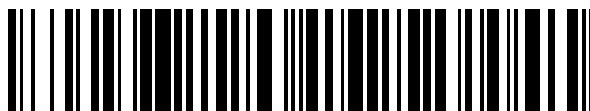


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 762 154**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/08** (2006.01)

**C12P 23/00** (2006.01)

**C12N 9/22** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2014 PCT/US2014/026379**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014 WO14151748**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2014 E 14767876 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019 EP 2984162**

54 Título: **Uso de nucleasas termófilas para degradar ácidos nucleicos**

30 Prioridad:

**15.03.2013 US 201361794400 P**

**16.01.2014 US 201461928080 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**22.05.2020**

73 Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)**

**Het Overloon 1**

**6411 TE Heerlen, NL**

72 Inventor/es:

**TRUEHEART, JOSHUA y**

**MCGRATH, JESSICA**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 762 154 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

Uso de nucleasas termófilas para degradar ácidos nucleicos

## CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 Esta invención se refiere a un método para degradar ácidos nucleicos de una célula hospedante *in vivo* y/o *in situ*, en particular cuando la célula hospedante comprende un ADN recombinante, usando una nucleasa termófila heteróloga. La presente invención es beneficiosa inactivando la actividad biológica de ADN recombinante en una biomasa. La inactivación de la actividad biológica de ADN recombinante ayuda a prevenir que las moléculas de ADN recombinante activas permanezcan en el producto final aislado de la biomasa o en la propia biomasa. Además, la inactivación de la actividad biológica de ADN recombinante ayuda a prevenir que las moléculas de ADN recombinante activas sean liberadas en el medioambiente.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

15 Los procedimientos de producción biotecnológicos se emplean cada vez más para obtener compuestos biológicos y sustancias químicas finas. El progreso de las técnicas de biología molecular hace posible la producción en masa de una amplia variedad de compuestos biológicos y sustancias químicas finas, tales como proteínas, anticuerpos, polisacáridos, antibióticos, aminoácidos, vitaminas, alcoholes, etc. Muy a menudo, a fin de incrementar la eficiencia de la producción, el gen productor del producto o productos finales deseados se modifica genéticamente y/o se introduce en un organismo heterólogo. La producción del producto o productos finales deseados tiene lugar entonces en fermentadores controlados mediante técnicas de control modernas. Los productos finales son las propias células, se extraen de las células, o se recogen del caldo de cultivo celular si los compuestos se encuentran en él (ya sea mediante procedimientos activos o pasivos).

25 Es habitual ver que la biomasa producida al final del procedimiento de fermentación contiene el producto o productos finales deseados, pero también moléculas de ADN activas. Muy a menudo, las moléculas de ADN activas son ADN recombinantes. Si se dejan sin tratar, las moléculas de ADN recombinante podrían permanecer en el producto final aislado, y también se podrían liberar en el medioambiente. Ha habido grandes preocupaciones por el público en general sobre el posible efecto adverso de los materiales de ADN recombinante remanentes en cosechas y productos alimentarios sobre la salud humana. Además, las preocupaciones sobre el impacto potencial del ADN recombinante sobre el medioambiente ha provocado que las autoridades e instituciones en la mayoría de los países expidan requisitos y normativas estatutarias solicitando la inactivación de los materiales residuales producidos a partir del procedimiento de fermentación antes de que sean liberados al medioambiente.

30 Hay varias maneras para inactivar ácidos nucleicos. Por ejemplo, los ácidos nucleicos se pueden inactivar físicamente, y muy habitualmente, por calor. La patente U.S. nº 5.417.862 da a conocer un método para inactivar la actividad biológica de ADN calentando el ADN hasta 60°C a 100°C en presencia de un ácido. En la patente U.S. nº 5.118.603 se da a conocer un método similar para degradar ADN mediante combinación de calor y ácido. Los métodos térmicos requieren una gran cantidad de energía. En un procedimiento de fermentación a gran escala, este método puede ser especialmente costoso. Además, dependiendo de la naturaleza del producto final, las condiciones rigurosas de calor (y/o ácidos) podrían ser perjudiciales para la integridad y actividad de dicho producto.

40 Los ácidos nucleicos también se pueden inactivar por medios mecánicos. La patente U.S. nº 6.165.711 da a conocer un método que usa haces de láser para desintegrar ácidos nucleicos en un material proteínico biológicamente activo. Como otro ejemplo, en el documento US20020091294 A1, ahora abandonado, se da a conocer un método para inactivar microorganismo usando luz policromada pulsada de alta intensidad. El método mecánico requiere que se usen dispositivos generadores de luz complicados y que se mantengan constantemente, y de este modo es costoso. Los haces de luz pueden desintegrar no solo los ácidos nucleicos, sino también otras sustancias biológicas o compuestos activos que les hará perder sus propiedades deseadas.

45 Los ácidos nucleicos también se pueden inactivar químicamente mediante ácidos o álcalis. Por ejemplo, en la patente U.S. nº 7.435.567, se da a conocer un método que usa ácidos hipoclorosos para la inducción de la autodigestión de ácidos nucleicos en un microorganismo. Las patentes U.S. nºs 5.417.862 y 5.118.603, descritas anteriormente, usan otros tipos de ácido para la degradación de ácidos nucleicos. Aunque estos métodos provocan la destrucción de los ácidos nucleicos, las condiciones ácidas y alcalinas son rigurosas. La condición rigurosa puede provocar la desnaturalización indeseada de ciertos compuestos biológicos, tales como proteínas. La cantidad del ácido y álcali usada puede ser relativamente grande, lo que hace igualmente al método desventajoso desde el punto de vista de la producción industrial.

55 Se han realizado intentos para inactivar enzimáticamente ácidos nucleicos de un organismo, tal como mediante el uso de una nucleasa. El documento US20110217330 A1 da a conocer un método para degradar ácidos nucleicos de células hospedantes asociados con la producción de vacunas, en el que el método comprende una etapa de degradar el ácido nucleico añadiendo al cultivo celular una nucleasa purificada. En el documento US 20040014197 A1, se da a conocer la construcción de una cepa bacteriana transgénica que expresa un gen de nucleasa heterólogo en una cantidad eficaz para degradar ácidos nucleicos. Aunque el método de añadir nucleasa *in vitro*, tal como el dado a conocer en el documento US20110217330 A1, provoca la destrucción de ácidos nucleicos, el coste es

elevado, puesto que se requiere una gran cantidad de nucleasa, y la eficiencia de la degradación es baja debido a que la pared celular de la célula hospedante bloquea el acceso a los ácidos nucleicos por la nucleasa cuando se añade *in vitro*. El enfoque transgénico, tal como el dado a conocer en el documento US 20040014197 A1, permite que la nucleasa sea coexpresada con la célula hospedante, y de este modo gane acceso a los ácidos nucleicos del hospedante *in vivo*. Sin embargo, la coexpresión de una nucleasa en una célula sin ningún mecanismo de protección, tal como la metilación, estresará significativamente a la célula, dando como resultado un crecimiento celular debilitado y una producción reducida de producto final.

Según Slatko et al. (Nucleic Acids Research, vol. 15, nº 23, p. 9781-9796, 1987) o el documento US 5.498.535), se conoce la clonación y expresión de la nucleasa termófila Taq I en *E. coli*.

La degradación *in vivo* de ácidos nucleicos se describe en los documentos WO2009158364 A1, WO2008065200 A1 o por Hyongi Chon et al. (Bioscience Biotechnology Biochemistry, Vol. 68, nº 10, p. 2138-2147, 2004); las enzimas termófilas están bajo el control de un promotor inducible.

En el documento WO2009126890 A2 se describe la producción de carotenoides o productos retinólicos en general usando hongos oleaginosos tales como, por ejemplo, *Yarrowia lipolytica*.

Kawarabayashi et al. (DNA Research, Universal Academy Press, vol. 5, p. 55-76, 1998) describen la secuencia codificante de la nucleasa termófila Pho I.

En el documento WO2012135053 A2 se describen nucleasas termófilas de arqueas.

La producción de compuestos biológicos que son endógenos a la célula hospedante, por ejemplo la producción de ubiquinona en *E. coli*, se describe en Cox et al. (Biochemical Journal, Portland Press Ltd, GB, vol. 117, nº 3, p. 551-562, 1970).

En el documento US2008166809 A1 se describe un método con expresión recombinante de Taq I usando células fúngicas, con el objetivo de mejorar la frecuencia de recombinación genética en ADN genómico.

El problema que subyace a la presente invención es, por lo tanto, proporcionar una manera económica para degradar los ácidos nucleicos de una célula hospedante que produce compuestos biológicos y sustancias químicas finas, especialmente en una escala de producción industrial. Un problema adicional que subyace a la presente invención es proporcionar un método en el que el procedimiento de degradación de los ácidos nucleicos es controlable y no impide la producción del producto o productos finales deseados en la célula hospedante. Los problemas anteriores se resuelven según la invención mediante la materia objeto de las presentes reivindicaciones.

#### SUMARIO DE LA INVENCION

Ahora hemos encontrado sorprendentemente que las nucleasas termófilas se pueden usar para degradar ácido nucleico *in vivo* y/o *in situ*, de una manera controlada. Esta invención se refiere a un nuevo método para degradar ácidos nucleicos de un organismo hospedante, en el que el organismo hospedante se modifica o transforma con un gen de nucleasa termófila heterólogo. La nucleasa termófila es latente a temperaturas a las que el cultivo celular se hace crecer normalmente para producir el producto deseado, pero se puede activar selectivamente a una mayor temperatura, y de este modo degradar los ácidos nucleicos del organismo hospedante una vez activada. La activación se puede accionar en cualquier punto de tiempo deseado, tal como en el tiempo de recolecta del cultivo celular, cuando la formación del producto ya está terminada. Además del control fácil, la aplicación de este procedimiento inventivo tiene el beneficio de actuar *in vivo* y/o *in situ*, y de este modo de mejorar la eficiencia de la reacción enzimática, y evita los inconvenientes y problemas de los métodos físicos o químicos existentes. De este modo, se ha hecho posible, mediante la aplicación de la invención descrita, obtener compuestos biológicos y sustancias químicas finas en forma de células intactas en las que se degrada e inactiva el contenido de ácidos nucleicos activos de la célula, especialmente los ADN recombinantes.

La práctica de esta invención es ampliamente aplicable tanto a microorganismos como a cultivos de células eucariotas superiores, y particularmente a cepas industriales usadas en una producción a gran escala de productos finales comerciales.

El método para degradar ácidos nucleicos *in vivo* y/o *in situ*, en el que el método comprende: a) introducir el gen de una nucleasa termófila en una célula hospedante; b) hacer crecer la célula hospedante a una temperatura a la que la nucleasa termófila está latente; y c) degradar los ácidos nucleicos de la célula hospedante cambiando la temperatura en la etapa (b) a una temperatura a la que la nucleasa termófila es activa.

