 Creación de los casetes de sobreexpresión

La secuencia del promotor GKI completa se amplificó a partir del ADN genómico de *Candida bombicola* usando los cebadores P124\_FOR\_pGKI\_extinfuSpeI y P125\_REV\_pGKI\_extlipase. La secuencia del gen de lactonasa se amplificó a partir del ADN genómico usando los cebadores P126\_FOR\_lipase\_extpGKI y P127\_REV\_termlac\_extlnfuBamHI y ambos fragmentos se fusionaron posteriormente usando PCR de fusión. Un vector (pGEM-t\_cassette\_yEGFP) que contenía el marcador auxótrofo URA3 (bajo el control de su propio terminador) y secuencias posteriores y anteriores para la recombinación homóloga, se cortó con las enzimas SpeI y BamHI. El fragmento lineal mencionado anteriormente se insertó posteriormente en el vector de corte usando el kit de clonación Infusion Advantage PCR (Clontech). El vector resultante de 7896 bp se usó como plantilla para generar el casete de sobreexpresión de lactonasa con los cebadores P1\_FOR\_URA3v y P32\_REV\_cassette. El fragmento de 4904 bp se usó para transformar la cepa *ura3- Candida bombicola* PT36 y la integración se produjo en el locus de *ura3*. Por lo tanto, la cepa resultante alojaba dos copias del gen de lactonasa; una bajo sus propias secuencias reguladoras inalterada en el genoma y un segundo bajo el control del promotor constitutivo intenso GKI en el locus de *ura3*. La integración correcta del casete en el locus de *ura3* se controló al llevar a cabo PCR en colonia con los cebadores P33\_FOR\_checkcassIN y P125\_REV\_pGKI\_extlipase en el lado del casete de inserción en 5' y P35\_REV\_checkcassIN\_DOWN y P126\_FOR\_lipase\_extpGKI en el lado del casete de inserción en 3'.

Tabla 3. Cebadores usados para la sobreexpresión el gen de lactonasa de *C. bombicola*. Todos los cebadores se obtuvieron de Sigma Genosys.

Nombre	Secuencia
P1_FOR_URA3v	AGAACAAGGCCGAGTATGTC (SEC ID N° 11)
P32_REV_cassette	GTCAGATTAGCCTCCGACATAG (SEC ID N° 12)
P124_FOR_pGKI_extinfuSpeI	CTGGCAAATCACTAGGTGCTTAGGGTGCGTGTG (SEC ID N° 13)
P125_REV_pGKI_extlipase	GAAAAAACAGAGCCAGCATTCTGGTTTGGAGGACCTTGGGTAG (SEC ID N° 14)
P126_FOR_lipase_extpGKI	GGTCCTCAAACAGAAAAAATGCTGGCTCTGTTTTTTTCG (SEC ID N° 15)
P127_REV_termlip_extlnfuBamHI	TGCCCTGCGGGATCTTCACTCTAAGAAATCCTCCGAGGAAATC (SEC ID N° 16)
P33_FOR_checkcassIN	CCATACTCAAGCGGAACAC (SEC ID N° 34)
P35_REV_checkcassIN_DOWN	GAGCTCAAGACGCGTTTACTCAATGC (SEC ID N° 35)

35 3.1.5 Muestreo

Las UFC y la glucosa se determinaron según se describió en la sección 2.1.5. Las muestras (1 mL) se tomaron del medio de cultivo durante el cultivo y los soforolípidos se extrajeron mediante la adición de 440  $\mu\text{L}$  de acetato de etilo y 11  $\mu\text{L}$  de ácido acético. Después de agitar vigorosamente, las fracciones se separan mediante centrifugación, la fracción de disolvente (300  $\mu\text{L}$ ) se diluye con 700  $\mu\text{L}$  de etanol y se analizan mediante HPLC y detección de dispersión de luz evaporativa.

La densidad óptica (DO) de los cultivos se midió a 600nm usando el espectrofotómetro Jasco V 630 bio (Jasco Europe). El crecimiento también se evaluó al determinar el peso seco celular (PSC).

### 3.1.6 Análisis HPLC de glicolípidos

Véase la sección 2.1.6.

## 3.2 Resultados

Se seleccionaron tres transformantes para caracterización adicional y todos exhibieron un comportamiento idéntico en comparación con el tipo natural en relación con el crecimiento y el consumo de sustrato cuando se cultivaron en medio de producción. También se hizo un seguimiento de la producción de soforolípidos durante el cultivo y los resultados se describen más adelante.

### 3.2.1 Producción de soforolípidos en medio de producción sin citrato

Como se ilustra en la técnica anterior, se describe la influencia del citrato sobre la lactonización. Por consiguiente, se usó un medio de producción modificado para el cultivo del tipo natural y el mutante de sobreexpresión obtenido. Este medio no contenía citrato, pero era idéntico de cualquier otra manera al descrito por Lang. El pH, el consumo de glucosa y la DO se representan en la Figura 6.

La bajada en el pH observada fue igual para el tipo natural y el mutante de sobreexpresión, de modo que las posibles diferencias en la composición de los SL no pueden atribuirse a efectos del pH. Se observaron algunas diferencias en los valores de DO, pero son provocadas por la interferencia de los SL y el aceite en la absorbancia. Las UFC log también se determinaron antes de detener los cultivos y estas eran iguales a 8,31 y 8,41 ufc log/ml para el tipo natural y el transformante de sobreexpresión, respectivamente. La biosíntesis de SL también se examinó y los cromatogramas de HPLC-ELSD se representan en la Figura 7.

La sobreexpresión del gen de lactonasa claramente conduce a la lactonización de los soforolípidos (el pico eluyó a 28,2 minutos (lactónicos diacetilados) y 24,4 minutos (lactónicos monoacetilados)) en la ausencia de citrato lo cual no sucede con el tipo natural, con el cual solo se producen soforolípidos ácidos (pico en 18,3). Estos resultados claramente prueban que la acción del citrato en la relación de soforolípidos lactónicos/ácidos no es resultado del pH como sugirieron Stüwer *et al.* (1987). Para el tipo natural algún tipo de efecto regulador a nivel de la transcripción debe producirse dado que la expresión de este gen a partir del promotor fosfoglicerato cinasa constitutivo intenso conduce a la producción de soforolípidos lactónicos en la ausencia de citrato.

Las extracciones totales sugirieron rendimientos más altos de soforolípidos para el mutante de sobreexpresión en comparación con el tipo natural. El rendimiento total para el transformante de sobreexpresión fue de 35 g  $\pm$  1,3 g y 17 g  $\pm$  0,5 g para el tipo natural, el aceite restante fue igual a 0,1 g  $\pm$  0,0 g para la cepa de sobreexpresión y 9 g  $\pm$  0,4 g para el tipo natural.

### 3.2.2 Producción de soforolípidos en medio de producción estándar

Un segundo experimento se preparó con el medio de producción normal optimizado para la producción de soforolípidos lactónicos. Esto se llevó a cabo para evaluar si la sobreexpresión de esta enzima ya bastante abundante responsable de la lactonización conduciría incluso a relaciones más altas entre soforolípidos lactónicos/ácidos y posiblemente a rendimientos incluso más altos de estos soforolípidos lactónicos diacetilados.

Se cultivaron dos réplicas del tipo natural y el transformante de sobreexpresión y se extrajeron muestras con etanol y etilacetato según se describió en la sección de materiales y métodos. Los cromatogramas de HPLC-ELSD se representan en la Figura 8. El pico que eluyó en 18,8 minutos corresponde a los soforolípidos ácidos, no acetilados, mientras que el pico que eluyó en 28,3 minutos corresponde a los soforolípidos lactónicos diacetilados. Sorprendentemente, la sobreexpresión de la lactonasa también conduce a un efecto muy claro sobre la composición del soforolípidos en el medio de producción estándar, como se puede concluir al comparar la Figura 8a con la Figura 8b. Mientras que los SL ácidos están todavía presentes en cantidades sustanciales para el tipo natural, estas estructuras no se detectan para el transformante de sobreexpresión.

Los rendimientos totales para estos experimentos estuvieron sometidos a variación elevada y, por lo tanto, se decidió llevar a cabo un experimento en biorreactor en el que todos los parámetros se pueden controlar para obtener resultados más fiables.

3.2.3 Experimento en biorreactor en medio de producción estándar

Se ejecutó un biorreactor con el tipo natural y el mutante de sobreexpresión de lactonasa en paralelo. El rendimiento de SL total del cultivo del tipo natural satisfactorio alcanzó hasta 188,74 g con respecto a 213,42 g para el mutante de sobreexpresión. La producción de SL también fue visible antes para los mutantes de sobreexpresión y el pO<sub>2</sub> bajó bastante más rápido para esta cepa. Los SL producidos por el mutante de sobreexpresión estaban intensamente enriquecidos en formas lactónicas desde el inicio, lo cual confirma los resultados obtenidos en 3.2.2. Al finalizar la fermentación, este efecto fue menos pronunciado dado que la expresión de la lactonasa probablemente se produjo bastante antes durante el cultivo para el mutante de sobreexpresión.

Otro fenómeno interesante fue la ausencia de formación de espuma para los experimentos de sobreexpresión. Mientras que para el tipo natural se debió ajustar la velocidad de agitación a 600 rpm después de 5 días de cultivo para evitar el exceso de espuma provocado por la presencia de SL ácidos, las cepas de sobreexpresión se pudieron dejar con las 800 rpm iniciales sin riesgo de formación de demasiada espuma. Esto podría ser una ventaja para aplicaciones industriales, donde la formación de espuma puede ser un problema real.

Ejemplo 4: Expresión heteróloga del gen de lactonasa en *Pichia pastoris*

La lactonasa de *C. bombicola* se produce extracelularmente en *P. pastoris*. La proteína recombinante posee una etiqueta His que permite la purificación con una columna Talon y después con una columna SD200. La degradación de Edman y el análisis de MS se usaron para confirmar la corrección de la secuencia proteica expresada.

4.1. Materiales y métodos

4.1.1. Producción de proteína recombinante

4.1.1.1. Construcción de ADN

Se usó el ADN genómico de *Candida bombicola* ATCC 22214 para recoger la forma madura de la lactonasa. Se usaron los cebadores LacForvextSacI: CGTCGACTGTATGAGTTGAGT (SEC ID N° 36) y LacRevextPstI: GCTGCAGGACTCCCTTTAGGCC (SEC ID N° 37) para crear un fragmento de PCR con dos sitios de restricción adicionales de *Pst*I y *Sal*I. Después de la purificación del gel, el producto de PCR se subclonó en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen) y se propagó en células TOP10 de *Escherichia coli* (Invitrogen). Después de la purificación del plásmido mediante cromatografía (Qiagen MIDI kit) el inserto se retiró por corte con *Pst*I y *Sal*I. El vector de expresión qpPiczB (Invitrogen) se linealizó con las mismas enzimas de restricción y se purificó del gel (kit innuPREP DOUBLEpure). El inserto se ligó a qpPiczB usando T4ADN ligasa y la construcción se transformó en la *E.coli* electrocompetente One shot TOP10. El mejor clon se purificó con cromatografía (Qiagen) y se confirmó mediante digestión de restricción múltiple con *Xmn*I+*Hind*III, *Nco*I y *Sfo*I+EcoRV. La secuenciación (en Beckman Coulter Genomics) confirma la construcción qpPiczB<sub>lac</sub>. La construcción qpPiczB<sub>lac</sub> linealizada obtenida con SacI, se transformó en células NRRL-Y-11430 de *Pichia pastoris* electrocompetentes.

4.1.1.2. Expresión proteica

El mutante con mejor expresión de NRRL-Y-11430 de *Pichia pastoris* que contenía la construcción qpPiczB<sub>lac</sub> se cultivó en 1L de medio complejo tamponado con glicerol (BMGY, por sus siglas en inglés) en dos matraces de 2L que contenían 500 ml de medio, durante 48h a 28 °C, 250 rpm. A continuación, el medio BMGY se reemplazó con medio complejo tamponado con metanol (BMMY, por sus siglas en inglés) que contenía metanol en lugar de glicerol. Los gránulos de células se lavaron y disolvieron en 1L de medio BMMY en condiciones estériles. La expresión proteica en medio BMMY se llevó a cabo durante 48 h a 28 °C, 250 rpm. Cada 12 horas, se agregó MeOH al 1 % para la estimulación continua de la expresión proteica. Finalmente, el medio que contenía la lactonasa expresada se separó de las células mediante 10 min de centrifugación a 4000g.

4.1.1.3. Purificación proteica

El medio recogido (1L) se filtró a través de un filtro en cuello de botella de 0,22 µm (Corning) y se dividió en diez membranas de diálisis con corte de 6-8kDa (Spectra por). La diálisis se llevó a cabo en 10 L de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50mM; tampón de NaCl 300 mM pH 7,5 en 4 °C durante 24 horas. A continuación, el medio dializado se agrupó, se filtró a través de un filtro de cuello de botella de 0,22 µm (Corning) y se cargó en una columna Talon Superflow (GE healthcare) con un volumen de lecho de 20 ml conectada a un sistema Akta-purifier (GE Healthcare) y equilibrada con el mismo tampón usado para la diálisis. Después de cargar el medio, la columna se lavó con tampón de equilibrio que contenía 5mM de imidazol. La proteína con etiqueta His se eluyó con tampón que contenía 200mM de imidazol. A continuación, la proteína se concentró hasta 2 ml usando columnas Vivaspin con un corte de peso molecular de 10kDa (Sartorius).

La lactonasa parcialmente purificada se inyectó en una columna Superdex 200 (GE Healthcare) funcionando en 20 mM de Tris; 150 mM de tampón de NaCl pH 7,5. Las fracciones que contenían la lactonasa se recogieron y almacenaron a -80 °C.

4.1.2. Confirmación de la secuencia de lactonasa

4.1.2.1. Degradación de Edman

5 Se separaron adicionalmente 20 µL de la fracción de lactonasa concentrada separada mediante la columna Superdex 200, mediante SDS-PAGE a 12,5 %. A continuación, la proteína se electrotransfirió a una membrana PVDF. La determinación de la secuencia en el extremo N se llevó a cabo mediante degradación de Edman automatizada en un instrumento secuenciador Procise modelo 494, equipado con un sistema de HPLC en línea que consistía en una bomba 140C Microgradient y un detector de absorbancia programable 785A (todos de Applied Biosystems). El análisis se llevó a cabo con suministro de ácido en la fase gaseosa.

4.1.2.1. Análisis MS

10 La muestra de SDS-PAGE de la sección 4.1.2.1. se usó para el análisis MS. La preparación y análisis de la muestra se describen en 1.1.3., 1.1.4 y 1.1.5.

4.2. Resultados

15 La lactonasa de *C. bombicola* se expresó de manera satisfactoria en *P. pastoris*. Para la secreción eficaz, el extremo N original se reemplazó con la señal de secreción de factor  $\alpha$  de *Saccharomyces cerevisiae* como intrínseca para el vector qpPiczB. Esta secuencia señal se retira después de la secreción por las células de *P. pastoris*. En consecuencia, la proteína recombinante difiere de la natural: el extremo N más corto comienza con los aminoácidos alanina y glicina y el extremo C contiene una etiqueta His (véase el ácido nucleico de la SEC ID N° 32 y los aminoácidos en la SEC ID N° 33). La Figura 6 representa una SDS-PAGE con la fracción de lactonasa agrupada de la separación en SD 200 (usada para el análisis en 4.1.2.1.) Hay una única banda difusa visible a la altura de 70-75  
20 kDa que es más elevada que la prevista con el peso molecular 45 kDa de la lactonasa. El desplazamiento de masas probablemente se debe a la abundante glicosilación típica para las proteínas secretadas producidas por *Pichia pastoris*.