La presente invención también proporciona un procedimiento para la producción de biomasa fermentando una célula modificada genéticamente que es capaz de producir un compuesto biológico y que comprende una secuencia de ácido nucleico heteróloga que codifica un gen de nucleasa termófila Taq I o Pho I con una actividad enzimática de 20% o menos en comparación con la actividad de dicha Taq I o Pho I a temperatura óptima, que es 65°C ± 5°C para Taq I y 75°C ± 5°C para Pho I, degradando los ácidos nucleicos de la célula modificada genéticamente cambiando la temperatura hasta al menos 50°C, y recuperando el producto biológico aislado de la biomasa; en el que la

degradación se lleva a cabo durante la pasteurización de la célula hospedante, y en el que la célula modificada genéticamente produce uno o más productos biológicos, y los productos biológicos producidos por la célula modificada genéticamente no son la nucleasa termófila anterior y se seleccionan del grupo que consiste en fitoeno, licopeno, beta-caroteno, alfa-caroteno, beta-criptoxantina, luteína, zeaxantina, astaxantina, cantaxantina, equinenona, 3-hidroxi equinenona, 3'-hidroxi equinenona, adonirrubina, violaxantina, adonixantina ubiquinona, vitamina K, vitamina E, retinol, retinal, ácido retinoico, y palmitato de retinilo, que están libres de moléculas de ácidos nucleicos activos, y en el que la célula modificada genéticamente se selecciona de *Yarrowia*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Paracoccus*, *Corynebacterium*, *Candida*, *Hansenula*, *Saccharomyces*, *Mortierella*, *Schizosaccharomyces*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Crypthecodinium*, *Schizochytrium*, o *Thraustochytrium*.

En una realización, la célula modificada genéticamente se crea introduciendo en una célula hospedante el gen de nucleasa termófila heterólogo descrito anteriormente. Esta célula hospedante puede ser una célula que no se ha modificado genéticamente, o una célula que se ha modificado genéticamente. Esta célula hospedante, antes de ser modificada con el gen de nucleasa termófila heterólogo, produce uno o más productos finales, en la que dicho uno o más productos finales no son la nucleasa termófila. En otra realización, la célula hospedante mencionada anteriormente se puede introducir en primer lugar con el gen de nucleasa termófila para crear una célula modificada genéticamente, y la célula modificada genéticamente se manipula subsiguientemente mediante ingeniería genética para producir uno o más productos finales distintos.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de una nucleasa termófila para degradar los ácidos nucleicos de una célula hospedante *in vivo* y/o *in situ*, en el que la nucleasa termófila es heteróloga a la célula hospedante.

La temperatura en la etapa (a) del procedimiento anterior de la invención y del método de la invención es óptima para el crecimiento de la célula hospedante. La degradación se puede llevar a cabo a una temperatura que está dentro de alrededor de  $\pm 5^{\circ}\text{C}$  de la temperatura óptima de dicha nucleasa termófila. En una realización específica, la degradación se lleva a cabo a la temperatura óptima de dicha nucleasa termófila.

En una realización, la nucleasa que degrada el ADN es la nucleasa TaqI. En una realización, la degradación se lleva a cabo a una temperatura que oscila entre alrededor de  $60^{\circ}\text{C}$  y alrededor de  $70^{\circ}\text{C}$ . En una realización específica, la degradación se lleva a cabo a  $65^{\circ}\text{C}$ .

En una realización, la célula hospedante se selecciona de un grupo que consiste en: *Yarrowia*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Candida*, *Hansenula*, *Saccharomyces*, *Mortierella*, *Schizosaccharomyces*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Crypthecodinium*, *Schizochytrium*, y *Thraustochytrium*. En una realización específica, la especie *Yarrowia* es *Yarrowia lipolytica*.

En una realización, la célula hospedante produce uno o más productos finales seleccionados del grupo que consiste en: fitoeno, licopeno, beta-caroteno, alfa-caroteno, beta-criptoxantina, luteína, zeaxantina, astaxantina, cantaxantina, equinenona, 3-hidroxi equinenona, 3'-hidroxi equinenona, adonirrubina, violaxantina, y adonixantina.

En una realización, el gen de la nucleasa termófila está optimizado en los codones para coincidir con el sesgo del huso de codones de la célula hospedante. En una realización, el gen de nucleasa termófila con codones optimizados comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO:1.

En otra realización, la invención se refiere al uso de la nucleasa TaqI para degradar ADN recombinante de una cepa de *Yarrowia lipolytica* *in vivo* y/o *in situ* en un procedimiento descrito anteriormente.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

SEQ ID NO:1 es la secuencia de ADN que codifica la nucleasa TaqI de *Thermus aquaticus*, según se optimiza para la expresión en *Yarrowia lipolytica*, e incluye sitios de restricción para la clonación y un sitio de unión ribosómica de 5'.

## ES 2 762 154 T3

### SEQ ID NO:1:

gctagccacaaaaatggcttccactcaggctcagaaggctcttgagactttcgagcgatttctcg  
cttctcttgacctggagtcctaccagcagaagtaccgacctatcaagactggtgagcaggacctt  
ccccgagagctgaacccccctcccgacctgtacgagcactactggaaggcccttgaggataacc  
ctccttctgggcttcgaggagt.tctttgacctggtgggagaagcgacttcgaccccccgagc  
agttcattcgaaagtacttttggggttgctcctacgcctttgttcgacttggccttgaggctcga  
ctgtaccgaactgccgtttccatctggactcagtttacttctgctaccgatggaacgcctcctg  
cgagcttcccccttgaggccgccccgagcttgacgcccaggcattgacgcccctgattcacactt  
ccggttccctctaccggaatccagatcaagaaggagacttaccgatccgaggccaagtccgagaac  
cgatttctccgaaagcagcgaggcaccgcctcatcgagattccctacacccttcagactcccga  
ggagcttgaggagaaggccaagcgagccccgagttaacggagagacttaccgactttgggccaagg  
ttgctcaccaccttgaccgacttgagaacggttttgcatttttcgagagtcttacgttaagtct  
attgagcttttctccagaagaacgctcccaccctttctggactcattcgatgggaccgagttgc  
tcaggaggccctcaccgccccctaaacgcgt

SEQ ID NO:2 es la secuencia de ADN no optimizada que codifica la nucleasa TaqI, según se aísla de *Thermus aquaticus*.

### SEQ ID NO:2:

atggcttccacacaagcccagaaagcgctcgaacttttgagcgttttctcgcaagcttggacct  
cgagtcctaccagcaaaagtaccgcccctatcaaaacggttgaaacaagacctgcctagggagctga  
accgcttccggacctgtacgagcattattggaaagcgcttgaggataacccttccctctgggc  
ttcgaagagttctttgacctggtgggaaaagcgctacggccttggacgagttcatacgcga  
atacttttggggatgctcctacgcgtttgttcgcttgggcctcgaggctaggctgtaccgaacag  
ccgtttccatctggactcagtttacttctgctaccgctggaacgcctcctgcgagcttccctca  
gaagctgccccagaactcgacgcccgaaggatagacgcgctgattcatacaagcgggtcctcaac  
aggaatccagatcaaaaaggaaacttaccgttccgaggccaagagcgagaaccgctttttaagga  
agcaaagaggcaccgcccctcatcgagattccctacaccctgcagacaccagaggagctcgaagaa  
aaagccaaaacgggcaagagtgaacggagaaacctaccgtctatgggccaaggttgacaccattt  
ggaccgtctagaaaacggattcgtcatttttcgggaaagtattgtgaaaagcattgagctttttc  
tccagaaaaacgctcctaccctatctgggctcatcgctgggacaggggtggcccaggaagccctc  
accgccccgtga

SEQ ID NO:3 es la secuencia de aminoácidos de la nucleasa TaqI, como se deduce de SEQ ID NO:1.

## ES 2 762 154 T3

SEQ ID NO:3:

MASTQAQKALETFERFLASLDLESYQQKYRPIKTVEQDLPRELNPLPDLYEHYWKALEDNPSFLG  
FEEFFDHWWEKRLRPLDEFIRKYFWGCSYAFVRLGLEEARLYRTAVSIWTQFHFYRWNASCELPL  
EAAPELDAQGIDALIHTSGSSTGIQIKKETYRSEAKSENRFRLKQRGTALIEIPYTLQTPEELEE  
KAKRARVNGETYRLWAKVAHHLDRLENGFVIFRESYVKSIELFLQKNAPTL SGLIRWDRVAQEAL  
TAP

SEQ ID NO:4 es la secuencia de ADN del marco de lectura abierto de *carB* heterólogo alojado por una cepa de *Yarrowia lipolytica*.

SEQ ID NO:4: gen *carB*

atgtccaagaaacacattgtcattatcgggtgctggcggtgggtggcaaggctacagctgctcgttt  
ggcccgcgaaggcttcaaggctcactgtggtggagaaaaacgactttggtggcgccgctgctcct  
tgatccatcaccagggccatcgctttgatcagggccgctcgctctacctgatgcccaagtacttt  
gaggacgcctttgccgatctggacgagcgcattcaagaccacctggagctgctgcatgacgacaa  
caactacaaggtgcactttgacgacgggtgagtcgatccagctgtcgtctgacttgacacgcatga

## ES 2 762 154 T3

aggctgaattggaccgctggagggcccccttggttttgccgattcctggatttcatgaaagag  
acacacatccactacgaaagcggcaccctgattgogctcaagaagaatttcgaatccatctggga  
cctgattcgcacatcaagtagctccagagatctttcgcttgccctggttgcaagatctacgacc  
gcgcttccaagtacttcaagaccaagaagatgogcatggcattcacgtttcagaccatgtatatg  
ggcatgtcgccctacgatgogcctgctgtctacagcctggtgagtagaccgagttcgctgaag  
catctggatccccgtggcggttcaacatggtgggttcagaagctagaggcgattgcaaagcaaa  
agtagatgcccaggtttatctacaatgogcctggttgcgaagattaacaccgatgatgccacaaa  
caagtgacaggtgtaaccttgaaaaatggccacatcatcgatgcccgatgoggttgtgtgtaacgc  
agatctggtctatgcttatcacaatctggtgctcctcgccgatggagcgaacacactggctt  
ccaagaaattgagctcttcttccatttcttctactggtccatgtccaccaaggtgctcaattg  
gagctgcacaacatctttttggccgaggttatcaggagagctttgacgaaatcttcaaggactt  
tggcctgcttctgaagcctccttctacgtcaatgtgcccctctcgatcgatccttctgctgctc  
ccgacggcaaggactctgtcattgtcttgggtgctattggtcatatgaagagcaagacgggogat  
gcttccaccgagaactacccggccatggtggacaaggcacgcaagatggtgctggctgtgattga  
gogtctctgggcatgtcgaatttcgcccacttgattgagcatgagcaagtcaatgatcccogctg  
tatggcagagcaagttcaatctgtggagaggtcaattctgggtttgtctcatgatgtgcttcag  
gtgctgtggttccgctccagcacaagattctaccggtcgttatgataacctattctttgtggg  
tgcaagcacgcatcccggaactggtggtccattgtccttgagggaagcaagctcacctctgacc  
aagttgtcaagagctttggaagacgcccgaagcaagaagatcgagatggagaacaagcaagca  
cctttggaggagcctgatgtgaatcgacattccctgtgtggttctgggtgogcogctgccttttg  
ggtcatgtttatgttcttttacttcttccctcaatccaatggccaaacgcccgatcttttatca  
ataatttgttacctgaagtattccgogttcataactctaattgtcatttaa

Las SEQ ID NOs:5 y 6 son los cebadores de PCR de 5' y 3' para un fragmento de 529 pb en SEQ ID NO:4.