SEC ID N° 32, los nucleótidos diferentes que forman la SEC ID N° 1 están marcados en negrita:

**GCAGGACT**CCCTTTAGGCTATACTGCGGCCCCCGCTGAATCATTCTATTTTTGGCCAGA  
 GAACATATCCAGCCTCCAAGCTGGCGAGATTTTTAGAAAACGGAACTCTTAACTCTCC  
 CAGACATCTTTGACTTTGGCCCTAATCTGGAAAAGGTCGTACAAGTGGCTTACAAAACC  
 CGTCTCACCGATGGCAATGACTCGTTTTCCATCGCCAGTATCTTTATCCCTAAGAATCCA  
 AGCCCAGAACTCAAACCTTTACTCTTATCAGACGTTTGAGGATGCCGTGCAGCTTGATTGT  
 GCCCAAGCTATGCTTTAGAAGTGGGTAACAAGTCCAGCAACTATCTTCCTGTCACTAG  
 CAATTTATCTGCCATCAGTCGAGAACTTGAGAAAGGACGTCACTGCATTATCCCTGATCA  
 CGAGGGCTATATTTAGGATTCTTTGCAGGACGGCAGGAGGGATATGCTGGTTTAGAC  
 GGAATTCGCGCTGCTCGAACTATCTCAATGGCACCAACGAGACCCCAATTGGTATCTT  
 CGGATACAGTGGAGGTGCACAAGCAACGGCCTGGATTGTTGATTTGCATGACGAGTAT  
 GCTCCTGACTTGAACCTTTGTTGGAACAGTTTCTGGAGGCACTTTGGTTGACGCTTGGGG  
 CACTTTTCAGTATATCGACTATCCGAAGGTGTATCTAAAGGGCAGCATTCTTATCATGTA  
 TACGGGTCTTTTTTCAGGTTATCCAGCTCAATTTGAGGTGATTTGGCCATATATTGAGCC  
 TGTAATTCAGAAAACATGCTACTGCTACGTTTGGCGCCGAATGATTGTAACCAAAGCC  
 25 CGATACTTCAAGGTTACAACAATTCAATCATGGCCGGTATACATGTGGACCTTCCCGAAT  
 TCCCTGCTTCTAAGTACATATTCCAGCACGAGTCCCTCCTTGCCAACTACAGCGTAGTG  
 CCAGTTTCCACACCGAAGTTTCCTCGCTACATGTACCATGGTGGATCTGATGAGTTGGC  
 CAAATTGAGCCTTGTGCGAGCAGTATGTTGATCAACAATGGAATACCGGCGCTAATCTCA  
 CCTTCGTGGTGTATCCGGTCTTCTTCATGACGAGACGGCTTACCGTGGCTTTGATGCC  
 GCGATGGATTGGCTTGATGCCAGCTCGATAGTGGATACCTTCCACCTGTAAACTCAAC  
 TCATACAGT**CGACCATCATCACCATCACC**ACTAG

## ES 2 673 124 T3

SEC ID N° 33, los aminoácidos diferentes que forman la SEC ID N° 2 están marcados en negrita:

**AGLPLGYTAAPAESFYFWPENISLQAGEIFRKRELLTLPDIFDFGNLEKVVQVAYKTRLTD**  
**GNDSFSIASIFIPKNPSPELKL**YSYQTFEDAVQLDCAPSYALEVGNKSSNYLPVTSNLSAISRE  
 LEKGRHCIIPDHEGYISGFFAGRQEGYAGLDGIRAARNYLNGTNETPIGIFGYSGGAQATAWI  
 VDLYDEYAPDLNFVGTVSGGTLVDAWGTFQYIDYPKVYLKGSILIMYTGLFSGYPAQFEVIW  
 PYIEPVIQENMLLLRLAPNDCNQSPILQGYNNSIMAGIHVDLPEFPASKYIFQHESLLANYSVV  
 PVSTPKFPRYMYHGGSD**ELAKLSLVEQYVDQ**QWNTGANLTFVVYPGLLHDETAYRGF**DA**  
**MDWLDAQLDSGYLPPVNSTHTVDHHHHHH**

5 Ambos métodos, la secuenciación del extremo N y el análisis MS, confirman la corrección de la lactonasa recombinante. En la degradación de Edman, la secuencia del extremo N de la lactonasa fue: AGLPLGYTAAPA (SEC ID N° 38), como se esperaba para la proteína recombinante (véase la SEC ID N° 33). Se identificaron 16 péptidos únicos correspondientes a la SEC prevista con ID N° 33 mediante el análisis MS (Tabla 4).

Tabla 4: Péptidos detectados de la lactonasa recombinante mediante el análisis MS. Cada uno de los péptidos se describe por secuencia, su valor esperado y la puntuación iónica calculada mediante Mascot versión 2.3.01

N.º	Puntuación	Esperado	Péptidos
1	42	6,20E-05	K.NPSPELK.L (SEC ID N° 21)
2	55	5,80E-06	K.WQVAYK.T (SEC ID N° 22)
3	50	1,00E-05	K.WQVAYKTR.L (SEC ID N° 39)
4	81	1,50E-08	R.QEGYAGLDGIR.A (SEC ID N° 23)
5	46	2,60E-05	R.YMYHGGSD <b>ELAK</b> .L (SEC ID N° 24)
6	64	3,60E-07	R.YMYHGGSD <b>ELAK</b> .L + Oxidación (M) (SEC ID N° 25)
7	46	6,30E-05	R.QEGYAGLDGIRAAR.N (SEC ID N° 40)
8	91	1,60E-09	K.SSNYLPVTSNLSAISR.E (SEC ID N° 41)
9	73	8,50E-08	K.SSNYLPVTSNLSAISR.E (SEC ID N° 41)
10	83	1,40E-08	R.LTDGNDSFSIASIFIPK.N (SEC ID N° 42)
11	77	5,00E-08	R.ELLTLPDIFDFGNLEK.V (SEC ID N° 26)
12	57	2,40E-06	R.HCIIPDHEGYISGFFAGR.Q + Propionamida (C) (SEC ID N° 43)
13	59	1,50E-06	R.HCIIPDHEGYISGFFAGR.Q + Propionamida (C) (SEC ID N° 43)
14	49	3,40E-05	K.RELLTLPDIFDFGNLEK.V (SEC ID N° 28)
15	42	9,50E-05	R.KRELLTLPDIFDFGNLEK.V (SEC ID N° 29)
16	70	1,20E-07	R.KRELLTLPDIFDFGNLEK.V (SEC ID N° 29)
17	44	8,00E-05	K.GRHCIIPDHEGYISGFFAGR.Q + Propionamida (C) (SEC ID N° 45)

N.º	Puntuación	Esperado	Péptidos
18	61	1,80E-06	R.LTDGNDSFSIASIFIPKNPSPELK.L (SEC ID Nº. 46)
19	43	7,80E-05	R.ELLTLPDIFDFGNLEKWQVAYK.T (SEC ID Nº 47)
20	54	7,80E-06	K.TRLTDGNDSFSIASIFIPKNPSPELK.L (SEC ID Nº 48)

#### Ejemplo 5: Ensayos de actividad con lactonasa purificada

La producción de la lactonasa recombinante en *Pichia pastoris* permite llevar a cabo una caracterización más detallada de esta enzima. Primero, se sometió a prueba una mezcla de soforolípidos (SL) ácidos mono, di y no acetilados para confirmar que la lactonasa es responsable de la formación de los SL con lactona. A continuación, las diferentes formas de SL se analizaron por separado para investigar exhaustivamente el comportamiento de la enzima con dichos sustratos. Todas las pruebas se llevaron a cabo a dos valores de pH diferentes (3,5 y 6).

Se investigó la actividad de lipasa/esterasa de la lactonasa. Las pruebas colorimétricas se basaron en la liberación de p-nitrofenol tras la hidrólisis de tres derivados de p-nitrofenilo con diferentes longitudes de cadena, que eran acetato de p-nitrofenilo (pnpa) y butirato de p-nitrofenilo (pnpb) (Jung and Park, 2008; Lopes *et al.*, 2011).

#### 5.1. Materiales y métodos

##### 5.1.1. Materiales

Compuestos usados para la preparación del tampón del ensayo enzimático: citrato de sodio, hidróxido de sodio y ácido clorhídrico, adquiridos de Sigma.

Los diferentes tipos de SL se obtuvieron por medio de producción mediante cepas de *C. bombicola*. En caso de necesidad, se aplicaron etapas de purificación o tratamientos químicos específicos conocidos para los expertos en la técnica para obtener una forma específica. Se prepararon aproximadamente 100 mM de disolución concentrada en agua para los ensayos enzimáticos. Debido a que la mayoría de las veces se usó una mezcla de SL, se aplicó el peso molecular promedio estimado de 675,4 g/mol y densidad de 1,05 g/ml.

Se adquirió la lipasa B de *Candida antarctica* de Sigma. Los sustratos pnpa y pnpb, y dodecilsulfato de sodio, Triton X-100, Tris también. Recibimos los disolventes acetonitrilo y tetrahidrofurano de Biosolve y Riedel de Haën, respectivamente. El cloruro de sodio se adquirió de Merck.

##### 5.1.2. Ensayos enzimáticos

##### 5.1.2.1. Ensayo enzimático con mezcla de SL ácidos mono, di y no acetilados

Se disolvieron 135 mg de SL secos en 2 ml de agua para preparar una disolución concentrada de 100 mM usada en los ensayos enzimáticos. Se prepararon cinco concentraciones de proteína purificada diferentes: 0,6 µg/ml; 1,6 µg/ml; 3,2 µg/ml; 6 µg/ml; 9,2 µg/ml (concentración 60 µg/ml). La proteína se incubó con aproximadamente 5 mM de una mezcla de soforolípidos di, mono y no acetilados (obtenido del mutante con lactonasa KO) en un volumen total de 1 ml. Para tamponar la reacción a pH3,5 y pH6, se usaron 50 mM de C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub> en ambos casos. El ensayo se detuvo después de incubación durante toda la noche a 28 °C con rotación. Para cada condición se preparó una reacción blanco, donde la enzima se reemplazó con el tampón en el que se purificó la enzima: 25 mM de Tris, 150 mM de NaCl, pH 7,5. Los productos de la mezcla de reacción se extrajeron con 440 µl de etilacetato y 11 µl de ácido acético. De la fase de disolvente, se recuperaron 400 µl y se analizaron con HPLC (véase la sección 2.1.6.). Se compararon los espectros de la muestra y la reacción blanco.

##### 5.1.2.2. Ensayo enzimático con otro SL

Se incubaron 0,6 µg/ml de proteína purificada con ~5 mM de diferentes preparaciones de SL, *es decir*, a: mezcla de SL natural; forma de SL enriquecida con lactona de una producción estándar; SL ácido, no acetilado puro, preparado químicamente y SL ácido no y mono acetilado producido por el mutante con lactonasa KO. Las condiciones para incubación y extracción son las mismas descritas en 5.1.2.1.

##### 5.1.2.3. Actividad de lipasa/esterasa

Para el ensayo enzimático con derivados de p-nitrofenilo, se usó lactonasa purificada en 150 mM de NaCl, 25 mM de Tris, pH 7,5. Las concentraciones de la disolución de trabajo, 6 mg/ml, se prepararon mediante concentradores

Vivaspin (Sartorius), con un corte de peso molecular de 5 KDa. La concentración enzimática se verificó usando un espectrofotómetro nanodrop 2000 (Isogen).

Las disoluciones de trabajo de lipasa B de *Candida Antarctica* se derivaron de una disolución concentrada de 1,2 mg/ml en el mismo tampón enzimático que se usó para la lactonasa.

- 5 Cada uno de los derivados de p-nitrofenil se preparó en un modo diferente debido a su estabilidad y solubilidad. Una disolución de trabajo de 1 mM de acetato de p-nitrofenilo (ppna) se preparó nueva en ACN al 5 %/50 mM de Tris, pH 7,3, apenas antes de su uso. Para butirato de p-nitrofenilo (pnpb), se usó una disolución de trabajo de 1 mM en 50 mM de Tris, pH 7,3 que contenía triton X-100 al 0,2 % y 0,43M de tetrahidrofurano (THF). Instalación experimental del ensayo enzimático.
- 10 En una placa de microtitulación de 96 pocillos, se agregaron 200µl de una disolución de trabajo de sustrato a 40µl de enzima (muestra) o tampón de enzima (blanco). Desde estos pocillos, se transfirieron 200µl a un pocillo vacío después de la mezcla. En un experimento de reducción de escala con lactonasa el volumen final medido fue de solo 120µl. Las mediciones espectrofotométricas se llevaron a cabo en un lector Microplate, modelo 680XR, (Bio-rad) usando una longitud de onda de 405 nm, en el modo de accionamiento de tiempo, llevando a cabo 60 lecturas con intervalos de 30 o 60 segundos a una temperatura de incubación de 25 °C (en un experimento con lipasa B, el intervalo entre dos lecturas se fijó en 15 segundos). El blanqueo para el fondo de los pocillos de la placa de microtitulación y/o el color amarillento para la disolución de lactonasa concentrada se llevó a cabo mediante mediciones del criterio de valoración de los pocillos vacíos. Solo los pocillos con el mismo fondo se usaron para comparar las muestras con los blancos.
- 15
- 20 La lipasa B de *Candida Antarctica* se usó como testigo positivo para la hidrólisis de todos los sustratos.

## 5.2. Resultados

### 5.2.1. Ensayo enzimático con SL

- Los productos extraídos después de cada ensayo enzimático con SL se analizaron en HPLC. Los cromatogramas de la muestra se compararon con un experimento blanco y se buscaron nuevos picos. Las Figuras 10 y 11 presentan los resultados del ensayo enzimático a pH 3,5 y pH 6 con una mezcla de SL mono, di y no acetilados. Las flechas negras marcan los productos formados (0,6 µg/ml de lactonasa): los picos que eluyeron en 26,047 min y 27,494 min que no están presentes en el blanco. Estos picos corresponden a la forma lactónica diacetilada de los SL con ácidos grasos C16 y C18:1 según se determinó mediante LC-MS (2.1.6). Se observó el mismo patrón en el ensayo con cinco concentraciones de proteína purificada diferentes: 0,6 µg/ml; 1,6 µg/ml; 3,2 µg/ml; 6 µg/ml; 9,2 µg/ml.
- 25

- 30 Los ensayos se prepararon con SL ácido no acetilado y mezcla de SL ácidos no y monoacetilados a pH 3,5 y pH 6. En ambos casos no se observó la forma de SL con lactona. Después de los ensayos enzimáticos con la mezcla de SL en forma natural y la mezcla de SL enriquecidos con lactona, no se detectó ninguna diferencia en el patrón entre los blancos y las muestras.

### 5.2.3. Ensayos colorimétricos

- 35 Para cada derivado de p-nitrofenilo, se obtuvo un espectro de absorción accionado por tiempo, usando una longitud de onda de 405nm a 25 °C.

Las Figuras 12a y b muestran los espectros para el 1 mg/ml de lactonasa en combinación con butirato de p-nitrofenilo, en una preparación de volumen de prueba final de respectivamente 120 y 200µl. Se puede establecer una liberación lenta de p-nitro-fenol, que indica alguna actividad de hidrólisis de la enzima en el sustrato C<sub>4</sub>.