SEQ ID NO:5: cebador MO4641: caatctgtgcctccctgc

SEQ ID NO:6: cebador MO4642: atccttgtgctgggacgg

SEQ ID NO:7 es la secuencia de ADN para el marco de lectura abierto de *crtZ-Dc* heterólogo albergado por una cepa de *Yarrowia lipolytica*.

SEQ ID NO:7: gen *crtZ-Dc*

atgcttgctgttgggaataccgggatcgtgctactgactatcatcatcatggaaggggt  
 ggcaacgttcgcacacaagtaacatcatgcacggctggggatggggctggcatcattcgc  
 accataccccgcgcaaagggcgctttgagcgtaacgatctctatgcggtggtggttgcg  
 ctactggccattgctgctgatttacggggcagcgaagggtaactggccgcttcagtggat  
 tggcgcggaatgaccggctacggcgtgatctactttatcgttcacgatggtcttgtcc  
 accagcgtggcggcttccgttacgtgcccgcgcggcgtatctgcccgcctctacatg  
 gcacaccggctgcatcacgcggtgcgggggcgcgaaggggtgctctccttcgggttat  
 ctacgccccaccgggtggacaagctgcaggcgggtgctgcgcaacgtaacggcagaccg  
 ccagcgcgggctgcccagaggtgcggtatcgcgcggcggccagctcgccttcgggaag  
 ccatcgctgcttcgcccggaaataa

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

**Figuras**

- 5 La Fig. 1 muestra el transcurso de tiempo de la actividad de degradación del ADN en cepas de *Y. lipolytica* con o sin el gen de la nucleasa *taqI*.
- La Fig. 2 muestra la actividad de degradación del ADN a diferentes temperaturas en cepas de *Y. lipolytica* con o sin el gen de la nucleasa *taqI*.
- La Fig. 3 muestra la terminación de la degradación del ADN con base en el resultado de la PCR.
- 10 La Fig. 4 muestra la producción de astaxantina y sus precursores en cepas de *Y. lipolytica* con o sin el gen de la nucleasa *taqI*.
- La Fig. 5 muestra la producción de zeaxantina y sus precursores en una cepa de *Y. lipolytica* que tiene el gen de nucleasa *taqI*.
- La Fig. 6 muestra el transcurso de tiempo para la degradación de ADN en cepas de *Y. lipolytica* que producen astaxantina y zeaxantina en fermentadores.

**15 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

La presente invención proporciona un procedimiento para la producción de biomasa como se describe anteriormente, que comprende degradar ácidos nucleicos *in vivo* y/o *in situ* usando una nucleasa termófila heteróloga seleccionada de Taq I o Pho I como se describe anteriormente. El método está destinado a degradar los ácidos desoxirribonucleicos de un organismo, en particular ADN recombinante, en el producto o productos biológicos como se define aquí. Según la invención, un gen de nucleasa termófila heterólogo se introduce en el organismo en el que se pretende degradar los ácidos nucleicos. La nucleasa termófila es latente a la temperatura normal de crecimiento del organismo, pero se puede activar elevando la temperatura hasta un intervalo alrededor de la temperatura óptima de la nucleasa termófila como se define anteriormente.

25 En la presente invención, la nucleasa termófila se usa para inactivar la actividad biológica de los ácidos nucleicos del organismo hospedante. La expresión "inactivar la actividad biológica de ácidos nucleicos" se considera que se refiere a la degradación de ácidos nucleicos por la presente invención. Cuando se escinde el ácido nucleico, de manera que ya no puede lograr los papeles de replicación, transcripción o traducción, se considera que está biológicamente inactivado. Preferiblemente, el ácido nucleico es ADN recombinante. Preferiblemente, el ácido nucleico se escindirá en unidades que son 500 pares de bases o menos.

30 En la presente invención, la nucleasa termófila es producida por la célula hospedante en lugar de ser añadida exógenamente, y de este modo degrada los ácidos nucleicos de la célula hospedante *in vivo* y/o *in situ*. La expresión "*in vivo*" se refiere a la degradación de ácidos nucleicos dentro de la célula hospedante por la nucleasa termófila producida por la célula, que puede ser o no viable en el momento de la degradación. La expresión "*in situ*" se refiere a la degradación de ácidos nucleicos por la nucleasa termófila producida por la célula hospedante después de que se rompe (total o parcialmente) la pared celular de la célula hospedante. Por ejemplo, una degradación *in situ* se puede llevar a cabo al final del procedimiento de fermentación, en el que las células se lisan para liberar sus contenidos. La degradación se puede llevar a cabo inmediatamente después de que se lisan las células, o después de que ya ha ocurrido algún procesamiento adicional del caldo lisado. Se entiende que la degradación según la presente invención se realiza durante la pasteurización de la célula hospedante.

40 En relación con la presente invención, la expresión "ácido nucleico" significa ácido desoxirribonucleico (ADN) monocatenario, bicatenario, o parcialmente bicatenario, o ácido ribonucleico (ARN).



Gen: el término “gen”, como se usa aquí, se refiere generalmente a un ácido nucleico que codifica un polipéptido, que incluye opcionalmente ciertos elementos reguladores que pueden afectar a la expresión de uno o más productos génicos (es decir, ARN o proteína). Por ejemplo, un gen de nucleasa termófila, según la invención, se refiere al marco de lectura abierto (ORF) que codifica un polipéptido de la nucleasa termófila, y también a secuencias de ácido nucleico que codifican el ORF de nucleasa termófila junto con ciertos promotores que se colocan en dirección 5' del ORF para afectar la expresión del gen de nucleasa y/o una región para la terminación de la transcripción.

Heterólogo: El término “heterólogo”, como se usa aquí, se refiere a un gen o un polipéptido que no aparece de forma natural en el organismo en el que se está expresando. Se entiende que, cuando se va a expresar un polipéptido heterólogo en una célula hospedante, a menudo será deseable utilizar secuencias de ácido nucleico que codifican el polipéptido que se han ajustado para adecuarse a las preferencias de codones de la célula hospedante y/o para enlazar las secuencias codificantes con elementos reguladores activos en la célula hospedante. Por ejemplo, cuando la célula hospedante es una cepa de *Yarrowia* (por ejemplo, *Yarrowia lipolytica*), a menudo será deseable alterar la secuencia génica que codifica un polipéptido dado, de forma que se ajuste más precisamente a las preferencias de codones de tal cepa de *Yarrowia*. En ciertas realizaciones, una secuencia génica que codifica un polipéptido dado se altera para ajustarla de forma más exacta a la preferencia de codones de una especie relacionada con la célula hospedante. Tales realizaciones son ventajosas cuando la secuencia génica que codifica un polipéptido dado es difícil de optimizar para adecuarla a la preferencia de codones de la célula hospedante debido a razones experimentales (por ejemplo, clonación) y/u otras razones. En ciertas realizaciones, la secuencia génica que codifica un polipéptido dado se optimiza incluso cuando tal secuencia génica deriva de la propia célula hospedante (y de este modo no es heteróloga). Por ejemplo, una secuencia génica que codifica un polipéptido de interés se puede optimizar en los codones para la expresión en una célula hospedante dada, incluso aunque tal secuencia génica se aísla de la cepa de la célula hospedante. En tales realizaciones, la secuencia génica se puede optimizar adicionalmente para dar cuenta de las preferencias de codones de la célula hospedante. Como alternativa, la secuencia génica (no heteróloga) puede no estar optimizada en los codones sino que, en su lugar, se puede enlazar a un elemento regulador distinto de sus propios (ya sea que el elemento regulador proceda de otro gen en el hospedante, o proceda de otra especie). Los expertos normales en la técnica conocerán las preferencias de codones de la célula hospedante, y serán capaces de emplear los métodos y composiciones inventivos descritos aquí para optimizar la expresión de un polipéptido dado en la célula hospedante.

Célula hospedante: Como se usa aquí, la “célula hospedante” significa cualquier tipo de célula que es susceptible de introducirla en un constructo de ácido nucleico o en un vector de expresión. Los medios de introducción del constructo de ácido nucleico o vector de expresión pueden estar en forma de transformación, transfección, transducción, y similar. La expresión “célula hospedante” engloba cualquier progenie de una célula progenitora que no es idéntica a la célula progenitora debido a mutaciones que se producen durante la replicación. En realizaciones preferidas, las células hospedantes producen uno o más productos finales que son compuestos biológicos o sustancias químicas finas deseadas. Se prefiere que la célula hospedante sea una cepa industrial. La célula hospedante puede ser una célula natural que no se modificó genéticamente. Una célula hospedante modificada genéticamente se refiere a una célula hospedante que se ha modificado, transformado mediante ingeniería, o manipulado, a menudo para expresar ciertos compuestos biológicos o sustancias químicas finas.

La célula hospedante puede ser cualquier célula útil en la producción recombinante de compuestos biológicos y/o sustancias químicas finas en una procarionota o una eucarionota.

La expresión “compuestos biológicos” es conocida en la técnica, e incluye compuestos que son los bloques de construcción de un organismo. Los ejemplos de compuestos biológicos incluyen, pero no están restringidos a: proteínas, polipéptidos, aminoácidos, ácidos nucleicos, nucleótidos, hidratos de carbono, y lípidos. Los compuestos biológicos según la presente invención se seleccionan del grupo que consiste en fitoeno, licopeno, beta-caroteno, alfa-caroteno, beta-criptoxantina, luteína, zeaxantina, astaxantina, cantaxantina, equinenona, 3-hidroxi equinenona, 3'-hidroxi equinenona, adonirrubina, violaxantina, adonixantina, ubiquinona, vitamina K, vitamina E, retinol, retinal, ácido retinoico, y palmitato de retinilo, que están libres de moléculas de ácido nucleico activas.

Los animales superiores han perdido la capacidad de sintetizar vitaminas, carotenoides, cofactores y sustancias nutracéuticas, y por lo tanto necesitan adquirirlas, aunque son sintetizadas fácilmente por otros organismos tales como bacterias. Estas moléculas son moléculas biológicamente activas per se, o precursores de sustancias biológicamente activas que sirven como portadores de electrones o intermedios en un número de rutas metabólicas. Estos compuestos tienen también, además de su valor nutricional, un valor industrial significativo como agentes colorantes, antioxidantes y catalizadores u otros auxiliares de procesamiento. El término “vitamina” es conocido en la técnica, e incluye nutrientes que son necesarios para un organismo para el funcionamiento normal, pero no se pueden sintetizar por este mismo organismo. El grupo de vitaminas puede incluir cofactores y compuestos nutracéuticos. El término “cofactor” incluye compuestos no proteicos que son necesarios para la aparición de actividad enzimática normal. Estos compuestos pueden ser orgánicos o inorgánicos; las moléculas del cofactor de la invención son preferiblemente orgánicas. El término “nutracéutico” incluye aditivos alimentarios que promueven la salud en organismos y animales, especialmente en seres humanos. Los ejemplos de tales moléculas son vitaminas, antioxidantes, e igualmente ciertos lípidos (por ejemplo ácidos grasos poliinsaturados).

Las sustancias químicas finas o productos biosintéticos preferidos que pueden ser producidos en organismos del

género *Yarrowia* son carotenoides tales como, por ejemplo, fitoeno, licopeno, beta-caroteno, alfa-caroteno, beta-criptoxantina, luteína, zeaxantina, astaxantina, cantaxantina, equinenona, 3-hidroxi equinenona, 3'-hidroxi equinenona, adonirrubina, violaxantina, y adonixantina.

5 La célula hospedante procariota puede ser cualquier bacteria gram-positiva o gram-negativa. Las bacterias gram-positivas incluyen, pero no se limitan a, *Bacillus*, *Brevibacillus*, *Clostridium*, *Geobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Paenibacillus*, y *Streptomyces*. Las bacterias gram-negativas incluyen, pero no se limitan a, *E. coli* y *Pseudomonas*.

La célula hospedante bacteriana puede ser cualquier célula de *Bacillales*, incluyendo, pero sin limitarse a, células de *Bacillus amyloliquefaciens*, *Brevibacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis*, y *Bacillus thuringiensis*.

10 La célula hospedante bacteriana también puede ser cualquier célula de *Streptomyces*, incluyendo, pero sin limitarse a, células de *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus*, y *Streptomyces lividans*.

La célula hospedante también puede ser una eucariota, tal como una célula de mamífero, de insecto, vegetal, de alga, o fúngica.

15 La célula hospedante puede ser una célula fúngica. "Hongos", como se usa aquí, incluye los filos Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota, y Zygomycota (como se definen por Hawksworth et al., In, Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8ª edición, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, UK) así como los Oomycota (como se citan en Hawksworth et al., 1995, más arriba, página 171), y todos los hongos mitospóricos (Hawksworth et al., 1995, más arriba).

20 La célula hospedante fúngica puede ser una célula de levadura. "Levadura", como se usa aquí, incluye levadura ascosporegenosa (endomicetales), levadura basidiosporogenosa, y levadura que pertenece a Fungi Imperfecti (Blastomycetes). Puesto que la clasificación de levadura puede cambiar en el futuro, para los fines de esta invención, la levadura se debe definir como se describe en Biology and Activities of Yeast (Skinner, F.A., Passmore, S.M., y Davenport, R.R., eds, Soc. App. Bacteriol. Symposium Series nº 9, 1980).

25 La célula hospedante de levadura puede ser una célula de *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, o *Yarrowia*, tal como una célula de *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis*, *Saccharomyces oviformis*, o *Yarrowia lipolytica*.

30 La célula hospedante de alga puede ser una célula de *Cryptocodinium*, *Schizochytrium*, y *Thraustochytrium*, tal como una célula de *Cryptocodinium cohnii*, *Schizochytrium sp.* o *Thraustochytrium sp.*

35 La célula hospedante fúngica puede ser una célula fúngica filamentosa. "Hongos filamentosos" incluye todas las formas filamentosas de la subdivisión Eumycota y Oomycota (como se define por Hawksworth et al., 1995, más arriba). Los hongos filamentosos se caracterizan generalmente por una pared micelial compuesta de quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano, y otros polisacáridos complejos. El crecimiento vegetativo es mediante alargamiento de la hifa, y el catabolismo de carbono es obligadamente aeróbico. Por el contrario, el crecimiento vegetativo mediante levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* es mediante germinación de un talo unicelular, y el catabolismo de carbono puede ser fermentativo.

40 La célula hospedante fúngica filamentosa puede ser una célula de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Chrysosporium*, *Coprinus*, *Coriolus*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Piromyces*, *Pleurotus*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trametes*, o *Trichoderma*.

45 Por ejemplo, la célula hospedante fúngica filamentosa puede ser una célula de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Bjerkandera adusta*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis caregiea*, *Ceriporiopsis gilvescens*, *Ceriporiopsis pannocinta*, *Ceriporiopsis rivulosa*, *Ceriporiopsis subrufa*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Chrysosporium inops*, *Chrysosporium keratinophilum*, *Chrysosporium lucknowense*, *Chrysosporium merdarium*, *Chrysosporium pannicola*, *Chrysosporium queenslandicum*, *Chrysosporium tropicum*, *Chrysosporium zonatum*, *Coprinus cinereus*, *Coriolus hirsutus*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochromum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Pleurotus eryngii*, *Thielavia terrestris*, *Trametes villosa*, *Trametes versicolor*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, o *Trichoderma viride*.

Las células fúngicas se pueden transformar mediante un procedimiento que implica la formación de protoplastos, la transformación de los protoplastos, y la regeneración de la pared celular de una manera conocida *per se*. Tales procedimientos para la transformación de células hospedantes de *Aspergillus* y *Trichoderma* se describen en el documento EP 238023 y en Yelton et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1470-1474. Los métodos adecuados para transformar la especie *Fusarium* se describen por Malardier et al., 1989, Gene 78: 147-156, y el documento WO 96/00787. La levadura se puede transformar usando los procedimientos descritos por Becker y Guarente, en Abelson, J.N. and Simon, M.I., editores, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, Volumen 194, p. 182-187, Academic Press, Inc., Nueva York; Ito et al., 1983, J. Bacteriol. 153: 163-168; y Hinnen et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1929-1933.

Para construir una cepa de célula hospedante con un gen de nucleasa termófila heterólogo, el constructo de gen de nucleasa termófila recombinante se inserta en un vector específico del hospedante, que permite la expresión génica óptima en el hospedante. Los vectores son bien conocidos en "Cloning Vectors" (Pouwels et al., Eds., Elsevier, Amsterdam-Nueva York-Oxford, 1985). Se ha de entender que vectores significa no solo plásmidos, sino también todos los otros vectores conocidos por el trabajador experto, tales como, por ejemplo, fagos, virus, tales como SV40, CMV, baculovirus y adenovirus, transposones, elementos IS, plásmidos, cósmidos, y ADN lineal o circular. Estos vectores se pueden replicar de forma autónoma en el organismo hospedante, o cromosómicamente.

Los constructos recombinantes descritos anteriormente según la invención se introducen ventajosamente en el genoma del organismo hospedante y se expresan. Se prefiere usar métodos habituales de clonación y transfección conocidos por el trabajador experto, a fin de provocar la expresión de los ácidos nucleicos termófilos en el sistema de expresión en cuestión. Los sistemas adecuados se describen, por ejemplo, en Current Protocols in Molecular Biology, F. Ausubel et al., Eds., Wiley Interscience, Nueva York 1997.

La célula hospedante modificada puede contener un plásmido que porta el gen de nucleasa termófila heterólogo, y el plásmido se replica autónomamente en el organismo hospedante.

Se considera que el ADN es "recombinante" si resulta de la aplicación de técnicas de ADN recombinantes. Los ejemplos de técnicas recombinantes incluyen, pero no se limitan a, clonación, mutagénesis, transformación, etc. Las técnicas de ADN recombinantes se describen, por ejemplo, en Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Nueva York (1989) y en Ausubel FM, et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, Nueva York (1998).

El término "nucleasa" significa una enzima que efectúa la escisión hidrolítica del enlace de éster entre el grupo 5'-fosfato de un nucleótido y el grupo 3'-hidroxi del nucleótido adyacente en un ácido nucleico, y por tanto logra la degradación de una molécula de ADN o ARN. Se conocen nucleasas de numerosos organismos. Las nucleasas escinden ARN o ADN en unidades más pequeñas, o incluso en sus monómeros.

En una realización preferida, la nucleasa termófila según la presente invención es una nucleasa que degrada el ADN, y el ácido nucleico que es degradado por la nucleasa termófila es ADN. En una realización específica, el ADN que está siendo degradado es un ADN recombinante.

Aunque la realización preferida de la presente invención se refiere a la inactivación de ADN, se puede lograr la inactivación de cualquier molécula de ácido nucleico. Esto incluye la inactivación de ARN o de conjugados de ácido nucleico-proteína, tales como ribozimas.

"Nucleasa que degrada el ADN" significa una nucleasa que es capaz de escindir moléculas de ADN en unidades más pequeñas o en monómeros. Tal enzima también se denomina "ADNasa" en el estado de la técnica. "Nucleasa que degrada el ARN" es una nucleasa que es capaz de escindir moléculas de ARN en unidades más pequeñas o en monómeros. Tales enzimas también se denominan "ARNasa" en el estado de la técnica.

La ADN nucleasa puede ser una endonucleasa o una exonucleasa. Una endonucleasa es una enzima que degrada una cadena de ácido nucleico a partir de una posición dentro de la cadena. Por el contrario, una exonucleasa es una enzima que degrada una cadena de ácido nucleico desde uno o ambos extremos de la cadena. Se prefiere que la nucleasa sea una endonucleasa.

"Nucleasa termófila" significa una nucleasa que tiene su actividad óptima a una temperatura de 45°C o mayor. Dicha actividad óptima se observa a una temperatura que es óptima para la actividad de la nucleasa. La temperatura óptima se puede determinar para la nucleasa en un ensayo *in vitro*, o en un ensayo *in vivo*, en el que la nucleasa se expresa en el hospedante recombinante según la presente invención, usando un sustrato adecuado y bajo condiciones de ensayo (en términos de composición del medio, tiempo del ensayo, etc.) que son relevantes para la aplicación pretendida, según lo determina una persona experta en la técnica. Como ejemplo, el óptimo de temperatura de una nucleasa tal como TaqI se determina típicamente *in vitro* usando la nucleasa TaqI purificada. Una cantidad fija de enzima se puede incubar con un microgramo de ADN lambda en una reacción de cincuenta microlitros mantenida a un intervalo de temperaturas (típicamente de 25 a 85°C) durante una hora. La temperatura óptima es aquella a la que se observa la mayor digestión (por ejemplo, según se evalúa mediante electroforesis en gel de los fragmentos de restricción por TaqI de ADN lambda resultantes). Como alternativa, una unidad de enzima se define como la cantidad de proteína requerida para digerir completamente un microgramo de ADN lambda en una

reacción de cincuenta microlitros en una hora a la temperatura óptima. Por lo tanto, la temperatura óptima es la temperatura a la que la cantidad de proteína requerida para lograr la digestión completa es la más baja. Para definir la temperatura óptima en la célula, no se puede garantizar una relación definida de enzima a sustrato de ADN (como se usa en ensayos *in vitro*). En su lugar, se toma un enfoque más pragmático. Dado que es probable que la temperatura óptima *in vivo* sea similar a *in vitro*, se puede usar como guía el óptimo definido *in vitro*. La digestión del ácido nucleico por la nucleasa se examina en y alrededor de la temperatura óptima *in vitro*. La temperatura óptima es aquella a la que se observa la mayor digestión. Para algunas nucleasas, la temperatura óptima *in vivo* es un intervalo de temperaturas en lugar de un solo punto, puesto que se puede observar digestión completa de ADN genómico a lo largo del intervalo de temperaturas.