- 40 En el gráfico presentado en la Figura 13, se registró la absorción de λ405 durante 60 minutos para una mezcla de reacción que contenía la lactonasa concentrada y acetato de p-nitrofenilo. Los datos se corrigen para la absorbancia de fondo de la placa de múltiples pocillos y la disolución de la enzima de 1mg/ml. Aunque la hidrólisis natural provoca la liberación de p-nitrofenol en el blanco, la velocidad de la reacción aumenta claramente en presencia de la enzima. Además, es obvio que la velocidad de la hidrólisis, catalizada por la lactonasa, es más alta en combinación con el sustrato de acetato (C<sub>2</sub>) que con el de butirato (C<sub>4</sub>).
- 45

- Los ensayos enzimáticos con soforolípidos demuestran que la lactonasa es responsable de la lactonización de los soforolípidos. Después del análisis de los cromatogramas de HPLC del ensayo enzimático con diferentes formas de SL se puede concluir que los SL ácidos diacetilados son los mejores sustratos para la lactonasa. La presente invención muestra que para formar un SL lactónico, preferiblemente, se necesita una concentración baja de la enzima: 0,6 µg/ml. Además, el SL con lactona se produjo en los ensayos tanto a pH 3,5 como pH 6, lo que indica que la enzima es activa en un rango de pH amplio.
- 50

## Ejemplo 6. Lactonasa mutada

6.1. Materiales y métodos

6.1.1. Diseño del mutante

5 La construcción apPiczB (Invitrogen) con la lactonasa (sec. con núm. de ident. 32) descrita en la sección 4.1.1.1. se envió a Genscript donde se llevó a cabo mutagénesis dirigida al sitio de un aminoácido. Ser (181) del motivo conservador GYSGGA (sec. con núm. de ident. 44) codificado por los nucleótidos AGT se reemplazó con Ala codificado por GCT.

6.1.2. Transformación, expresión y purificación

Véase la sección 4.1.1.2 y 4.1.1.3.

6.2. Ensayo enzimático

10 6.2.1. Ensayo enzimático con mezcla de SL ácidos mono, di y no acetilados

El ensayo enzimático con mezcla de 5 mM de SL ácidos mono, di y no acetilados se llevó a cabo con 6 µg/ml de lactonasa y mutante de lactonasa en Ser a pH 3,5 y pH 6.

Para más detalles, véase la sección 5.1.2.1.

6.3. Resultados y conclusión

15 El ensayo enzimático con mezcla de SL ácidos mono, di y no acetilados se llevó a cabo de forma idéntica para la lactonasa y el mutante de lactonasa en Ser junto con blancos para cada condición. En el caso de la lactonasa no mutada, se observaron formas de SL con lactona en los cromatogramas en ambas reacciones a pH 3,5 y pH 6, de manera similar a los resultados descritos en 5.2.1 y las Figuras 6 y 7. Sin embargo, no se observó formación de producto para las reacciones enzimáticas con el mutante de lactonasa en Ser.

20 En conclusión, Ser (181) es importante para la formación de SL con lactona.

## REFERENCIAS

- Asmer HJ, Lang S, Wagner F, Wray V (1988) Microbial production, structure elucidation and bioconversion of sophorose lipids. *J Am Oil Chem Soc* **65**: 1460-1466.
- 5 Azim A, Shah V, Doncel GF, Peterson N, Gao W, Gross R (2006) Amino acid conjugated sophorolipids: a new family of biologically active functionalized glycolipids. *Bioconjugate Chem* **17**: 1523-1529.
- Banat IM, Franzetti A, Gandolfi I, Bestetti G, Martinotti MG, Fracchia L, Smyth TJ, Marchant R (2010) Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl Microbiol Biotechnol* **87**: 427-444.
- Bisht KS, Gross RA, (1999) Enzyme-mediated regioselective acylations of sophorolipids. *J Org Chem* **64**: 780-789.
- 10 Breithaupt TB, Light RJ(1982) Affinity-chromatography and further characterization of the glucosyltransferases involved in hydroxydocosanoic acid sophoroside production in *Candida bogoriensis*. *J Biol Chem* **257**: 9622-9628.
- Casas JA, Garcia-Ochoa F (1999) Sophorolipid production by *Candida bombicola*: Medium composition and culture methods. *J Biosci Bioeng* **88**:488-494
- Chen J, Song X, Zhang H, Qu YB, Miao JY (2006) Production, structure elucidation and anticancer properties of sophorolipid from *Wickerhamiella domercqiae*. *Enzyme Microb Technol* **39**: 501-506.
- 15 Davila AM, Marchal R, Vandecasteele JP (1994) Sophorose lipid production from lipidic precursors - Predictive evaluation of industrial substrates. *J Indust Microbiol* **13**: 249-257.
- Davila AM, Marchal R, Vandecasteele JP (1997) Sophorose lipid fermentation with differentiated substrate supply for growth and production phases. *Appl Microbiol Biotechnol* **47**:496-501.
- 20 De Graaf DC, Aerts M, Brunain M, Desjardins CA, JacobsFJ, Werren H and Devreese B (2010) Insights into the venom composition of the ectoparasitoid wasp *Nasoniavitripennis* from bioinformatic and proteomic studies. *Insect Mol Biol* **19** (Suppl. 1), 11-26.
- De Schutter K, Callewaert N (2012) *Pichia* surface display: a tool for screening single domain antibodies. *Method Mol Biol* **911**: 125-134.
- 25 Evans CT, Ratledge C (1985) The physiological significance of citric acid in the control of metabolism in lipid accumulating yeasts. *Biotechnol Gen Engin Rev* **3**: 349-375.
- Franzetti A, Tamburini E, Banat IM (2010) Applications of biological surface active compounds in remediation technologies. In *Advances in Experimental medicine and biology* Volume 672. Ramkrishna S (ed). Springer-Verlag Berlin: Germany; 121-134.
- 30 Garcia-Ochoa F, Casas JA (1999) Unstructured kinetic model for sophorolipid production by *Candida bombicola*. *Enzyme Microb Technol* **25**:613-621.
- Gorin PAJ, Spencer JFT, Tulloch AP (1961) Hydroxy fatty acid glycosides of sophorose from *Torulopsis magnoliae*. *Can J Chem* **39**: 846-855.
- Hommel RK, Weber L, Weiss A, Himmelreich U, Rilke O, Kleber HP (1994) Production of sophorose lipid by *Candida (Torulopsis) apicola* grown on glucose. *J Biotechnol* **33**:147-155.
- 35 Hu YM, Ju LK (2001b) Sophorolipid production from different lipid precursors observed with LC-MS. *Enzyme Microbial Technol* **29**: 593-601.
- Imura T, Masuda Y, Minamikawa H, Fukuoka T, Konishi M, Morita T, Sakai H, Abe M and Kitamoto D (2010) Enzymatic conversion of *unacetylated* sophoroselipid into acetylated glucoselipid: surface-active properties of novel bolaform biosurfactants. *J Oleo Sci* **59**: 495-501.
- 40 Inoue H, Nojima H, Okayama, H (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23-28.
- Jung S, Park S (2008) Improving the expression yield of *Candida Antarctica* lipase B in *Escherichia coli* by mutagenesis. *Biotechnol Lett* **30**:717-722.
- 45 Kasture M, Singh S, Patel P, Joy PA, Prabhun AA, Ramana CB, Prasad BLV (2007) Multiutility sophorolipids as nanoparticle capping agents: synthesis of stable and water dispersible co nanoparticles. *Langmuir* **23** : 11409-11412.

- Konishi M, Fukuoka T, Morita T, Imura T, Kitamoto D (2008) Production of new types of sophorolipids by *Candida batistae*. *J Oleo Sci* **57**: 359-369.
- Kralova I, Sjoblom J (2009) Surfactants used in food industry: a review. *J Disper Sci Technol* **30**: 1363-1383.
- 5 Kurtzman CP, Price NPJ, Ray KJ, Kuo TM (2010) Production of sophorolipid biosurfactants by multiple species of the *Starmerella (Candida) bombicola* yeast clade. *FEMS Microbiol Lett* **311**: 140-146.
- Lang S, Brakemeier A, Heckmann R, Spöckner S, Rau U (2000) Production of native and modified sophorose lipids. *Chim Oggi* **18**: 76-79.
- Lopes DB, Fraga LP, Fleuri LF, Macedo GA (2011) Lipase and esterase - to what extent can this classification be applied accurately? *Cienc Tecnol Aliment Campinas* **31**: 608-613.
- 10 Mulligan CN (2009) Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. *Curr Opin Colloid In* **14**: 372-378.
- Nunez A, Foglia TA, Ashby R. (2003) Enzymatic synthesis of a galactopyranose sophorolipid fatty acid-ester. *Biotechnol Lett* **25**:1291-1297.
- 15 Rappsilber J, Ryder U, Lamond AI, Mann M (2002) Large-scale proteomic analysis of the human spliceosome. *Genome res* **12**:1231-1245.
- Rau U, Hammen S, Heckmann R, Wray V, Lang S (2001) Sophorolipids: a source for novel compounds. *Ind Crop Prod* **13**: 85-92.
- Saerens K, Van Bogaert I, Soetaert W, Vandamme EJ (2009) Production of glucolipids and specialty fatty acids from sophorolipids by *Penicillium decumbens* naringinase : Optimization and kinetics. *Biotechnol J* **4** : 517-524.
- 20 Saerens KMJ, Roelants S, Van Bogaert INA, Soetaert W (2011a) Identification of the UDP-glucosyltransferase gene UGT1A1, responsible for the first glucosylation step in the sophorolipid biosynthetic pathway of *Candida bombicola* ATCC22214. *FEMS Yeast Res* **11**:123-132.
- Saerens K, Saey S, Soetaert W (2011b) One-step production of unacetylated sophorolipids by an acetyltransferase negative *Candida bombicola*. *Biotechnol Bioengin* **108**: 2923-2931.
- 25 Saerens K, Zhang J, Saey L, Van Bogaert IN, Soetaert W (2011c) Cloning and functional characterization of the UDP-glucosyltransferase UgtB1 involved in sophorolipid production by *Candida bombicola* and creation of a glucolipid-producing yeast strain. *Yeast* **28**: 279-292.
- Spencer JFT, Gorin PAJ, Tulloch AP (1970) *Torulopsis bombicola* sp. n. *A Van LeeuwJ Microb Ser* **36**: 129-133.
- 30 Stüwer O, Hommel R, Haferburg D, Kleber HP (1987) Production of crystalline surface-active glycolipids by a strain of *Torulopsis apicola*. *J Biotechnol* **6**: 259-269.
- Tulloch AP, Spencer JFT, Deinema MH (1968a) A new hydroxy fatty acid sophoroside from *Candida bogoriensis*. *Can J Chem* **46**: 345-348.
- Van Bogaert INA, De Maeseneire SL, Develter D, Soetaert W, Vandamme EJ (2008a) Development of a transformation and selection system for the glycolipid producing yeast *Candida bombicola*. *Yeast* **25**: 272-278.
- 35 Van Bogaert INA, Zhang J, Soetaert W (2011) Microbial synthesis of sophorolipids. *Process Biochem* **46**: 821-833.
- Winkler UK, Stuckmann M. (1979) Glycogen, Hyaluronate, and Some Other Polysaccharides Greatly Enhance the Formation of Exolipase by *Serratiamarcescens*. *J Bacteriol* **138**:663-70.
- Zerkowski JA, Solaiman DKY (2007) Polyhydroxy fatty acids derived from sophorolipids. *J Amer Oil Chem Soc* **84**: 463-471.
- 40 Zerkowski JA, Solaiman DKY, Ashby RD, Foglia TA (2006) Head group-modified sophorolipids : synthesis of new cationic, zwitterionic, and anionic surfactants. *J Surfactants Deterg* **9** : 57-62.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

<110> UNIVERSITEIT GENT  
 <120> Una lactonasa derivada de Candida bombicola y sus usos  
 5 <130> P2011/098/PCT  
 <150> EP11194538.2  
 <151> 2011-12-20  
 <160> 48  
 <170> PatentIn versión 3.3  
 10 <210> 1  
 < 211> 1233  
 < 212> ADN  
 < 213> Candida bombicola  
 <400> 1  
 atgctggctc tgttttttct gcttgccgct ctactttctc aagctctccc tttaggctat 60  
 actgctggccc ccgctgaatc attctatttt tggccagaga acatatccag cctccaagct 120  
 ggcgagattt ttagaaaacg ggaactctta actctcccag acatctttga ctttggccct 180  
 aatctggaaa aggtcgtaca agtggcttac aaaaccgctc tcaccgatgg caatgactcg 240  
 ttttccatcg ccagtatctt tatccctaag aatccaagcc cagaactcaa actttactct 300  
 tatcagacgt ttgaggatgc cgtgcagctt gattgtgccc caagctatgc tttagaagtg 360  
 ggtaacaagt ccagcaacta tcttctctgc actagcaatt tatctgccat cagtcgagaa 420  
 cttgagaaaag gacgtcactg cattatccct gatcacgagg gctatatttc aggattcttt 480  
 gcaggacggc agggaggata tgctggttta gacggaattc gcgctgctcg aaactatctc 540  
 aatggcacca acgagacccc aattggtatc ttcggataca gtggaggtgc acaagcaacg 600  
 gcctggattg ttgatttgca tgacgagtat gctcctgact tgaactttgt tggaacagtt 660  
 tctggaggca ctttggttga cgcttggggc acttttctagt atatcgacta tccgaagggtg 720  
 tatctaaagg gcagcattct tatcatgtat acgggtcttt tttcaggta tccagctcaa 780  
 tttgaggtga tttggccata tattgagcct gtaattcaag aaaacatgct actgctaogt 840  
 ttggcgcgga atgattgtaa ccaaagcccg atacttcaag gttacaacaa ttcaatcatg 900  
 gccggtatac atgtggacct tcccgaattc cctgcttcta agtacatatt ccagcacgag 960  
 tccctccttg ccaactacag cgtagtgcca gtttccacac cgaagtttcc tcgctacatg 1020  
 taccatggtg gatctgatga gttggccaaa ttgagccttg tcgagcagta tgttgatcaa 1080  
 caatggaata ccggcgctaa tctcaccttc gtggtgtatc cgggtcttct tcatgacgag 1140  
 acggcttacc gtggctttga tgccgcgatg gattggcttg atgccagct cgatagtgga 1200  
 15 taccttccac ctgtaaactc aactcataca tga 1233  
 <210> 2  
 < 211> 410  
 < 212> PRT  
 < 213> Candida bombicola

ES 2 673 124 T3

<400> 2

Met Leu Ala Leu Phe Phe Ser Leu Ala Pro Leu Leu Ser Gln Ala Leu  
 1 5 10 15

Pro Leu Gly Tyr Thr Ala Ala Pro Ala Glu Ser Phe Tyr Phe Trp Pro  
 20 25 30

Glu Asn Ile Ser Ser Leu Gln Ala Gly Glu Ile Phe Arg Lys Arg Glu  
 35 40 45

Leu Leu Thr Leu Pro Asp Ile Phe Asp Phe Gly Pro Asn Leu Glu Lys  
 50 55 60

Val Val Gln Val Ala Tyr Lys Thr Arg Leu Thr Asp Gly Asn Asp Ser  
 65 70 75 80

Phe Ser Ile Ala Ser Ile Phe Ile Pro Lys Asn Pro Ser Pro Glu Leu  
 85 90 95

Lys Leu Tyr Ser Tyr Gln Thr Phe Glu Asp Ala Val Gln Leu Asp Cys  
 100 105 110

Ala Pro Ser Tyr Ala Leu Glu Val Gly Asn Lys Ser Ser Asn Tyr Leu  
 115 120 125

Pro Val Thr Ser Asn Leu Ser Ala Ile Ser Arg Glu Leu Glu Lys Gly  
 130 135 140

Arg His Cys Ile Ile Pro Asp His Glu Gly Tyr Ile Ser Gly Phe Phe  
 145 150 155 160