Los medios para obtener nucleasas termófilas, es decir, Taq I o Pho I, usadas en la presente invención, incluyen, pero no se limitan a: aislamiento a partir de termófilos, modificación de nucleasa homóloga para adquirir actividad termófila mediante modificación racional por ingeniería de la enzima y/o evolución dirigida. A diferencia de la mayoría de las células, los termófilos son organismos que aman el calor, con una temperatura de crecimiento óptima de 50°C o mayor. Por el contrario, la mayoría de las células crecen a una menor temperatura, y no pueden sobrevivir a la temperatura elevada preferida por los termófilos. Por ejemplo, los microbios comunes crecen a una temperatura entre 25 y 40°C, los cultivos de células de mamífero crecen a alrededor de 37°C, y los cultivos de plantas e insectos crecen a sus temperaturas bajas respectivas que son conocidas en la técnica. Las nucleasas termófilas pierden actividad rápidamente fuera de su temperatura óptima, y tienen baja a ninguna actividad a la temperatura a la que crecen microbios y cultivos celulares comunes. Los niveles de actividad de nucleasa de cada nucleasa termófila a una temperatura baja son diferentes, y de este modo se han de determinar individualmente. En la presente invención, una nucleasa termófila se considera latente a una temperatura baja si la actividad de nucleasa se reduce hasta menos de 20% de la actividad pico a la temperatura de reacción óptima de la nucleasa (ya sea conocida habitualmente o se puede determinar experimentalmente en las condiciones relevantes).

Los mejores candidatos a nucleasa termófila son aquellos cuyas actividades de nucleasa son suficientemente bajas a la temperatura de crecimiento normal para no imponer ningún esfuerzo significativo sobre el organismo hospedante, y son suficientemente elevadas a la temperatura de reacción óptima para llevar a cabo la degradación eficiente de los ácidos nucleicos del hospedante.

Debido a la propiedad de presentar actividad de degradación de los ácidos nucleicos a una temperatura que está fuera del intervalo de temperaturas en el que crece un organismo hospedante normal, el procedimiento según la invención se puede usar ventajosamente para degradar ácidos nucleicos de la célula hospedante de manera controlada, en el que la degradación se lleva a cabo durante la pasteurización de la célula hospedante. Por ejemplo, en una realización, la presente invención describe un procedimiento que usa un gen de nucleasa termófila heterólogo como se define aquí, que se introduce en una célula hospedante y de este modo se usa para degradar el ácido nucleico de una célula hospedante. Según la invención, el gen de nucleasa termófila se introduce en una célula hospedante cuyos ácidos nucleicos se van a degradar. La célula hospedante se hace crecer a su temperatura de crecimiento óptima, a la que la nucleasa termófila heteróloga está latente. Después de que la célula hospedante se hace crecer durante un período de tiempo hasta una cierta etapa, tal como en el momento de la cosecha de la célula, la actividad de la nucleasa termófila en la célula hospedante se puede activar cambiando la temperatura a aquella que sea óptima para la actividad de nucleasa y como se define aquí para Taq I o Pho I. Mediante la activación de la nucleasa termófila, los ácidos nucleicos de la célula hospedante son degradados por la nucleasa seleccionada de Taq I o Pho I, eliminando de este modo las actividades de los ácidos nucleicos de la célula hospedante.

Una nucleasa termófila se puede introducir en una célula hospedante, y de este modo se puede usar para degradar el ácido nucleico de una célula hospedante. Como alternativa, se pueden introducir en una célula hospedante dos o más nucleasas termófilas. La introducción de nucleasas termófilas adicionales puede potenciar, por ejemplo, la eficiencia de la degradación del ácido nucleico.

El método anterior de degradación del ácido nucleico se puede llevar a cabo en cualquier escala que oscila desde la fermentación en la mesa de laboratorio hasta la de la escala comercial. Como se describe en la sección de antecedentes de esta solicitud, se prefiere que el ADN de la célula hospedante, especialmente ADN recombinante, se degrade al final del procedimiento de fermentación. La presente invención proporciona un procedimiento para degradar el ADN recombinante en la biomasa, y de este modo inactivar cualquier ADN recombinante. La biomasa puede ser, por ejemplo, células cosechadas a partir de cultivo de microorganismo o cultivo de células eucariotas superiores.

La presente invención proporciona un procedimiento de fermentación mediante el cual el ADN recombinante en la biomasa se inactiva en condiciones como se definen aquí. Las etapas metodológicas para tal procedimiento se ejemplifican como sigue: en primer lugar, el gen que codifica la nucleasa termófila según la invención se introduce en la célula hospedante. La integración de un constructo de ácido nucleico que contiene el gen de una nucleasa termófila en la célula hospedante puede tener lugar intracromosómicamente o extracromosómicamente. En segundo lugar, la célula hospedante se hace crecer en un fermentador a una temperatura que es óptima para el crecimiento de la célula hospedante. En tercer lugar, al final del procedimiento de fermentación, la temperatura del fermentador se eleva hasta la temperatura óptima de la nucleasa termófila, y de este modo activa la nucleasa, en el que la

degradación se lleva a cabo durante la pasteurización de la célula hospedante. La mayor temperatura se mantiene durante un período de tiempo para permitir una degradación suficiente del ADN (recombinante o no) en la célula hospedante. Subsiguientemente, la biomasa se recoge y se procesa adicionalmente para aislar el producto final. En esta realización, la cantidad de producto final no se ve afectada por la acción de la nucleasa o por el tratamiento térmico usado para activar la nucleasa.

La nucleasa termófila que se usa según la invención puede ser, por ejemplo, la endonucleasa TaqI de *Thermus aquaticus*. TaqI tiene una temperatura óptima de 65°C. Se pueden estudiar otras nucleasas termófilas en busca de su idoneidad. Ejemplos de nucleasas termófilas adicionales incluyen Tsp509I, que tiene una temperatura óptima de 65°C, MwoI, que tiene una temperatura óptima de 60°C, PhoI, que tiene una temperatura óptima de 75°C, BsaI, que tiene una temperatura óptima de 60°C, y BspQI, que tiene una temperatura óptima de 50°C.

Dentro del alcance de la presente invención, se prefiere que la temperatura para degradar el ácido nucleico sea la temperatura que se sabe que tiene la actividad óptima de la nucleasa termófila específica. Por ejemplo, una temperatura preferida para degradar ácidos nucleicos de la célula hospedante usando la nucleasa termófila TaqI es 65°C, debido a que se sabe que TaqI es lo más activa a 65°C. Sin embargo, la temperatura óptima según la presente invención no está limitada a un único punto de temperatura. Según la presente invención, también se prefiere que la temperatura para degradar el ácido nucleico sea cualquier temperatura que esté en un intervalo de  $\pm 5^\circ\text{C}$  de la temperatura óptima conocida de la nucleasa termófila. En el caso de TaqI, por ejemplo, una temperatura preferida es cualquier temperatura que caiga entre 60°C y 70°C. Se prefiere particularmente que una temperatura que caiga en  $\pm 1^\circ\text{C}$ ,  $\pm 2^\circ\text{C}$ ,  $\pm 3^\circ\text{C}$ , o  $\pm 4^\circ\text{C}$  de la temperatura óptima conocida de la nucleasa termófila sea la temperatura para activar la nucleasa termófila. De este modo, la frase "temperatura óptima" de una nucleasa, como se usa en la presente invención, se refiere a una temperatura que está dentro de  $\pm 5^\circ\text{C}$  de la temperatura óptima conocida de la nucleasa termófila.

El procedimiento de degradación del ácido nucleico según la presente invención se puede llevar a cabo de forma relativamente rápida, y de este modo ahorra coste de energía. El procedimiento de degradación del ácido nucleico se puede llevar a cabo a la temperatura óptima de la nucleasa termófila durante menos de 48 horas, menos de 24 horas, menos de 1 hora, menos de 40 minutos, menos de 30 minutos, o menos de 20 minutos. Como se describe en el párrafo anterior, la temperatura óptima se define ampliamente como aquella que incluye cualquier temperatura que esté en un intervalo de  $\pm 5^\circ\text{C}$  de la temperatura óptima conocida de la nucleasa termófila. Hasta el grado en el que la degradación de ácidos nucleicos se pueda llevar a cabo en un intervalo de temperaturas sin comprometer su eficiencia, una temperatura preferida es la temperatura más baja en el intervalo de temperaturas.

La presente invención se puede usar en cualquier célula hospedante como se define y especifica anteriormente. Los ejemplos de células hospedantes incluyen microorganismos y células eucariotas superiores tales como cosechas agrícolas o células de animales en un tejido. Según la invención, los microorganismos pueden ser, por ejemplo, células procariotas, tales como bacterias o arqueobacterias, o células eucariotas, tales como levaduras, hongos inferiores o superiores, algas, o protozoos. Según una realización preferida, los microorganismos son células bacterianas, células fúngicas o levadura, o células de microalgas.

En ciertas realizaciones de la invención, el organismo cuyos ácidos nucleicos se pueden degradar según el método de la presente invención es un microbio de un género tal como, pero sin limitarse a, *Yarrowia*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Candida*, *Hansenula*, *Saccharomyces*, *Mortierella*, *Schizosaccharomyces*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Crypthecodinium*, *Schizochytrium*, y *Thraustochytrium*.

En una realización de la invención, la célula hospedante según la presente invención es *Yarrowia lipolytica*. Las ventajas de *Y. lipolytica* incluyen, por ejemplo, genética y biología molecular manejables, disponibilidad de la secuencia genómica, idoneidad para diversas condiciones de crecimiento económicas, y capacidad para crecer hasta una densidad elevada. Ya hay una extensa experiencia comercial con *Y. lipolytica*.

*Escherichia coli* es útil debido a que es la cepa bacteriana más comúnmente usada. Se ha usado de forma habitual como cepa portadora para ADN recombinante.

*Saccharomyces cerevisiae* es también una célula hospedante útil según la presente invención, particularmente debido a su manejabilidad experimental y a la amplia experiencia que los investigadores han acumulado con el organismo.

La célula hospedante según la presente invención también incluye células eucariotas superiores. La expresión "célula eucariota superior" significa una célula eucariota de un estado elevado de desarrollo, tal como aquellas que aparecen, por ejemplo, en organismos animales o vegetales. Las células eucariotas superiores no realizan todas las funciones bioquímicas y metabólicas vitales de forma independiente, y de este modo se hacen crecer como cultivo celular. La célula eucariota superior comprende, entre otras, todas las células de un mamífero, una planta, un insecto, o un ave. Según una realización de la invención, la célula eucariota superior procede de un mamífero. Según otra realización de la invención, la célula eucariota superior procede de una planta.

Según una realización de la invención, la degradación de los ácidos nucleicos de la célula hospedante se lleva a cabo sin afectar a los otros componentes celulares de la célula hospedante. En una realización preferida, la degradación de los ácidos nucleicos de la célula hospedante se lleva a cabo sin afectar la producción de los

compuestos biológicos y/o sustancias químicas finas que la célula hospedante está manipulada mediante ingeniería para producir. En una realización, la célula hospedante es una cepa de *Yarrowia*, y los compuestos biológicos que se manipulan genéticamente mediante ingeniería para producir incluyen: fitoeno, licopeno, beta-caroteno, alfa-caroteno, beta-criptoxantina, luteína, zeaxantina, astaxantina, cantaxantina, equinenona, 3-hidroxi equinenona, 3'-hidroxiequinenona, adonirrubina, violaxantina, y adonixantina. En una realización, la cepa de *Yarrowia* es una cepa de *Yarrowia* modificada genéticamente. En una realización específica, la célula de la cepa de *Yarrowia* modificada genéticamente, introducida con un gen de nucleasa termófila como se define aquí, es la cepa ML12924 de *Yarrowia lipolytica*, y el compuesto biológico producido es astaxantina. En otra realización, la célula de la cepa de *Yarrowia* modificada genéticamente, introducida con un gen de nucleasa termófila como se define aquí, es la cepa ML12921 de *Yarrowia lipolytica*, y el compuesto biológico producido es zeaxantina. En otra realización, la célula de la cepa de *Yarrowia* modificada genéticamente, introducida con un gen de nucleasa termófila como se define aquí, es la cepa ML12805 de *Yarrowia lipolytica*, y el compuesto biológico producido es licopeno.

En una realización de la invención, la optimización de codones se lleva a cabo a fin de potenciar el gen de nucleasa heterólogo en la célula hospedante. Se sabe en la técnica que la expresión de genes no nativos está dificultada por la existencia de variación en su patrón de uso de codones respectivo comparado con el organismo hospedante. Para superar estos problemas, la optimización de codones según la presente invención se lleva a cabo en el gen de nucleasa termófila para hacer coincidir el uso de codones del hospedante antes de que el gen se introduzca en la célula hospedante. Este proceso engloba la sustitución de codones raros en la secuencia de ADN del gen de nucleasa a fin de hacer coincidir lo mejor posible el sesgo del huso de codones del hospedante a la vez que retiene una identidad del 100% o una identidad de casi el 100% con respecto a la secuencia de aminoácidos original. Este proceso de optimización de codones también permite la modificación simultánea de estructuras secundarias de ARNm predichas que podrían resultar de cambios en el contenido de GC.

En la nucleasa termófila de la presente invención, el patrón del huso de codones se altera desde aquel típico del gen de nucleasa termófila para modificar los codones sin alterar la secuencia de aminoácidos codificada. Se conocen las secuencias de ácido nucleico para muchos genes de nucleasa termófila. Según esta invención, los segmentos del gen de nucleasa termófila se convirtieron en secuencias que tienen secuencias traducidas idénticas pero con un huso de codones alternativo.

En una realización de la invención, el patrón del huso de codones de la nucleasa termófila nativa *TaqI* (SEQ ID NO:2) se optimiza al sesgo de codones de *Y. lipolytica*. El gen *TaqI* de codones modificados resultante se especifica en SEQ ID NO:1. La secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2 se especifica en SEQ ID NO:3.

El gen *taqI* de codones modificados ilustrado en SEQ ID NO:1 sirve solamente como un ejemplo de muchos genes *taqI* posibles de codones modificados. Está claro para una persona experta que se podrían usar cualesquiera métodos adecuados de modificación de codones para modificar el gen de nucleasa termófila según la presente invención, y la secuencia resultante de usar métodos diferentes de modificación de codones puede variar. Habiendo descrito ahora generalmente esta invención, se entenderá más fácilmente haciendo referencia a los siguientes ejemplos específicos que se incluyen aquí con fines ilustrativos solamente, y no pretenden ser limitantes excepto que se especifique de otro modo.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

**EJEMPLOS**

La Tabla 1 a continuación describe ciertas cepas de *Yarrowia lipolytica* usadas en la siguiente ejemplificación:

Tabla 1: Cepas de *Yarrowia lipolytica*.

Número de cepa	Genotipo	Cómo se construyó
ML8195	<i>MATA erg9-4789::ura3 HMG-tr GGS carB carRP(E78G) ura3 ade1</i>	Técnicas de genética molecular clásicas y estándar
ML12805	ML8195 [pMB6722]	Transformación no dirigida
ML11956	<i>MATB erg9-4789::URA3HMG-tr GGS carB carRP crtW crtZ</i> (prototrófico)	Técnicas de genética molecular clásicas y estándar
ML12924	ML11956 [pMB6736]	Transformación no dirigida
ML11218	<i>MATB erg9-4789:: URA3 HMG-tr GGS carB carRP crtW crtZ-Xa crtZ-Dc crtW-Δ6180</i>	Técnicas de genética molecular clásicas y estándar
ML12921	ML11218 [pMB6736]	Transformación no dirigida

Las cepas ML8195, ML12805, ML11956, ML12924, ML11218 y ML12921 de *Yarrowia* se construyeron mediante la introducción de genes heterólogos bajo el control de los promotores constitutivos (por ejemplo, *TEF1*), acoplados con varias generaciones de mestizaje, partiendo de ML350 y ATCC201249. como se describe en la patente U.S. nº 7.851.199 B2. El gen *GG5* y el gen *HMG* truncado ("*HMG-tr*") se obtuvieron de secuencias de *Yarrowia lipolytica* que corresponden, respectivamente, a genes nativos de geranilgeranil pirofosfato sintasa y de hidroximetilglutaril-CoA reductasa. Los genes *carRP* and *carB* se obtuvieron de *Mucor circinelloides*, y codifican, respectivamente, una fitoeno sintasa/licopeno ciclasa bifuncional y una fitoeno deshidrogenasa. El gen *crtW* se sintetizó para codificar la caroteno cetolasa de *Parvularcula bermudensis*. El gen *crtZ* se amplificó a partir de *Xanthobacter autotrophicus* (*Xa*), o se sintetizó para codificar la caroteno hidroxilasa de *Enterobacter pulveris* (*Ep*) o la bacteria *Enterobacteriaceae* DC404 (*Dc*) (SEQ ID NO:7). Estos genes están asociados algunas veces, pero no siempre, con marcadores auxotróficos (*URA3*, *LEU2*, *URA2*, *LYS1*, *ADE1*) o un sitio *loxP*, remanente de un marcador de Hyg<sup>R</sup> (resistencia a higromicina).

**Ejemplo 1: Producción de plásmidos para construcción de cepas.**

Se generaron plásmidos para la expresión de nucleasa termófila *TaqI* como se describe en la Tabla 2. Una secuencia de ORF de la nucleasa *taqI* de codones optimizados se sintetizó *de novo* en base a la secuencia del gen de nucleasa *taqI* de *Thermus aquaticus* (SEQ ID NO:2), usando el sesgo de codones de *Y. lipolytica* como se especifica en SEQ ID NO:1. Este ORF de nucleasa *taqI* de codones optimizados se escindió usando *NheI* y *MluI*, y se ligó a pMB5082 cortado con *NheI* y *MluI* para producir pMB6722. La proteína de *TaqI* codificada resultante de pMB6722 se especifica en SEQ ID NO:3.

En un segundo plásmido, la misma secuencia del gen de nucleasa *taqI* se cortó del plásmido pMB6722 y se clonó en una cadena plasmídica diferente, pMB6157, para producir un nuevo plásmido, pMB6736.

Las construcciones plasmídicas se llevaron a cabo en base a procedimientos de biología molecular y manipulación de ADN básicos. Todos los procedimientos básicos de biología molecular y de manipulación de ADN descritos en este ejemplo y en otros se llevan a cabo generalmente según Sambrook et al. o Ausubel et al. (Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (eds). 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Nueva York; Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (eds). 1998. Current Protocols in Molecular Biology. Wiley: Nueva York).

Tabla 2: Plásmidos

Plásmido	Cadena principal	Inserto	Oligos o fuente
pMB6722	pMB5082 ( <i>URA3 tef1P-xprT</i> )	<i>taqI</i>	Fragmento de <i>NheI</i> - <i>MluI</i> sintetizado
pMB6736	pMB6157 (Hyg <sup>R</sup> <i>tef1P-xprT</i> )	<i>taqI</i>	Fragmento de <i>NheI</i> - <i>MluI</i> de pMB6722

**Ejemplo 2: Demostración de actividad de nucleasa de *Y. lipolytica* que expresa la nucleasa *TaqI***

En este ejemplo, el gen que codifica la nucleasa *TaqI* se introdujo en una cepa hospedante de *Y. lipolytica*. Se evaluó la actividad de la nucleasa *TaqI* en la cepa hospedante.

El plásmido pMB6722 se escindió con *XbaI* y se transformó en la cepa hospedante ML8195 (Tabla 1). La cepa ML8195 de *Yarrowia* es una cepa que se modificó previamente de forma genética para producir licopeno. Los transformantes introducidos con el gen de nucleasa *taqI* heterólogo se seleccionaron en placas de YNB glutamato; una de tales colonias se seleccionó y se designó como cepa ML12805 de *Yarrowia*. ML12805 se incubó durante 3 días a 30°C a 250 rpm en 20 ml de medio YPD en un matraz de 125 ml. Los cultivos se dividieron, y alícuotas de 1,5 ml se incubaron a 65°C o 25°C durante 5 min. hasta 24 h.

Se extrajo y se analizó ADN de las cepas ML8195 y ML12805 tras la incubación a 65°C o 25°C. El ADN se extrajo usando un protocolo de extracción de ADN genómico de levadura "Smash and Grab". Esencialmente, se peletizaron 1,5 ml de un cultivo de 3 días, se decantó el sobrenadante, y las células se resuspendieron en 0,5 ml de agua. Las células se peletizaron durante 10 segundos, y se decantó el sobrenadante. El pelete se resuspendió en 0,2 ml de disolución Smash and Grab (1% de SDS, 2% de Triton-X100, NaCl 100 mM, Tris 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM) y 0,2 ml de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, y se añadieron 0,3 g de perlas de vidrio. Los tubos se sometieron a vórtice durante 5 min. usando un soporte de múltiples tubos. A las mezclas, se añadieron 0,2 ml de TE pH 8,0, y se centrifugó durante 5 min. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo, y se añadió 1,0 ml de etanol frío y se mezcló para precipitar el ADN. Tras centrifugar durante 5 min., el sobrenadante se eliminó. El pelete se resuspendió en 0,4 ml de TE con RNasaA 75 µg/ml, y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Se añadieron 10 µl de acetato amónico 4 M y 1,0 ml de etanol. Tras incubar en hielo durante 5 minutos y centrifugar durante 10 minutos, el sobrenadante se desechó. El pelete se lavó con 0,5 ml de etanol al 70%, y se centrifugó 10 min. El sobrenadante se

desechó, y el pelete se secó al aire, y después se resuspendió en 100  $\mu$ l de TE. El ADN resultante procedente del procedimiento de extracción anterior se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% en TAE 1x a 100 V durante 1,5 h.

- 5 Como se muestra en la Fig. 1, la cepa hospedante de *Y. lipolytica* sin el gen de nucleasa *taqI* (ML8195) no presentó actividad de degradación del ADN a 65°C ni a 25°C. La cepa hospedante de *Y. lipolytica* que posee el gen de nucleasa *taqI* (ML12805) presentó actividad de degradación del ADN a 65°C pero no a 25°C. La actividad de degradación se observó tan temprano como 20 minutos después de que se incubó el cultivo celular a 65°C. La cepa ML12805 no presentó ninguna actividad de degradación del ADN a 25°C, incluso después de haberla incubado durante 24 horas, mostrando que la nucleasa *TaqI* en la cepa de *Y. lipolytica* está latente a 25°C.