Ala Gly Arg Gln Glu Gly Tyr Ala Gly Leu Asp Gly Ile Arg Ala Ala  
 165 170 175

Arg Asn Tyr Leu Asn Gly Thr Asn Glu Thr Pro Ile Gly Ile Phe Gly  
 180 185 190

Tyr Ser Gly Gly Ala Gln Ala Thr Ala Trp Ile Val Asp Leu His Asp  
 195 200 205

Glu Tyr Ala Pro Asp Leu Asn Phe Val Gly Thr Val Ser Gly Gly Thr  
 210 215 220

ES 2 673 124 T3

Leu Val Asp Ala Trp Gly Thr Phe Gln Tyr Ile Asp Tyr Pro Lys Val  
 225 230 235 240

Tyr Leu Lys Gly Ser Ile Leu Ile Met Tyr Thr Gly Leu Phe Ser Gly  
 245 250 255

Tyr Pro Ala Gln Phe Glu Val Ile Trp Pro Tyr Ile Glu Pro Val Ile  
 260 265 270

Gln Glu Asn Met Leu Leu Leu Arg Leu Ala Pro Asn Asp Cys Asn Gln  
 275 280 285

Ser Pro Ile Leu Gln Gly Tyr Asn Asn Ser Ile Met Ala Gly Ile His  
 290 295 300

Val Asp Leu Pro Glu Phe Pro Ala Ser Lys Tyr Ile Phe Gln His Glu  
 305 310 315 320

Ser Leu Leu Ala Asn Tyr Ser Val Val Pro Val Ser Thr Pro Lys Phe  
 325 330 335

Pro Arg Tyr Met Tyr His Gly Gly Ser Asp Glu Leu Ala Lys Leu Ser  
 340 345 350

Leu Val Glu Gln Tyr Val Asp Gln Gln Trp Asn Thr Gly Ala Asn Leu  
 355 360 365

Thr Phe Val Val Tyr Pro Gly Leu Leu His Asp Glu Thr Ala Tyr Arg  
 370 375 380

Gly Phe Asp Ala Ala Met Asp Trp Leu Asp Ala Gln Leu Asp Ser Gly  
 385 390 395 400

Tyr Leu Pro Pro Val Asn Ser Thr His Thr  
 405 410

<210> 3  
 < 211> 22  
 < 212> ADN  
 < 213> Secuencia artificial

5

<220>  
 < 223> Cebador

<400> 3  
 cagcgctggg attcatctgc tc

10

22

<210> 4  
 < 211> 22  
 < 212> ADN  
 < 213> Secuencia artificial

15

<220>  
 < 223> Cebador

<400> 4  
 gctaagcagc cttgggagtt tc

22

# ES 2 673 124 T3

	<210> 5 < 211> 30 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial	
5	<220> < 223> Cebador	
	<400> 5 tacaattggc ctataaggct aaagaaagta	30
10	<210> 6 < 211> 30 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial	
	<220> < 223> Cebador	
15	<400> 6 atggcgccga tgccgaggaa ctgtcattgc	30
20	<210> 7 < 211> 20 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial	
	<220> < 223> Cebador	
25	<400> 7 cagacgcatt ggctgccttc	20
30	<210> 8 < 211> 24 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador	
35	<400> 8 actgcatca tgggtcaacc tcac	24
40	<210> 9 < 211> 20 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial	
	<220> < 223> Cebador	
45	<400> 9 tactgctctg ccgatcgttg	20
50	<210> 10 < 211> 25 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial	
	<220> < 223> Cebador	
	<400> 10 taaagaaacg aagggccag cagtc	25
50	<210> 11 < 211> 20	

ES 2 673 124 T3

	< 212> ADN < 213> Secuencia artificial	
	<220> < 223> Cebador	
5	<400> 11 agaacaaggc cgagtatgc	20
	<210> 12 < 211> 22 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial	
10	<220> < 223> Cebador	
	<400> 12 gtcagattag cctccgacat ag	22
15	<210> 13 < 211> 33 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial	
	<220> < 223> Cebador	
20	<400> 13 ctggcaaatc actaggtgct tagggcgcgt gtc	33
	<210> 14 < 211> 48 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial	
25	<220> < 223> Cebador	
	<400> 14 gaaaaaaaca gagccagcat ttttctggt ttggaggacc ttgggtag	48
	<210> 15 < 211> 41 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial	
35	<220> < 223> Cebador	
	<400> 15 gtcctccaa accagaaaa atgctggctc tgtttttc g	41
40	<210> 16 < 211> 44 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial	
	<220> < 223> Cebador	
45	<400> 16 tgccctgagg ggcctctcac tctaagaaat cctccgagga aatc	44
	<210> 17 < 211> 121 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial	
50		

ES 2 673 124 T3

<220>  
 < 223> Cebador

<400> 17  
 cagcactggc cgatacccaa agtatataat ggcgccgttga acggttatag tcgggtcaagc 60  
 tcttaaagaa agacttaaca acaaaaacaa ctctacacaa atgctggctc tgtttttttc 120  
 g 121

5 <210> 18  
 < 211> 117  
 < 212> ADN  
 < 213> Secuencia artificial

10 <220>  
 < 223> Cebador

<400> 18  
 cattgcaggg tgtgcgtcta cgatataaca cgatcgacat cgcgctgggt atgcttctgg 60  
 gtaaggggtc gcaacgtgtg agttgtcagc actggccgat acccaaagta tataatg 117

15 <210> 19  
 < 211> 116  
 < 212> ADN  
 < 213> Secuencia artificial

<220>  
 < 223> Cebador

<400> 19  
 acaagttttt aacatggggtt ttgatttata ttgttttata tgagcgctc acatatgcbc 60  
 tgacagccta ttaggagaaa ttcatgtatg agttgagttt acaggtgaa ggtatc 116

20 <210> 20  
 < 211> 120  
 < 212> ADN  
 < 213> Secuencia artificial

25 <220>  
 < 223> Cebador

<400> 20  
 gactttggtc gatatgacga gaatcaggca ataatagctt aagctgaagt gtttttagat 60  
 ttagttcggg gtgcgcttct caaaagtgct gggatcaaca agtttttaac atgggttttg 120

30 <210> 21  
 < 211> 9  
 < 212> PRT  
 < 213> Candida bombicola

<400> 21  
 Lys Asn Pro Ser Pro Glu Leu Lys Leu  
 1 5

35 <210> 22  
 < 211> 9  
 < 212> PRT  
 < 213> Candida bombicola

<400> 22  
 Lys Val Val Gln Val Ala Tyr Lys Thr  
 1 5

40

ES 2 673 124 T3

<210> 23  
 < 211> 13  
 < 212> PRT  
 < 213> Candida bombicola  
 5 <400> 23  
 Arg Glu Glu Gly Tyr Ala Gly Leu Asp Gly Ile Arg Ala  
 1 5 10  
 <210> 24  
 < 211> 14  
 < 212> PRT  
 10 < 213> Candida bombicola  
 <400> 24  
 Arg Tyr Met Tyr His Gly Gly Ser Asp Glu Leu Ala Lys Leu  
 1 5 10  
 <210> 25  
 < 211> 14  
 < 212> PRT  
 15 < 213> Candida bombicola  
 <400> 25  
 Arg Tyr Met Tyr His Gly Gly Ser Asp Glu Leu Ala Lys Leu  
 1 5 10  
 <210> 26  
 < 211> 19  
 < 212> PRT  
 20 < 213> Candida bombicola  
 <400> 26  
 Arg Glu Leu Leu Thr Leu Pro Asp Ile Phe Asp Phe Gly Pro Asn Leu  
 1 5 10 15  
 Glu Lys Val  
 25 <210> 27  
 < 211> 19  
 < 212> PRT  
 < 213> Candida bombicola  
 <400> 27  
 Arg Glu Leu Leu Thr Leu Pro Asp Ile Phe Asp Phe Gly Pro Asn Leu  
 1 5 10 15  
 Glu Lys Val  
 30 <210> 28  
 < 211> 20  
 < 212> PRT  
 < 213> Candida bombicola  
 35 <400> 28  
 Lys Arg Glu Leu Leu Thr Leu Pro Asp Ile Phe Asp Phe Gly Pro Asn  
 1 5 10 15  
 Leu Glu Lys Val  
 20  
 <210> 29  
 < 211> 21  
 < 212> PRT  
 40 < 213> Candida bombicola

ES 2 673 124 T3

<400> 29  
 Arg Lys Arg Glu Leu Leu Thr Leu Pro Asp Ile Phe Asp Phe Gly Pro  
 1 5 10 15

Asn Leu Glu Lys Val  
 20

5  
 <210> 30  
 < 211> 27  
 < 212> ADN  
 < 213> Secuencia artificial

<220>  
 < 223> Cebador

10  
 <400> 30  
 cccgcggatg ctggctctgt tttttc

27

<210> 31  
 < 211> 39  
 < 212> ADN  
 < 213> Secuencia artificial

15  
 <220>  
 < 223> Cebador

<400> 31  
 ttctagatgt atgagttgag ttacaggtg gaaggtatc

39

20  
 <210> 32  
 < 211> 1218  
 < 212> ADN  
 < 213> Candida bombicola

<400> 32  
 gcaggaactcc ctttaggcta tactgcggcc cccgctgaat cattctattt ttggccagag 60  
 aacatatcca gcctccaagc tggcgagatt tttagaaaac gggaactctt aactctcca 120  
 gacatctttg actttggccc taatctggaa aaggtcgtac aagtggctta caaaaccogt 180  
 ctcaccgatg gcaatgactc gttttccatc gccagtatct ttatccctaa gaatccaagc 240  
 ccagaactca aactttactc ttatcagacg tttgaggatg ccgtgcagct tgattgtgcc 300  
 ccaagctatg ctttagaagt gggtaacaag tccagcaact atcttcctgt cactagcaat 360  
 ttatctgcca tcagtcgaga acttgagaaa ggacgtcact gcattatccc tgatcacgag 420  
 ggctatattt caggattctt tgcaggacgg caggagggat atgctggttt agacggaatt 480  
 cgcgctgctc gaaactatct caatggcacc aacgagacct caattggtat cttcggatac 540  
 agtggaggtg cacaagcaac ggcctggatt gttgatttgc atgacgagta tgctcctgac 600  
 ttgaactttg ttggaacagt ttctggaggc actttggttg acgcttgggg cacttttcag 660

ES 2 673 124 T3

tatatcgact atccgaaggt gtatctaaag ggcagcattc ttatcatgta tacgggtott 720  
 ttttcaggtt atccagctca atttgaggtg atttggccat atattgagcc tgtaattcaa 780  
 gaaaacatgc tactgctacg tttggcgccg aatgattgta accaaagccc gatacttcaa 840  
 gggtacaaca attcaatcat ggccggtata catgtggacc ttcccgaatt ccctgcttct 900  
 aagtacatat tccagcacga gtcctcctt gccaaactaca gcgtagtgcc agtttccaca 960  
 ccgaagtttc ctgctacat gtaccatggt ggatctgatg agttggccaa attgagcctt 1020  
 gtcgagcagt atgttgatca acaatggaat accggcgcta atctcacctt cgtggtgtat 1080  
 ccgggtcttc ttcagcacga gacggcttac cgtggctttg atgcccgcat ggattggctt 1140  
 gatgcccagc tcgatagtgg ataccttcca cctgtaaact caactcatac agtcgaccat 1200  
 catcaccatc accactag 1218

<210> 33  
 <211> 405  
 <212> PRT  
 <213> Candida bombicola

5

<400> 33  
 Ala Gly Leu Pro Leu Gly Tyr Thr Ala Ala Pro Ala Glu Ser Phe Tyr  
 1 5 10 15  
 Phe Trp Pro Glu Asn Ile Ser Ser Leu Gln Ala Gly Glu Ile Phe Arg  
 20 25 30  
 Lys Arg Glu Leu Leu Thr Leu Pro Asp Ile Phe Asp Phe Gly Pro Asn  
 35 40 45  
 Leu Glu Lys Val Val Gln Val Ala Tyr Lys Thr Arg Leu Thr Asp Gly  
 50 55 60  
 Asn Asp Ser Phe Ser Ile Ala Ser Ile Phe Ile Pro Lys Asn Pro Ser  
 65 70 75 80  
 Pro Glu Leu Lys Leu Tyr Ser Tyr Gln Thr Phe Glu Asp Ala Val Gln  
 85 90 95  
 Leu Asp Cys Ala Pro Ser Tyr Ala Leu Glu Val Gly Asn Lys Ser Ser  
 100 105 110  
 Asn Tyr Leu Pro Val Thr Ser Asn Leu Ser Ala Ile Ser Arg Glu Leu  
 115 120 125  
 Glu Lys Gly Arg His Cys Ile Ile Pro Asp His Glu Gly Tyr Ile Ser  
 130 135 140

ES 2 673 124 T3

Gly Phe Phe Ala Gly Arg Gln Glu Gly Tyr Ala Gly Leu Asp Gly Ile  
 145 150 155 160

Arg Ala Ala Arg Asn Tyr Leu Asn Gly Thr Asn Glu Thr Pro Ile Gly  
 165 170 175

Ile Phe Gly Tyr Ser Gly Gly Ala Gln Ala Thr Ala Trp Ile Val Asp  
 180 185 190

Leu Tyr Asp Glu Tyr Ala Pro Asp Leu Asn Phe Val Gly Thr Val Ser  
 195 200 205

Gly Gly Thr Leu Val Asp Ala Trp Gly Thr Phe Gln Tyr Ile Asp Tyr  
 210 215 220

Pro Lys Val Tyr Leu Lys Gly Ser Ile Leu Ile Met Tyr Thr Gly Leu  
 225 230 235 240

Phe Ser Gly Tyr Pro Ala Gln Phe Glu Val Ile Trp Pro Tyr Ile Glu  
 245 250 255

Pro Val Ile Gln Glu Asn Met Leu Leu Leu Arg Leu Ala Pro Asn Asp  
 260 265 270

Cys Asn Gln Ser Pro Ile Leu Gln Gly Tyr Asn Asn Ser Ile Met Ala  
 275 280 285

Gly Ile His Val Asp Leu Pro Glu Phe Pro Ala Ser Lys Tyr Ile Phe  
 290 295 300

Gln His Glu Ser Leu Leu Ala Asn Tyr Ser Val Val Pro Val Ser Thr  
 305 310 315 320

Pro Lys Phe Pro Arg Tyr Met Tyr His Gly Gly Ser Asp Glu Leu Ala  
 325 330 335

Lys Leu Ser Leu Val Glu Gln Tyr Val Asp Gln Gln Trp Asn Thr Gly  
 340 345 350

Ala Asn Leu Thr Phe Val Val Tyr Pro Gly Leu Leu His Asp Glu Thr  
 355 360 365

Ala Tyr Arg Gly Phe Asp Ala Ala Met Asp Trp Leu Asp Ala Gln Leu  
 370 375 380

Asp Ser Gly Tyr Leu Pro Pro Val Asn Ser Thr His Thr Val Asp His  
 385 390 395 400