#### 10 **Ejemplo 3: Perfil de actividad de *TaqI* con la temperatura**

En este ejemplo, se examinó la actividad de la nucleasa *TaqI* a diferentes temperaturas.

Las cepas ML12805 y ML8195 de *Y. lipolytica* se hicieron crecer durante 3 días como se describe en el Ejemplo 2. Alícuotas de 1,5 ml de células ML12805 y ML8195 se incubaron a temperaturas de 25°C, 30°C, 40°C, 50°C y 65°C durante 1,5 h, y el ADN se extrajo y se analizó como se describió en el Ejemplo 2.

- 15 Como se muestra en la Fig. 2, no se observó degradación del ADN a temperaturas de 25°C, 30°C, 40°C, y 50°C, en ambas cepas ML12805 y ML8195. Se observó degradación del ADN a 65°C, solamente en la cepa ML12805, como se mostró en el Ejemplo 2. Los resultados muestran que la nucleasa *TaqI* está latente a temperaturas iguales o por debajo de 50°C.

#### **Ejemplo 4: Análisis mediante PCR de ADN<sub>g</sub> digerido con *TaqI* *in vivo***

- 20 En este ejemplo, se examinó la degradación del gen *carB* heterólogo en una cepa recombinante de *Y. lipolytica*.

El gen *carB* tiene una longitud de 1740 nucleótidos y codifica fitoeno deshidrogenasa, una enzima en la ruta biosintética de carotenoides. *carB* se ha introducido en *Y. lipolytica* para permitir la producción de carotenoides. La cepa de *Y. lipolytica*, ML8195, un productor de licopeno, alberga el gen *carB*.

- 25 La presencia del gen *carB* se examinó en ambas cepas ML8195 y ML12805 tanto a 25°C como a 65°C. Se prepararon diluciones en serie de ADN genómico procedente de ML12805 incubada a 25°C o 65°C durante 24 horas. Se llevó a cabo la PCR sobre las muestras anteriores usando cebadores diseñados para amplificar un fragmento de 529 pb del gen *carB*. La secuencia del cebador MO4641 se especifica en SEQ ID NO:5. La secuencia del cebador MO4642 se especifica en SEQ ID NO:6. El fragmento de ADN del gen *carB* entre los oligos MO4641 y MO4642 contiene dos sitios de *TaqI*.

- 30 La PCR se llevó a cabo en las condiciones descritas a continuación. En cada reacción de 25  $\mu$ l, se combinó 1  $\mu$ l de ADN<sub>g</sub> diluido con 0,5  $\mu$ l de cada cebador (disolución madre 10  $\mu$ M), 0,5  $\mu$ l de agua y 22,5  $\mu$ l de Platinum *Taq* Super Mix. Los parámetros de reacción fueron 1 ciclo a 94°C durante 2 min., seguido de 45 ciclos a 94°C durante 30 s, 58°C durante 30 s, y 72°C durante 60 s. Un único ciclo final de 72°C durante 5 min. acabó la PCR en un termociclador Peltier MJ Research PTC-225. Toda la reacción, más tinte de carga 1x, se cargó sobre un gel de agarosa al 2% en TAE 1x con bromuro de etidio 0,5  $\mu$ g/ml, y se ensayó a 100 V durante 1,5 h.

- 35 Como se muestra en la Fig. 3, para la cepa de *Y. lipolytica* en la que se introdujo el gen de nucleasa *taqI* (ML12805), se observó un producto de PCR de 529 pb de *carB* en la muestra que se incubó a 25°C, pero no en la muestra que se incubó a 65°C. Estos resultados muestran que la nucleasa *TaqI* degradó el ADN recombinante (gen *carB*) en la cepa ML12805 cuando se incubó a 65°C. La Fig. 3 también ilustra que ADN extraño en la cepa ML12805 se puede degradar hasta un tamaño menor que 500 nucleótidos, puesto que no se observó en el gel ninguna banda distinguible de ADN de *carB* de 529 pb.

#### **Ejemplo 5a: Producción de astaxantina en una cepa de *Y. lipolytica* que alberga el gen de nucleasa termófila *taqI***

En este ejemplo, se examinó la producción de astaxantina en una cepa de *Y. lipolytica*, tanto antes como después de que se introdujo el gen de nucleasa *taqI*.

- 45 En este ejemplo, se usó una cepa de *Y. lipolytica* que produce astaxantina (ML11956). Una segunda cepa (ML12924) se construyó introduciendo el gen de nucleasa *taqI* (MB6736) en la cepa ML11956. Se midió la cantidad de astaxantina y sus precursores en ambas cepas. Se realizaron medidas en diferentes puntos de tiempo durante el período de crecimiento celular y después de que las cepas hospedantes se incubaron a 65°C.

- 50 Las cepas ML11956 y ML12924 se hicieron crecer en un fermentador usando un procedimiento de lote alimentado. Se tomaron muestras en diferentes puntos de tiempo durante el procedimiento de fermentación, y se llevó a cabo el análisis de carotenoides según los métodos descritos previamente en la patente U.S. n° 7.851.199 B2.

La Fig. 4 muestra que la cantidad de astaxantina aumentó a medida que creció la cepa ML11956, y la producción alcanzó eventualmente un estancamiento. La cantidad de astaxantina no cambió después de que ML11956 se



incubó a 65°C. En comparación, la cepa ML12924 se comportó de la misma manera que la cepa ML11956. La cantidad de astaxantina producida por la cepa ML12924 fue la misma que en la cepa ML11956 a lo largo del período de fermentación y tras la incubación a 65°C. La cantidad de precursores de astaxantina producida también permaneció sin cambio en las cepas ML11956 y ML12924 antes y después de la incubación a 65°C. Este resultado muestra que ni la introducción del gen de nucleasa *taqI* ni la activación de su actividad afectaron a la cantidad de astaxantina producida por *Y. lipolytica*.

#### **Ejemplo 5b: Producción de zeaxantina en una cepa de *Y. lipolytica* que aloja el gen de nucleasa termófila *taqI***

En este ejemplo, se examinó la producción de zeaxantina en una célula hospedante de *Y. lipolytica* con el gen de nucleasa *taqI*.

En este ejemplo, una cepa de *Y. lipolytica* que produce zeaxantina (ML11218) se transformó con un gen de nucleasa *taqI* (MB6736). En la cepa de *Y. lipolytica* resultante (ML12921), se midió la cantidad de zeaxantina y sus precursores producida. Se realizaron medidas en diferentes puntos de tiempo durante el período de crecimiento celular, y también se realizaron después de que la cepa hospedante se incubó a 65°C.

La cepa ML12921 se hizo crecer en un fermentador usando un procedimiento de lote alimentado. Se tomaron muestras en diferentes puntos de tiempo durante el procedimiento de fermentación, y el análisis de carotenoides se llevó a cabo según los métodos descritos previamente en la patente U.S. nº 7.851.199 B2.

La Fig. 5 muestra que la cantidad de zeaxantina aumentó a medida que creció la cepa ML12921, y la producción alcanzó eventualmente un estancamiento. La cantidad de zeaxantina producida no cambió después de que las células hospedantes se incubasen a 65°C. La cantidad de precursores de zeaxantina también siguió siendo la misma después de que las células hospedantes se incubasen a 65°C. En la cepa de control ML11218 (no mostrada), la producción de zeaxantina fue similar a ML12921 en todas las condiciones ensayadas. Este resultado muestra que la activación de la actividad de la nucleasa *TaqI* no afecta a la producción de zeaxantina en *Y. lipolytica*.

#### **Ejemplo 5c: Demostración de la actividad de la nucleasa *TaqI***

En este ejemplo, se examinaron las actividades de la nucleasa *TaqI* de las cepas ML11956, ML12924, y ML12921 de *Y. lipolytica* descritas en los Ejemplos 5a y 5b.

Las cepas ML11956, ML12924, y ML12921 se hicieron crecer en fermentadores. Para las cepas ML11956 y ML12924, se tomaron muestras a 46, 121 y 236 h después de la inoculación. Para la cepa ML12921, se tomaron muestras a 46 y 69 h después de la inoculación. Al final del procedimiento de fermentación (236 h para cepas de astaxantina y 69 h para cepas de zeaxantina), la temperatura se elevó hasta 65°C, y las cepas se incubaron a esta temperatura durante 6 horas. Se tomaron muestras a 0 min., 10 min., 30 min., 2 h y 6 h tras el desplazamiento hacia la mayor temperatura. El ADN se extrajo y se analizó como se describió en el Ejemplo 2.

Como se muestra en la Fig. 6, no se observó degradación del ADN en la cepa ML11956. Tanto en la cepa ML12924 como en la ML12921, se observó degradación del ADN después de que las células se incubaron a 65°C. El resultado anterior muestra que la nucleasa *TaqI* estaba latente a la temperatura de fermentación, pero fue activa a 65°C en cepas de *Y. lipolytica* que producen astaxantina o zeaxantina.

Todos los diversos aspectos, realizaciones y opciones descritos aquí se pueden combinar en cualquiera y en todas las variaciones.

Listado de secuencias

<110> DSM IP ASSETS B.V.

TRUEHEART, Joshua

MCGRATH, Jessica

<120> USO DE NUCLEASAS TERMÓFILAS PARA DEGRADAR ÁCIDOS NUCLEICOS

<130> 29097-WO-PCT[2]

<150> US61/794,400

< 151> 2013-03-15

<150> US61/928,080

< 151> 2014-01-16

<160> 13

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

< 211> 811

< 212> ADN

5 < 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Secuencia nucleotídica que contiene el gen taqI con codones optimizados

<400> 1

gctagccaca aaaatggctt ccaactcaggc tcagaaggct cttgagactt tcgagcgatt	60
tctcgccttct cttgacctgg agtcctacca gcagaagtac cgacccatca agactggtga	120
gcaggacctt ccccgagagc tgaaccccct tcccgcacctg tacgagcact actggaaggc	180
ccttgaggat aacccctcct tctcgggctt cgaggagttc tttgaccact ggtgggagaa	240
gcgacttcga cccctcgacg agttcattcg aaagtacttt tggggttgct cctacgcctt	300
tgttcgactt ggccttgagg ctcgactgta ccgaactgcc gtttccatct ggactcagtt	360
tcacttctgc taccgatgga acgcctcctg cgagcttccc cttgaggccg cccccgagct	420
tgacgccag ggcattgacg ccctgattca cacttccggt tcctctaccg gaatccagat	480
caagaaggag acttaccgat ccgaggcaa gtccgagaac cgatttctcc gaaagcagcg	540
aggcaccgcc ctcatcgaga ttccctacac ccttcagact cccgaggagc ttgaggagaa	600
ggccaagcga gcccgagtta acggagagac ttaccgactt tgggccaagg ttgctcacca	660
ccttgaccga cttgagaacg gttttgtcat ttttcgagag tcttacgta agtctattga	720
gcttttcctc cagaagaacg ctcccacctt ttctggactc attcgatggg accgagttgc	780
tcaggaggcc ctcaccgccc cctaaacgcg t	811