His His His His His  
 405

<210> 34  
 <211> 20

ES 2 673 124 T3

	< 212> ADN < 213> Secuencia artificial	
	<220> < 223> Cebador	
5	<400> 34 ccatactcaa gcgcaaac	20
	<210> 35 < 211> 26 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial	
10	<220> < 223> Cebador	
	<400> 35 gagctcaaga cgcgtttact caatgc	26
15	<210> 36 < 211> 21 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial	
	<220> < 223> Cebador	
20	<400> 36 cgtcgactgt atgagttgag t	21
	<210> 37 < 211> 22 < 212> ADN < 213> Secuencia artificial	
25	<220> < 223> Cebador	
	<400> 37 gctgcaggac tcccttagg cc	22
30	<210> 38 < 211> 12 < 212> PRT < 213> Candida bombicola	
35	<400> 38 Ala Gly Leu Pro Leu Gly Tyr Thr Ala Ala Pro Ala	
	1                      5                      10	
40	<210> 39 < 211> 11 < 212> PRT < 213> Candida bombicola	
	<400> 39 Lys Val Val Gln Val Ala Tyr Lys Thr Arg Leu	
	1                      5                      10	
45	<210> 40 < 211> 16 < 212> PRT < 213> Candida bombicola	

ES 2 673 124 T3

<400> 40  
 Arg Gln Glu Gly Tyr Ala Gly Leu Asp Gly Ile Arg Ala Ala Arg Asn  
 1 5 10 15  
  
 <210> 41  
 < 211> 18  
 < 212> PRT  
 < 213> Candida bombicola  
  
 <400> 41  
 Lys Ser Ser Asn Tyr Leu Pro Val Thr Ser Asn Leu Ser Ala Ile Ser  
 1 5 10 15  
  
 Arg Glu  
  
 <210> 42  
 < 211> 19  
 < 212> PRT  
 < 213> Candida bombicola  
  
 <400> 42  
 Arg Leu Thr Asp Gly Asn Asp Ser Phe Ser Ile Ala Ser Ile Phe Ile  
 1 5 10 15  
  
 Pro Lys Asn  
  
 <210> 43  
 < 211> 20  
 < 212> PRT  
 < 213> Candida bombicola  
  
 <400> 43  
 Arg His Cys Ile Ile Pro Asp His Glu Gly Tyr Ile Ser Gly Phe Phe  
 1 5 10 15  
  
 Ala Gly Arg Gln  
 20  
  
 <210> 44  
 < 211> 6  
 < 212> PRT  
 < 213> Candida bombicola  
  
 <400> 44  
 Gly Tyr Ser Gly Gly Ala  
 1 5  
  
 <210> 45  
 < 211> 22  
 < 212> PRT  
 < 213> Candida bombicola  
  
 <400> 45  
 Lys Gly Arg His Cys Ile Ile Pro Asp His Glu Gly Tyr Ile Ser Gly  
 1 5 10 15  
  
 Phe Phe Ala Gly Arg Gln  
 20  
  
 <210> 46  
 < 211> 26  
 < 212> PRT  
 < 213> Candida bombicola

ES 2 673 124 T3

<400> 46

Arg Leu Thr Asp Gly Asn Asp Ser Phe Ser Ile Ala Ser Ile Phe Ile  
1 5 10 15

Pro Lys Asn Pro Ser Pro Glu Leu Lys Leu  
20 25

<210> 47

< 211> 26

< 212> PRT

< 213> Candida bombicola

<400> 47

Arg Glu Leu Leu Thr Leu Pro Asp Ile Phe Asp Phe Gly Pro Asn Leu  
1 5 10 15

Glu Lys Val Val Gln Val Ala Tyr Lys Thr  
20 25

<210> 48

< 211> 28

< 212> PRT

< 213> Candida bombicola

<400> 48

Lys Thr Arg Leu Thr Asp Gly Asn Asp Ser Phe Ser Ile Ala Ser Ile  
1 5 10 15

Phe Ile Pro Lys Asn Pro Ser Pro Glu Leu Lys Leu  
20 25

5

10

15

**REIVINDICACIONES**

1. Un polipéptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos proporcionada por la SEC ID N° 2 que tiene actividad de lactonasa, o un fragmento de este que conserva dicha actividad de lactonasa o una variante de este que tiene al menos 34 % de identidad de secuencia con la SEC ID N° 2 y que tiene dicha actividad de lactonasa.
- 5 2. Una variante según la reivindicación 1 que comprende una secuencia de aminoácidos proporcionada por la SEC ID N° 33.
3. Un fragmento o una variante según las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicho fragmento o variante comprende el aminoácido serina en la posición de aminoácido correspondiente a la posición 181 de la SEC ID N° 33.
4. Un ácido nucleico que codifica un polipéptido, fragmento o variante según las reivindicaciones 1-3.
- 10 5. Un ácido nucleico según la reivindicación 4, en donde dicho ácido nucleico consiste en la secuencia de ácido nucleico proporcionada por la SEC ID N° 1 o la SEC ID N° 32.
6. Un vector que comprende un ácido nucleico según las reivindicaciones 4-5.
7. Una célula hospedante que comprende un vector según la reivindicación 6.
- 15 8. Uso de un polipéptido, fragmento o variante según las reivindicaciones 1-3 para lactonizar o para polimerizar compuestos que contienen carbohidrato, lípidos, ácidos grasos, ácidos grasos hidroxilados, alcoholes, ácidos dicarboxílicos o mezclas de estos.
9. Uso según la reivindicación 8 en donde dichos compuestos que contienen carbohidrato son soforolípidos.
- 20 10. Un método para lactonizar o para polimerizar compuestos que contienen carbohidratos, lípidos, ácidos grasos, ácidos grasos hidroxilados, alcoholes, ácidos dicarboxílicos o mezclas de estos que comprende: a) proporcionar un polipéptido aislado, fragmento o variante, según las reivindicaciones 1-3, y b) poner en contacto dichos compuestos que contienen carbohidratos, lípidos, ácidos grasos, ácidos grasos hidroxilados, alcoholes, ácidos dicarboxílicos o mezclas de estos con dicho polipéptido aislado, fragmento o variante, según las reivindicaciones 1-3.
11. Una célula hospedante modificada que se transforma con un ácido nucleico exógeno según las reivindicaciones 4-5.
- 25 12. Uso de una célula hospedante modificada según la reivindicación 11 para producir soforolípidos o para producir al menos 50 % de soforolípidos lactónicos de la producción de soforolípidos total.
13. Uso de una célula hospedante modificada según la reivindicación 12 para producir al menos 50 % de soforolípidos lactónicos en un medio que carece de citrato.
- 30 14. Una célula hospedante modificada que comprende un ácido nucleico, según las reivindicaciones 4-5, que ha perdido su capacidad de codificar un polipéptido, fragmento o variante, según las reivindicaciones 1-3, o en donde dicho polipéptido, fragmento o variante, según las reivindicaciones 1-3, ha perdido su actividad de lactonasa.
15. Uso de una célula hospedante modificada según la reivindicación 14 para producir soforolípidos ácidos.

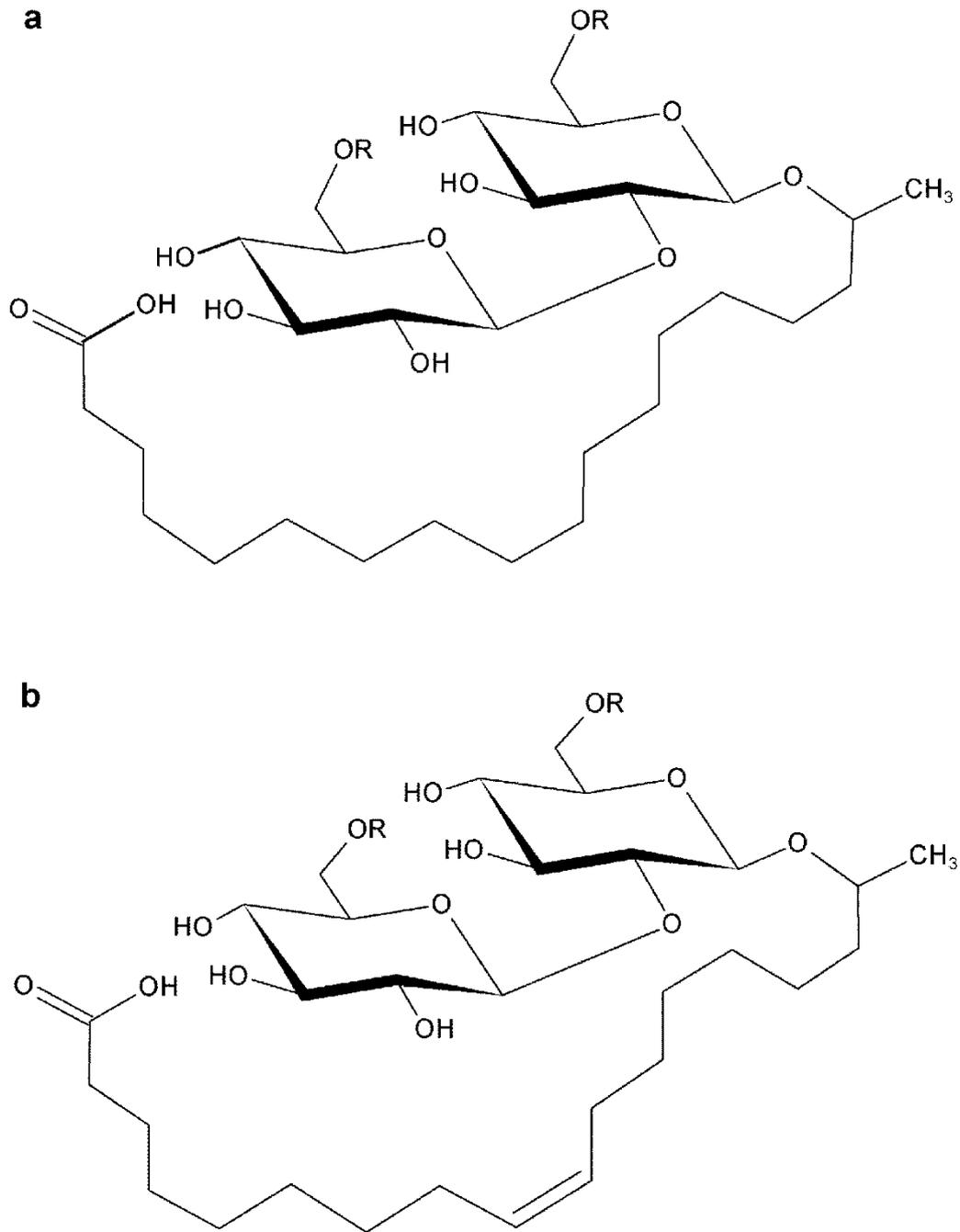


Fig 1

Se considera que los soforolípidos son una mezcla de compuestos representados por las fórmulas (a) forma ácida o (b) forma lactónica

$R_2 = -H$  o  $-C(O)CH_3$

$R_3 =$  cadena de hidrocarburo saturada o insaturada con  $m$  átomos de carbono

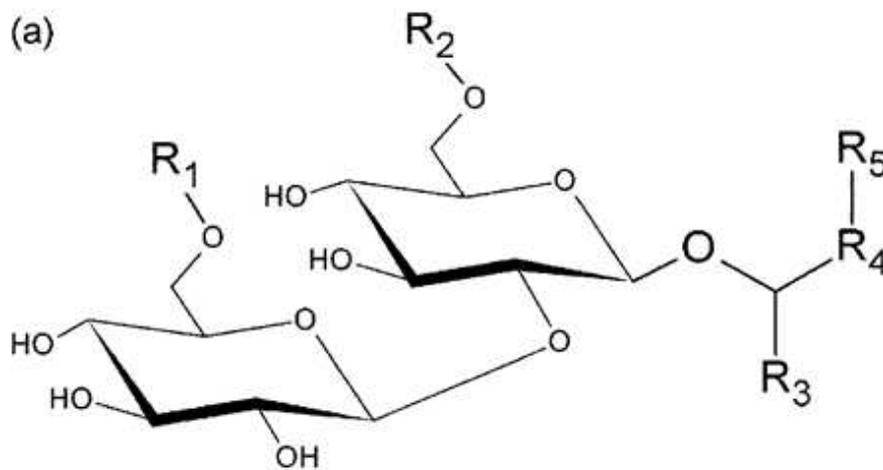
$R_4 =$  cadena de hidrocarburo saturada o insaturada con  $n$  átomos de carbono

$R_5 = -COOH$ ,  $-CH_2(R_6)$  o  $-CH(R_6)CH_3$

$R_6 = -H$ ,  $-OH$  o  $OR_7$

en los que  $(m+n) > 1$  y  $< 26$  y  $m$  y  $n$  son independientemente entre sí  $\geq 0$  y  $< 26$

(a)



$R_7 =$

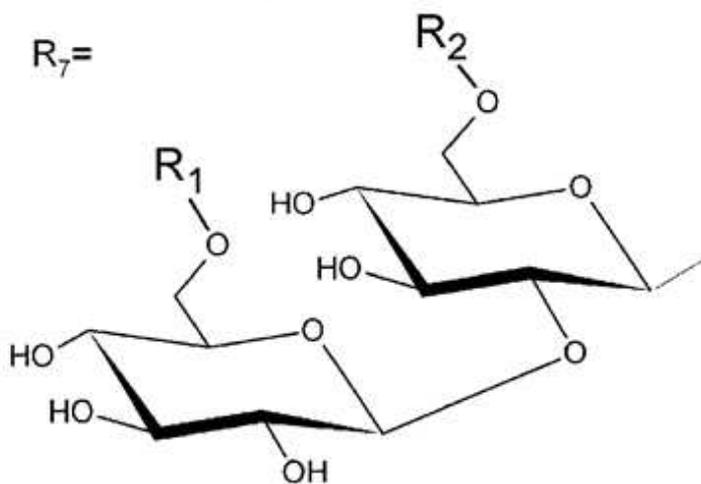


Fig 2a

(b)

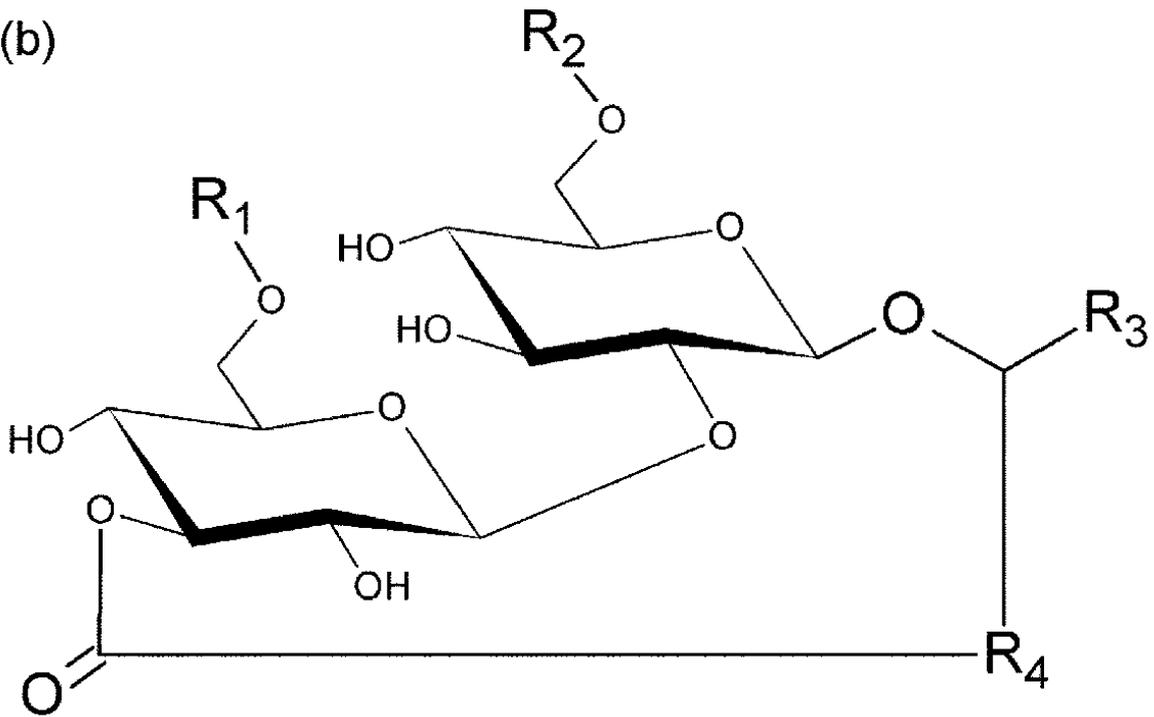


Fig2b

SEC ID N° 29

1 MLALFFSLAP LLSQALPLGY TAAPAESFYF WPENISSLQA GEIFR**KRELL**  
 SEC ID N° 28

51 **TLPDIFDFGP NLEKVVQVAY** KTRLTDGNDS FSIASIFIPK **NPSPELKLYS**  
 SEC ID N° 26-27 SEC ID N° 22 SEC ID N° 21

101 YQTFEDAVQL DCAPSYALEV GNKSSNYLPV TSNLSAISRE LEKGRHCIIP

151 DHEGYISGFF AGR**QEGYAGL** DGIRAARNYL NGTNETPIGI FGYSGGAQAT  
 SEC ID N° 23

201 AWIVDLHDEY APDLNFVGTV SGGTLVDAWG TFQYIDYPKV YLKGSIIMY

251 TGLFSGYPAQ FEVIWPYIEP VIQENMLLLR LAPNDCNQSP ILQGYNNSIM

301 AGIHVDLPEF PASKYIFQHE SLLANYSVVP VSTPKFPR**YM YHGGSEDELA**  
 SEC ID N° 24-25

351 LSLVEQYVDQ QWNTGANLTF VVYPGLLHDE TAYRGFDAAM DWLDAQLD SG

401 YLPPVNSTHT (SEC ID N° 2)

Fig 3

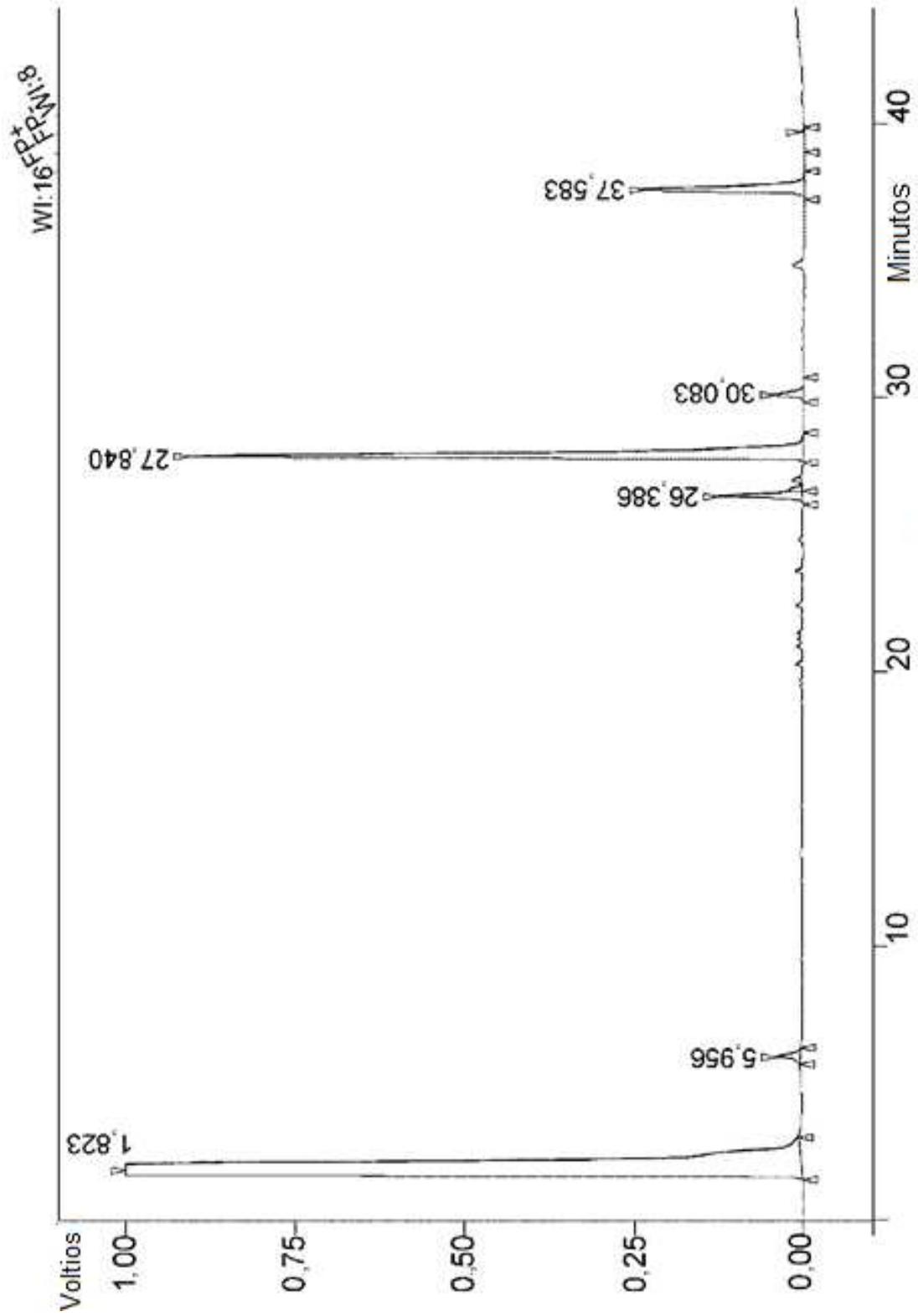


Fig 4 (parte superior)

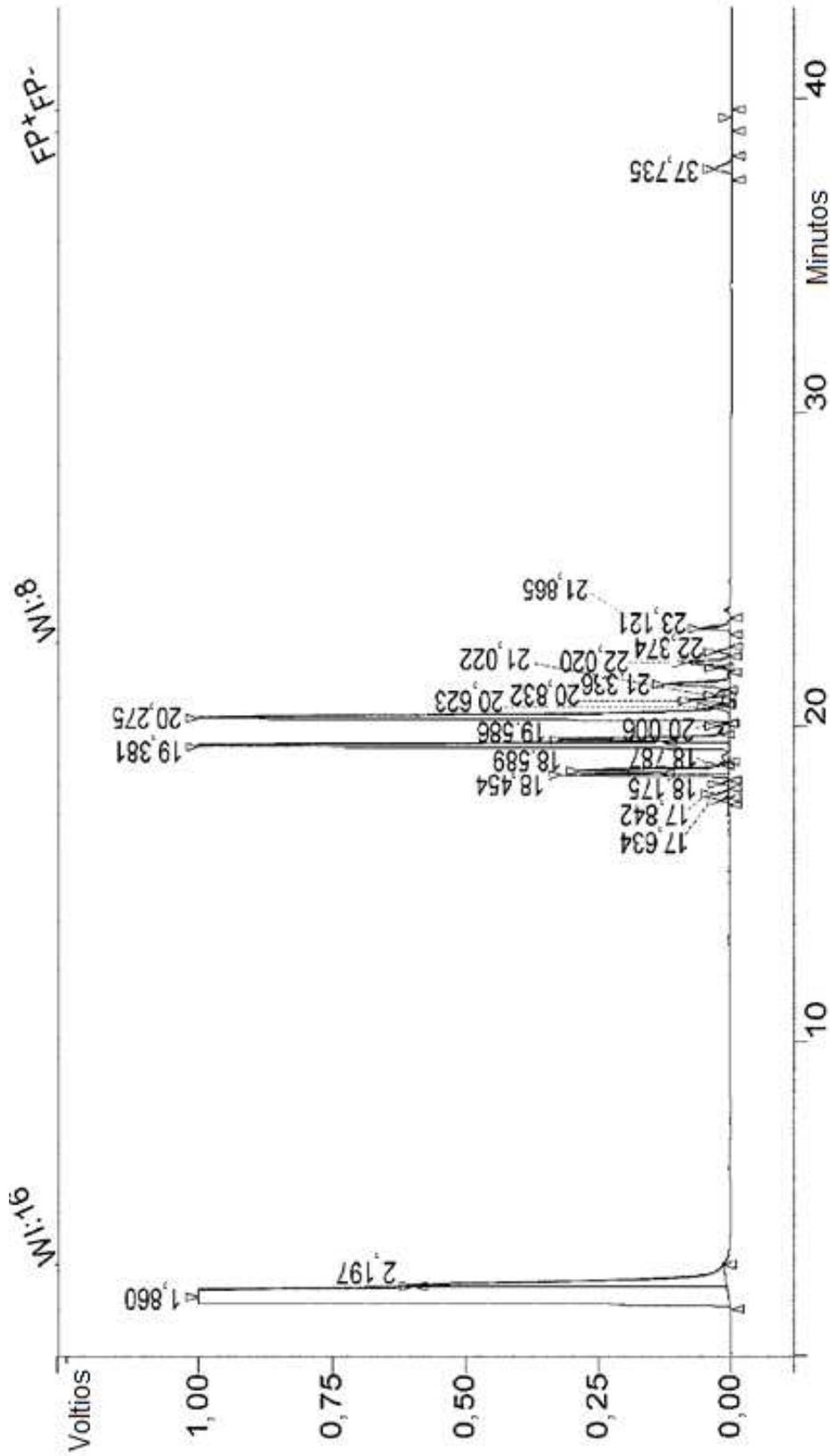


Fig 4 (parte inferior)

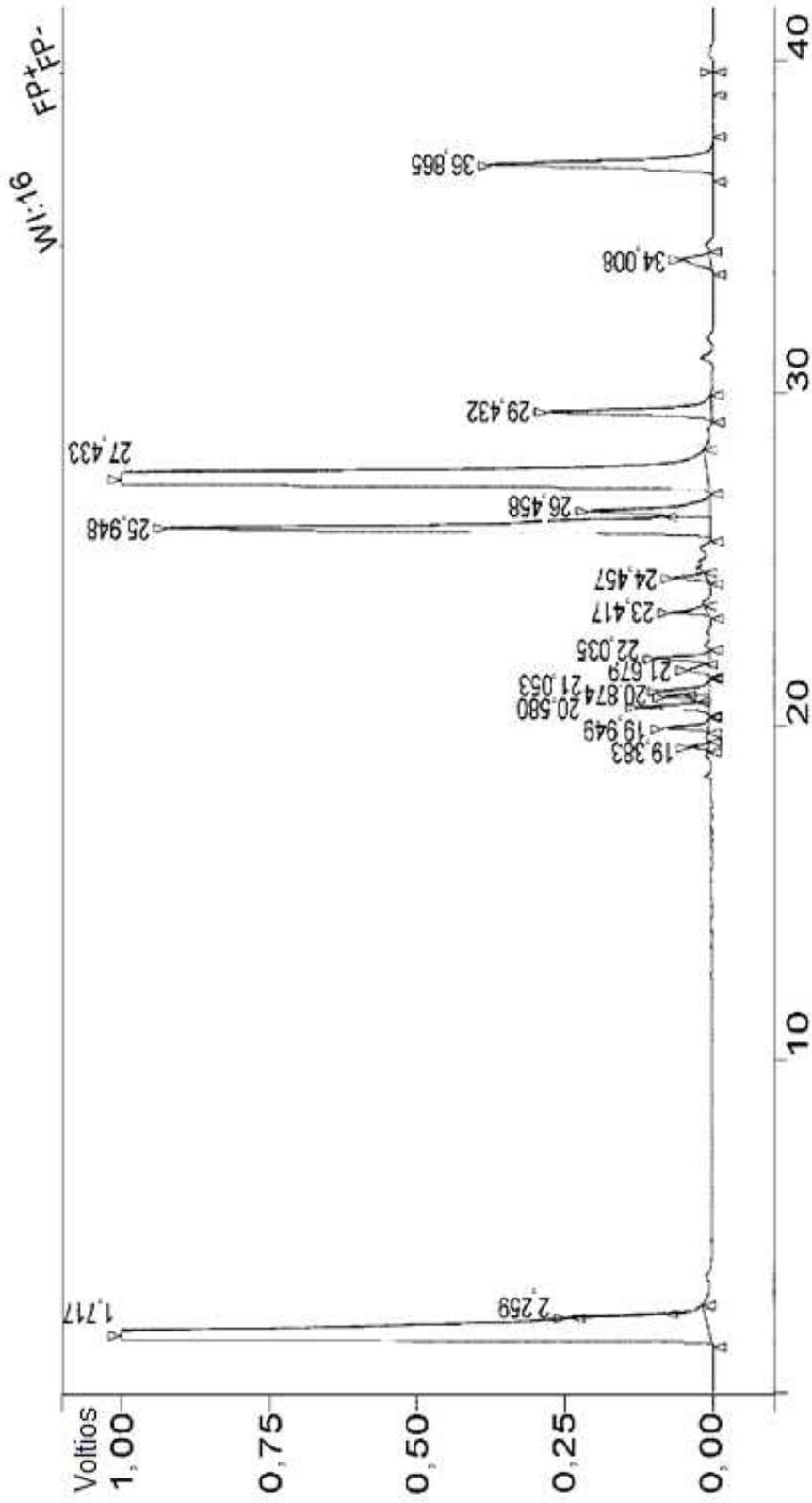


Fig 5 (parte superior)

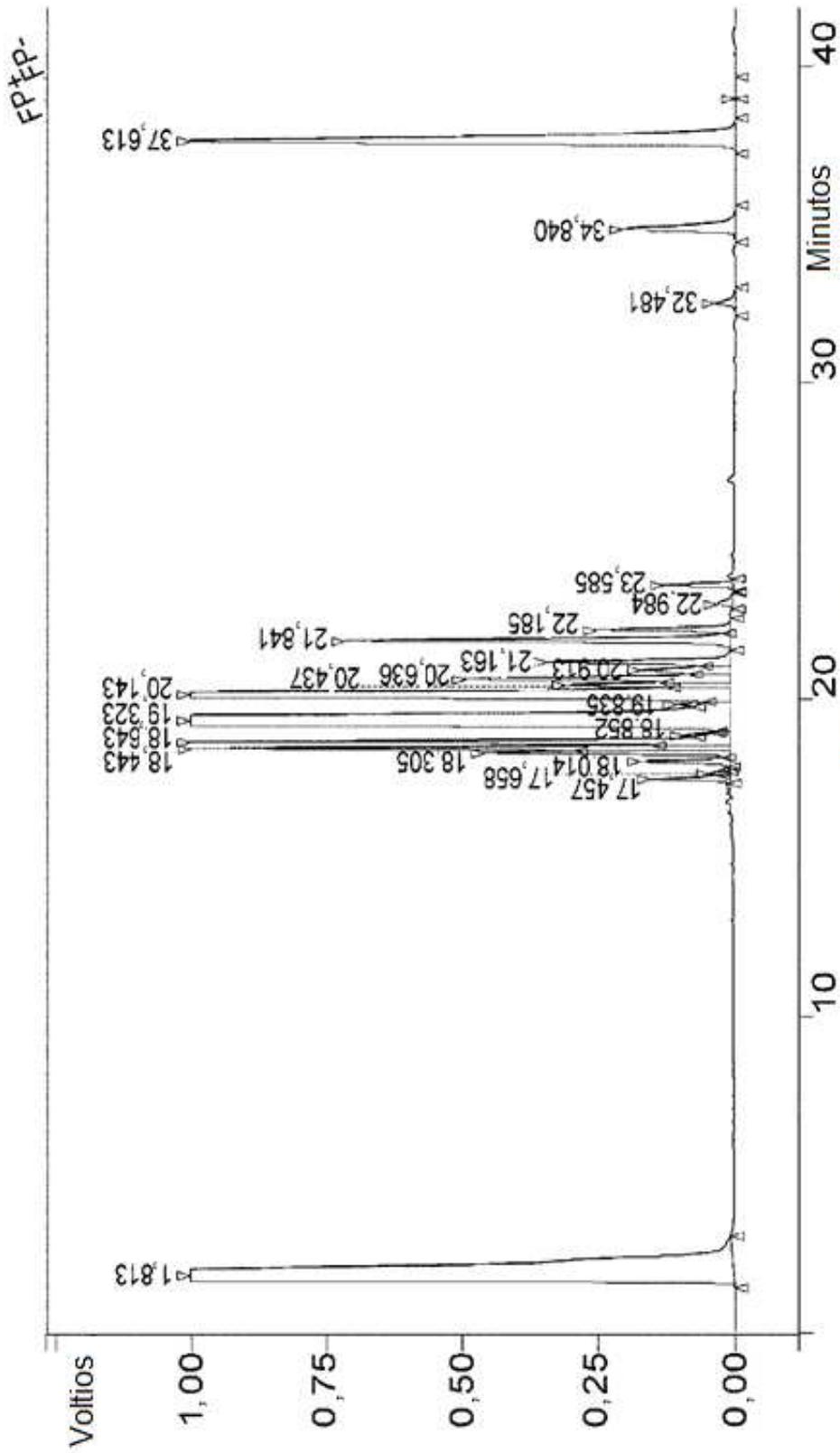


Fig 5 (parte inferior)

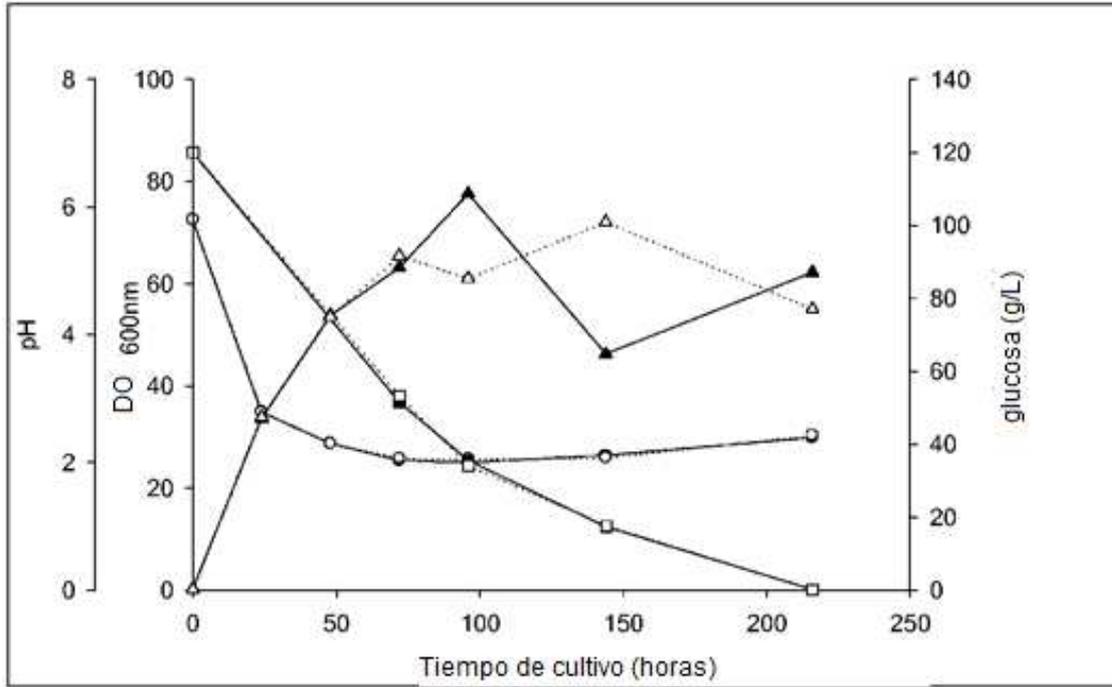


Fig 6

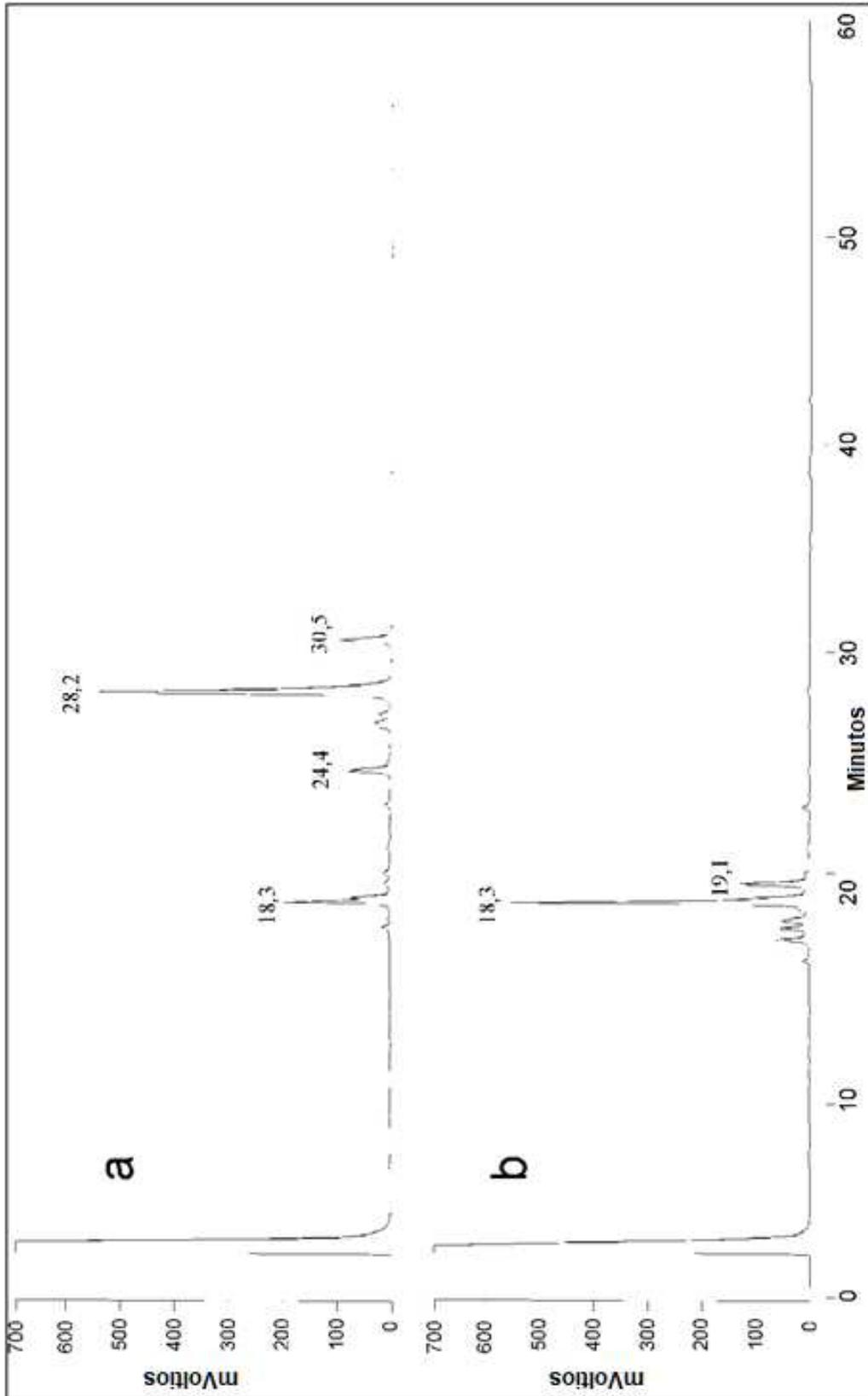


Fig 7

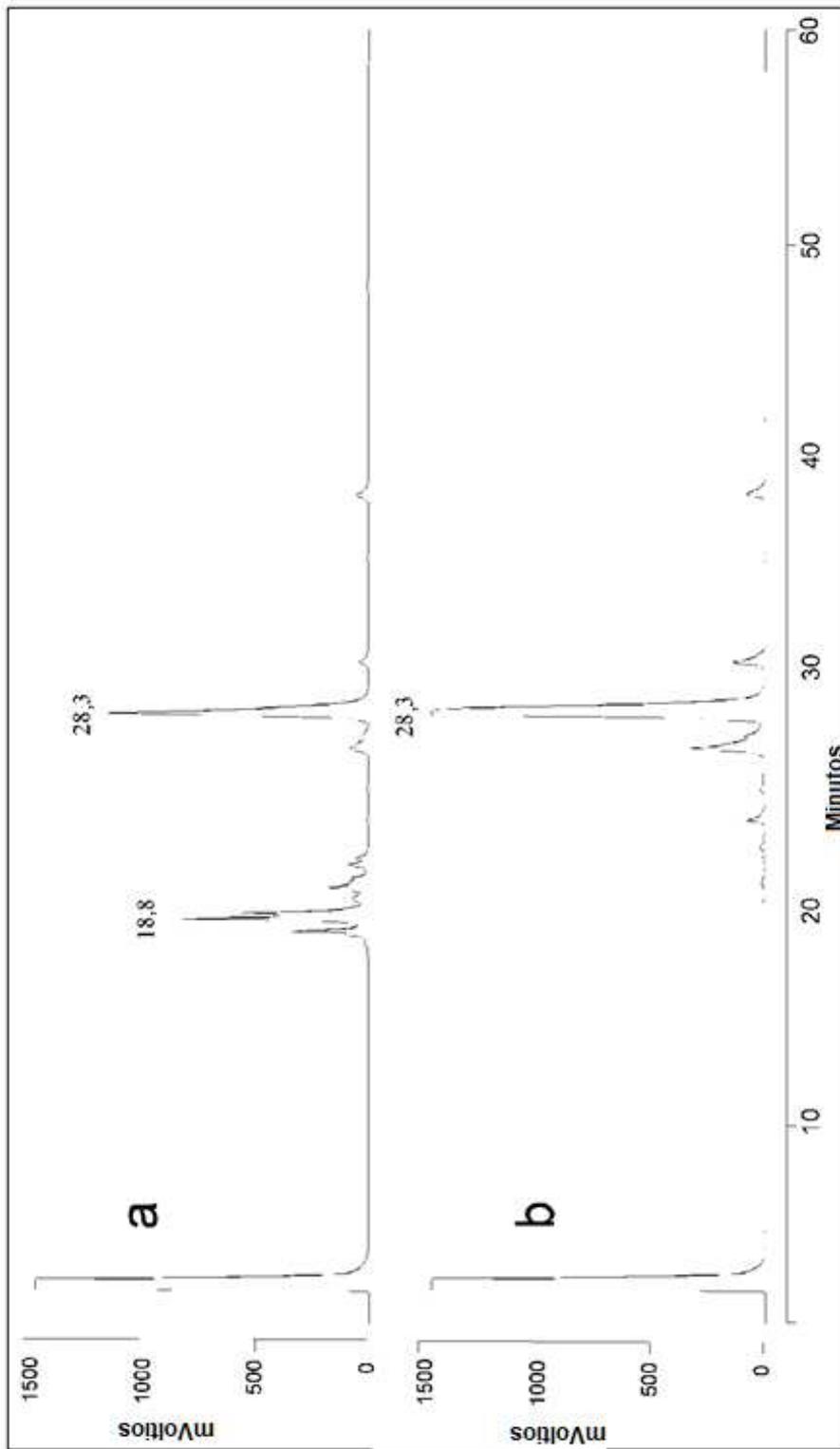
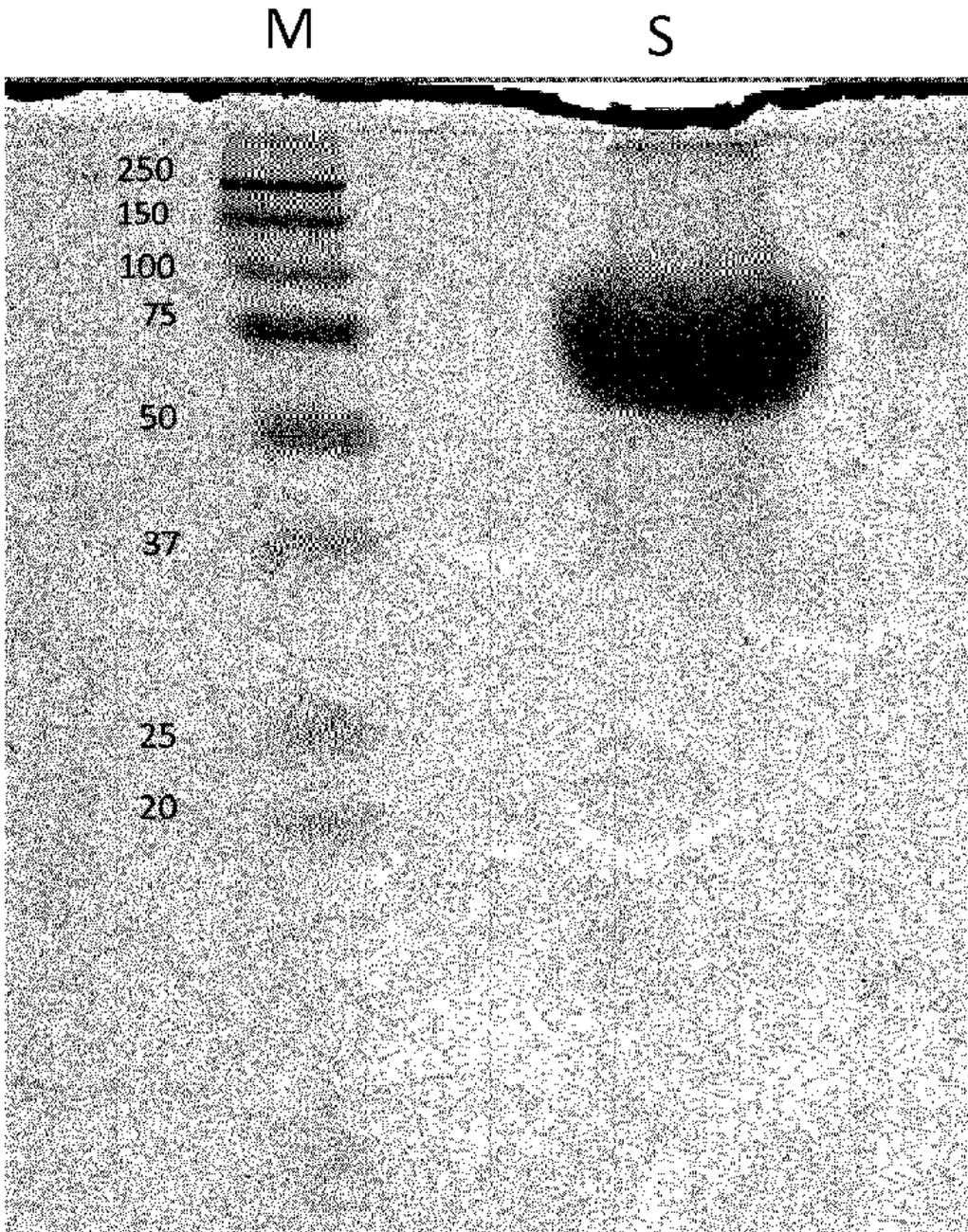


Fig 8



**Fig 9**

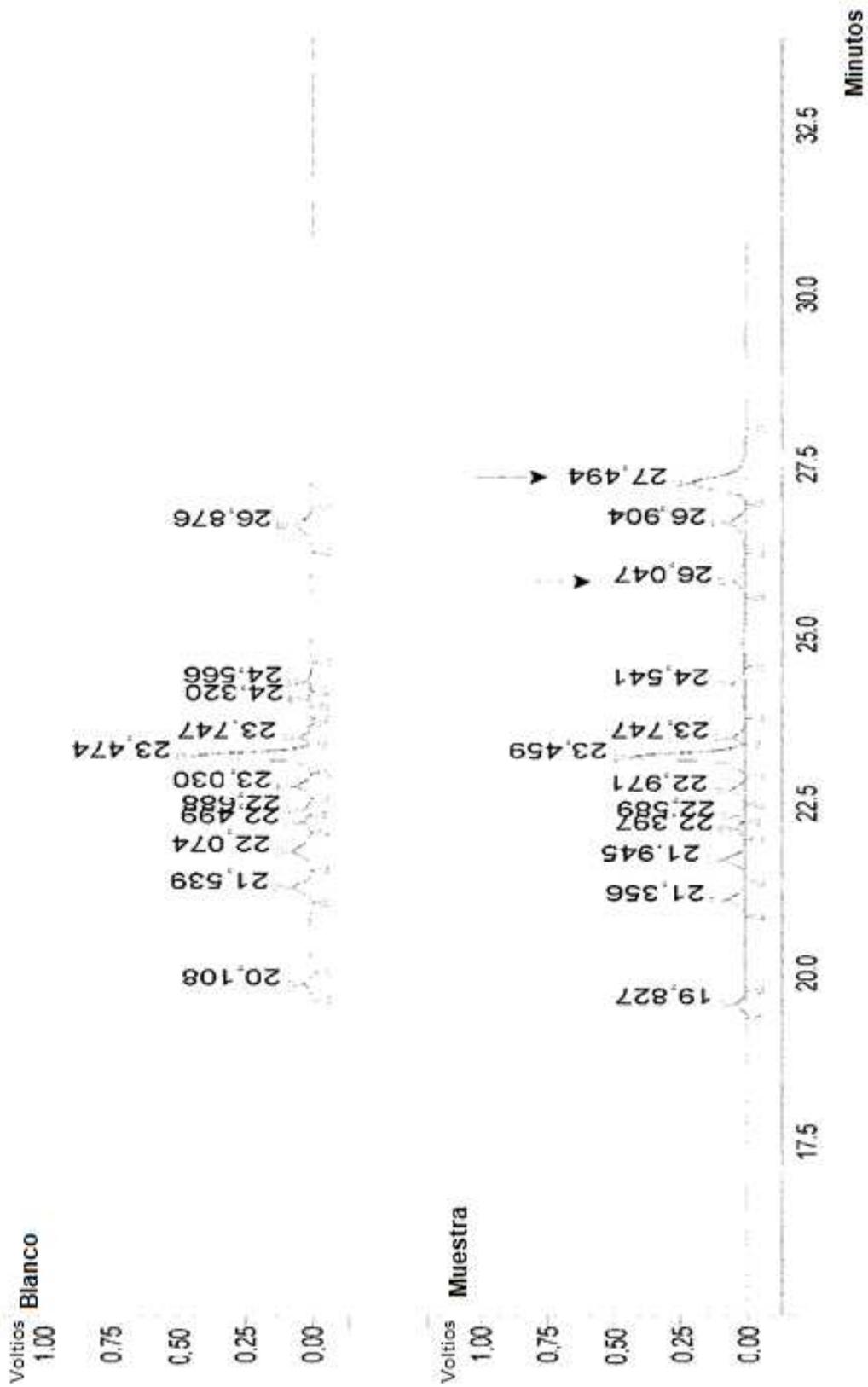


Fig 10

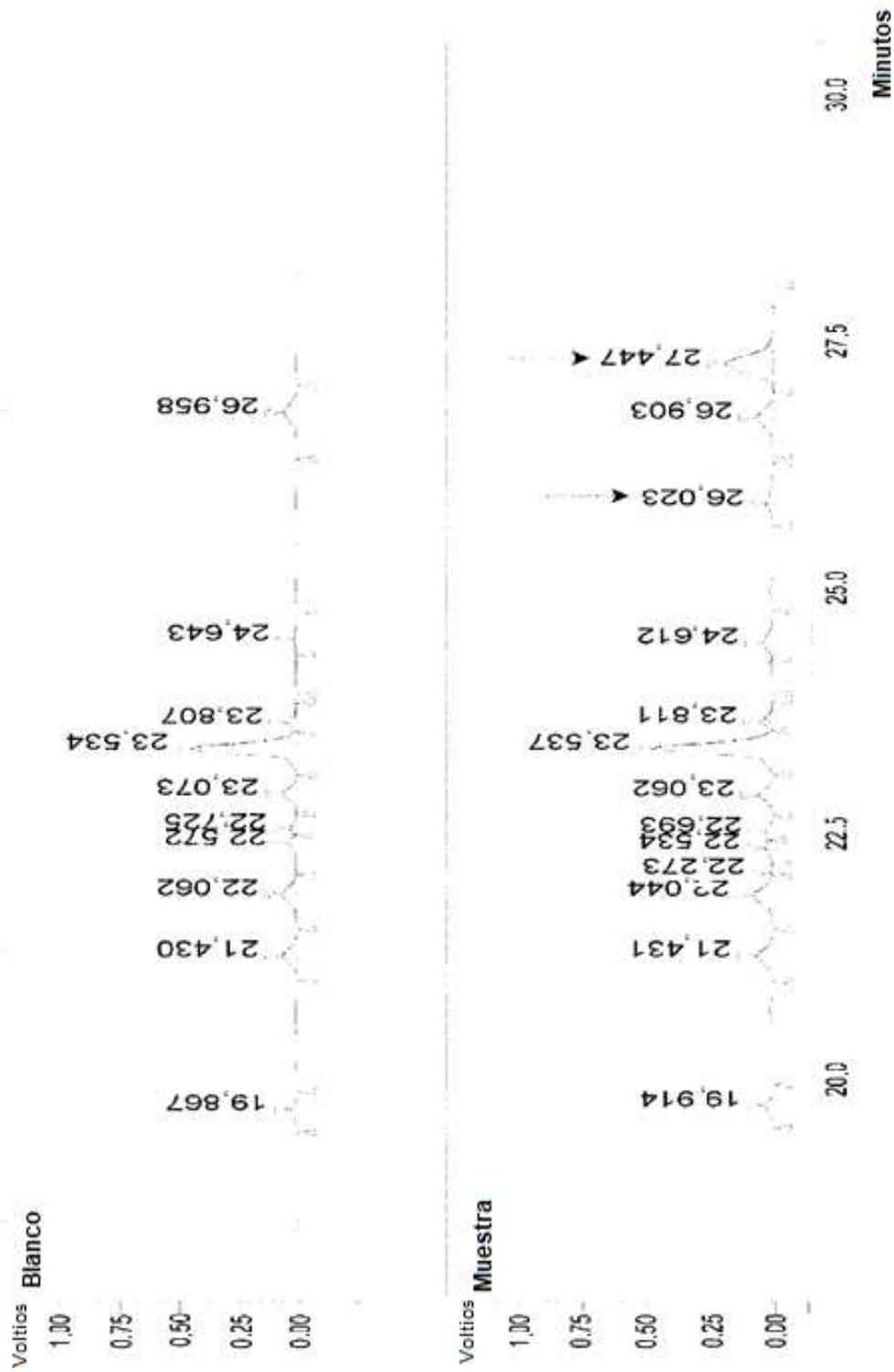


Fig 11

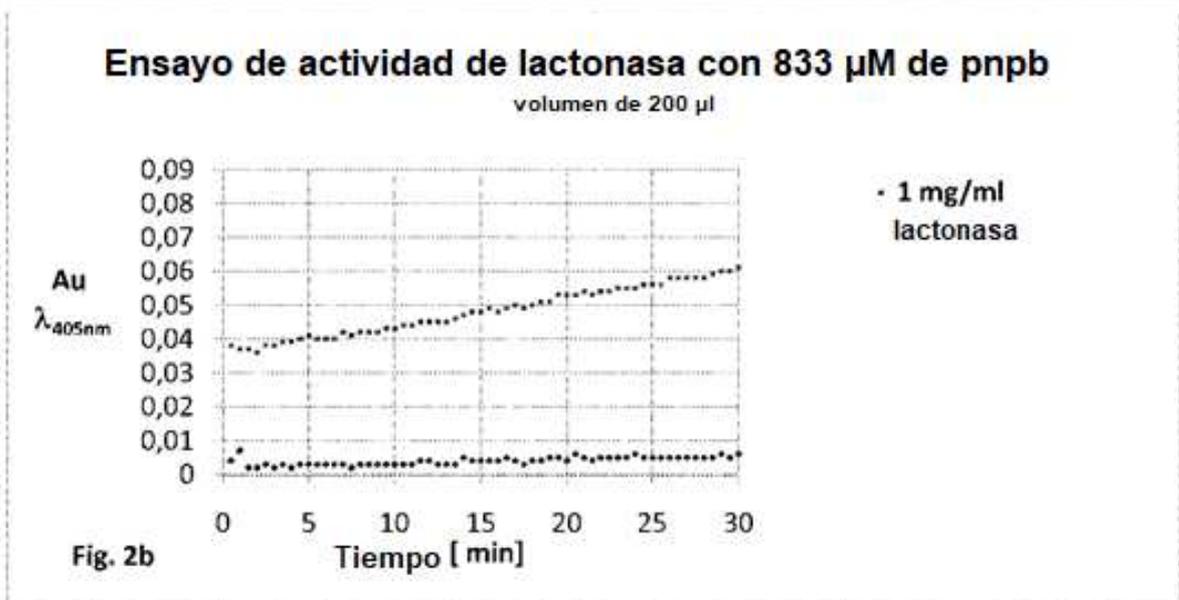
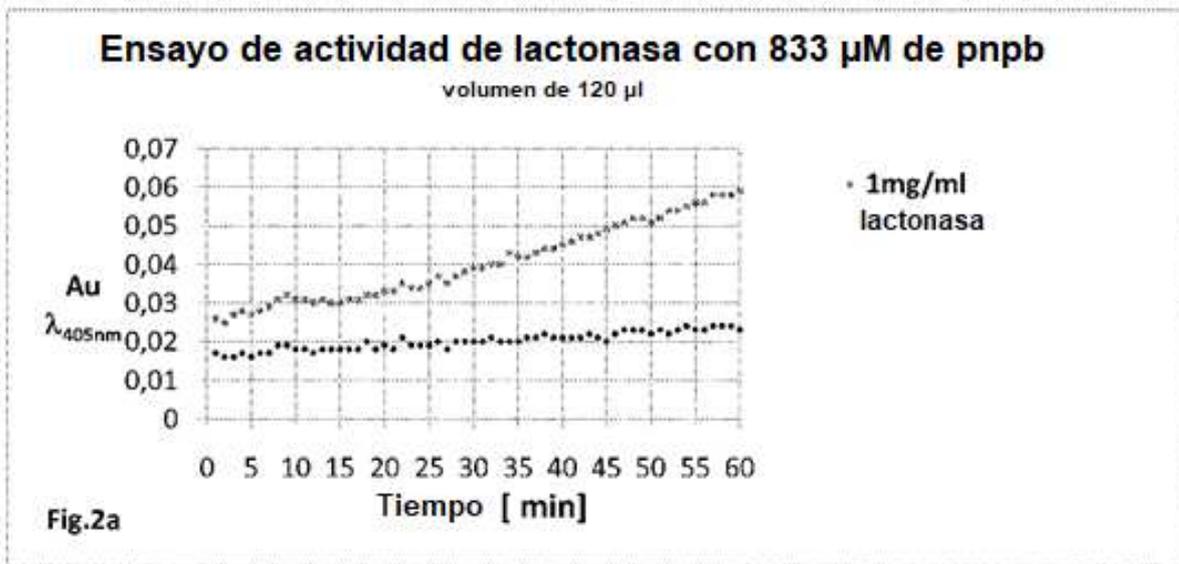


Fig 12

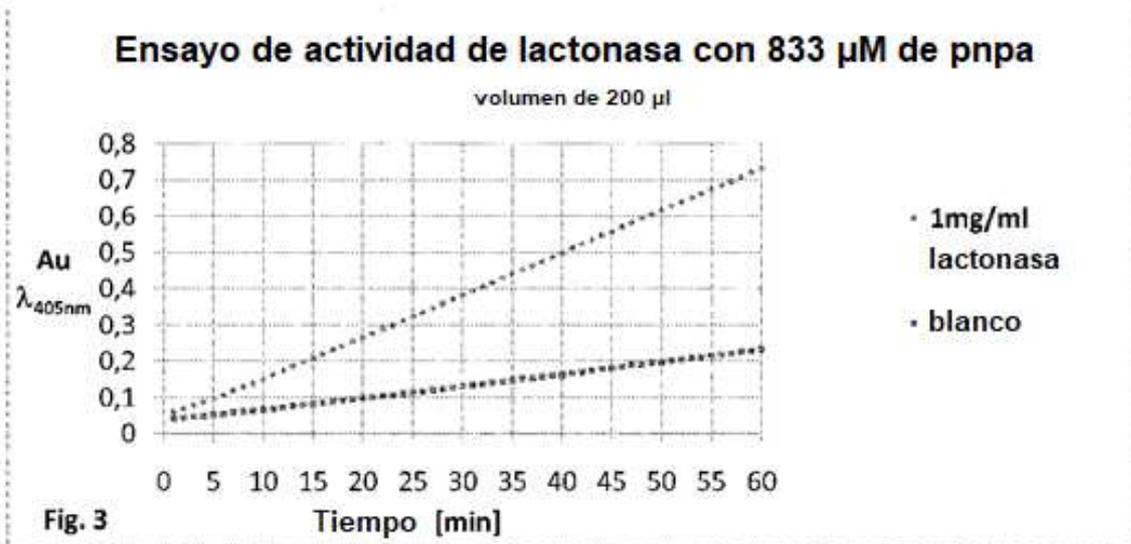


Fig 13