10 <210> 2

< 211> 792

< 212> ADN

< 213> Thermus aquaticus

<220>

15 < 223> gen taqI

<400> 2

ES 2 762 154 T3

atggcttcca cacaagccca gaaagcgctc gaaacttttg agcgttttct cgcaagcttg 60  
gacctcgagt cctaccagca aaagtaccgc cctatcaaaa cggttgaaca agacctgcct 120  
agggagctga acccgcttcc ggacctgtac gacattatt ggaaagcgct tgaggataac 180  
ccttccttcc tgggcttcga agagtctttt gaccactggt gggaaaagcg cctacggccc 240  
ttggacgagt tcatacgcaa atacttttgg ggatgctcct acgcgtttgt tcgcttgggc 300  
ctcgaggcta ggctgtaccg aacagccggt tccatctgga ctcaagttca cttctgctac 360  
cgctggaacg cctcctgcga gcttcctcta gaagctgccc cagaactcga cgcccaaggg 420  
atagacgcgc tgattcatac aagcgggtcc tcaacaggaa tccagatcaa aaaggaaact 480  
taccgttccg agccaagag cgagaaccgc tttttaagga agcaaagagg caccgccctc 540  
atcgagattc cctacaccct gcagacacca gaggagctcg aagaaaaagc caaacgggca 600  
agagtgaacg gagaaccta ccgtctatgg gccaaaggtg cacaccattt ggaccgtcta 660  
gaaaacggat tcgtcatttt tcgggaaagt tatgtgaaaa gcattgagct ttttctccag 720  
aaaaacgctc ctaccctatc tgggctcatc cgctgggaca gggtgggcca ggaagccctc 780  
accgccccgt ga 792

<210> 3

< 211> 263

< 212> PRT

5 < 213> Thermus aquaticus

<220>

< 223> Secuencia de aminoácidos de la nucleasa TaqI

<400> 3

Met	Ala	Ser	Thr	Gln	Ala	Gln	Lys	Ala	Leu	Glu	Thr	Phe	Glu	Arg	Phe
1				5					10					15	
Leu	Ala	Ser	Leu	Asp	Leu	Glu	Ser	Tyr	Gln	Gln	Lys	Tyr	Arg	Pro	Ile
			20					25					30		
Lys	Thr	Val	Glu	Gln	Asp	Leu	Pro	Arg	Glu	Leu	Asn	Pro	Leu	Pro	Asp
		35					40					45			
Leu	Tyr	Glu	His	Tyr	Trp	Lys	Ala	Leu	Glu	Asp	Asn	Pro	Ser	Phe	Leu
	50					55					60				
Gly	Phe	Glu	Glu	Phe	Phe	Asp	His	Trp	Trp	Glu	Lys	Arg	Leu	Arg	Pro
65					70					75					80

ES 2 762 154 T3

Leu Asp Glu Phe Ile Arg Lys Tyr Phe Trp Gly Cys Ser Tyr Ala Phe  
 85 90 95

Val Arg Leu Gly Leu Glu Ala Arg Leu Tyr Arg Thr Ala Val Ser Ile  
 100 105 110

Trp Thr Gln Phe His Phe Cys Tyr Arg Trp Asn Ala Ser Cys Glu Leu  
 115 120 125

Pro Leu Glu Ala Ala Pro Glu Leu Asp Ala Gln Gly Ile Asp Ala Leu  
 130 135 140

Ile His Thr Ser Gly Ser Ser Thr Gly Ile Gln Ile Lys Lys Glu Thr  
 145 150 155 160

Tyr Arg Ser Glu Ala Lys Ser Glu Asn Arg Phe Leu Arg Lys Gln Arg  
 165 170 175

Gly Thr Ala Leu Ile Glu Ile Pro Tyr Thr Leu Gln Thr Pro Glu Glu  
 180 185 190

Leu Glu Glu Lys Ala Lys Arg Ala Arg Val Asn Gly Glu Thr Tyr Arg  
 195 200 205

Leu Trp Ala Lys Val Ala His His Leu Asp Arg Leu Glu Asn Gly Phe  
 210 215 220

Val Ile Phe Arg Glu Ser Tyr Val Lys Ser Ile Glu Leu Phe Leu Gln  
 225 230 235 240

Lys Asn Ala Pro Thr Leu Ser Gly Leu Ile Arg Trp Asp Arg Val Ala  
 245 250 255

Gln Glu Ala Leu Thr Ala Pro  
 260

<210> 4

< 211> 1740

< 212> ADN

5 < 213> Yarrowia lipolytica

<220>

< 223> carB

<400> 4

atgtccaaga aacacattgt cattatcggg gctggcgtgg gtggcacggc tacagctgct 60

cgtttgccc gcgaaggctt caaggtcact gtggtggaga aaaacgactt tgggtggcggc 120

cgctgctcct tgatccatca ccagggccat cgctttgatc agggcccgtc gctctacctg 180

ES 2 762 154 T3

atgcccaagt actttgagga cgcctttgcc gatctggacg agcgcattca agaccacctg 240  
gagctgctgc gatgcgacaa caactacaag gtgcactttg acgacggtga gtcgatccag 300  
ctgtcgtctg acttgacacg catgaaggct gaattggacc gcgtggaggg cccccttggg 360  
tttggccgat tcctggattt catgaaagag acacacatcc actacgaaag cggcaccctg 420  
attgcgctca agaagaattt cgaatccatc tgggacctga ttcgcatcaa gtacgctcca 480  
gagatctttc gcttgcaacct gtttggaag atctacgacc gcgcttccaa gtacttcaag 540  
accaagaaga tgcgcatggc attcacgttt cagaccatgt atatgggcat gtcgccctac 600  
gatgcgctg ctgtctacag cctgttcgag tacaccgagt tcgctgaagg catctggtat 660  
ccccgtggcg gcttcaacat ggtggttcag aagctagagg cgattgcaaa gcaaaagtac 720  
gatgccgagt ttatctacaa tgcgcctggt gccaaagatta acaccgatga tgccaccaaa 780  
caagtgacag gtgtaacctt ggaatggc caccatcatc atgccgatgc ggttgtgtgt 840  
aacgcagatc tggctctatg ttatcacaat ctgttgctc cctgccgatg gacgcaaac 900  
aactggctt ccaagaattt gacgtcttct tccatttct tctactggtc catgtccacc 960  
aagggtgcctc aattggacgt gcacaacatc tttttggccg aggcttatca ggagagcttt 1020  
gacgaaatct tcaaggactt tggcctgcct tctgaagcct ccttctacgt caatgtgcc 1080  
tctcgcacg atccttctgc tgcctccgac ggcaaggact ctgtcattgt cttggtgcct 1140  
attggtcata tgaagagcaa gacggcgat gcttccaccg agaactacc ggccatggtg 1200  
gacaaggcac gcaagatggt gctggctgtg attgagcgtc gtctgggcat gtcgaatttc 1260  
gccgacttga ttgagcatga gcaagtcaat gatcccgctg tatggcagag caagttcaat 1320  
ctgtggagag gctcaattct gggtttgtct catgatgtgc ttcaggtgct gtggttccgt 1380  
cccagcacia aggattctac cgtctgttat gataacctat tctttgtggg tgcaagcacg 1440  
catcccggaa ctggtgttcc cattgtcctt gcaggaagca agctcacctc tgaccaagt 1500  
gtcaagagct ttggaaagac gcccaagcca agaaagatcg agatggagaa cacgcaagca 1560  
cctttggag agcctgatgc tgaatcgaca ttccctgtgt ggttctggtt gcgcgctgcc 1620  
ttttgggtca tgtttatggt cttttacttc ttccctcaat ccaatggcca aacgcccgca 1680  
tcttttatca ataatttgtt acctgaagta ttccgcgttc ataactctaa tgcatttaa 1740

<210> 5

< 211> 19

< 212> ADN

5 < 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Cebador M04641

<400> 5

caatctgttg cctccctgc 19

10 <210> 6

< 211> 19

ES 2 762 154 T3

< 212> ADN  
 < 213> Secuencia artificial  
 <220>  
 < 223> Cebador M04642  
 5 <400> 6  
 atcctttgtg ctgggacgg 19  
 <210> 7  
 < 211> 558  
 < 212> ADN  
 10 < 213> Yarrowia lipolytica  
 <220>  
 < 223> crtZ-Dc  
 <400> 7  
 atgcttgctg tgtggaatac cgggatcgtg ctactgacta tcatcatcat ggaaggggtg 60  
 gcaacgttcg cacacaagta catcatgcac ggctgggat ggggctggca tcattcgcac 120  
 cataccccgc gcaaaggggc gtttgagcgt aacgatctct atgcggtggt gtttgcgcta 180  
 ctggccattg cgtgattta cgcgggcagc gaaggtact ggccgcttca gtggattggc 240  
 gcgggaatga ccggctacgg cgtgatctac tttatcgttc acgatggtct tgtccaccag 300  
 cgctggccgt tccgttacgt gccgcgccgc ggctatctgc gccgcctcta catggcacac 360  
 cggctgcata acgcggtgcg ggggcgcgaa ggtgctctct ccttcgggtt tatctacgcc 420  
 ccaccggtgg acaagctgca ggcggtgctg cgcgaacgta acggcagacc cgccagcgcg 480  
 ggcgctgcca gaggtgcgga tcgcgcggcg gccagctcgc cttccgggaa gccatcgctt 540  
 gcttcgccc gaaataa 558  
 15 <210> 8  
 < 211> 977  
 < 212> ADN  
 < 213> Secuencia artificial  
 <220>  
 20 < 223> Secuencia nucleotídica que contiene el gen phol con codones optimizados  
 <400> 8  
 tgctagccac aaaaatggag atgtacaagg ttggtcgata cctcgttgat tccctccaga 60  
 tttacttccc cgcttctctt gagatccagg aggagcttat taacaacggc ttctacgttc 120  
 cccgatctcc tgatcgaaag gtttctatgc ccattcccat tgtttactcc gattttggtg 180  
 gtcgagttat ttctattgag cgactcattc ctcccgagtg gcttgagatt tctcccgagc 240  
 agctcggttg ggaggagact taccttgaga acaagcgagg tttcaagctc cctaaggagg 300

ES 2 762 154 T3

aggtttacgt tgatgtttct atttctaacg attccattat tttcgagctt gacgttaaga 360  
 actaccacct tgagcgaacc tccattcgag gcatcaacc tgagaagtgg aagaactggg 420  
 ttatgtttta cattgatctc aagtacgttg atgagttcat taacgctctt cgagagcaca 480  
 tccctgcttt cgagaacaag acccgagtta ttcgagagaa gcagcagggg ggcaaggagg 540  
 ttacttacta cgctaagggt aacgtcaaga acttctctct ttgtctcggg tgtttcgatc 600  
 tcgctcagcg ataccttcag atcaaggcta aggagcactg taacatttac cctggttctc 660  
 ccacctgtaa cgattctctc tctaagctca agctccgact tgagtacgat ccctccatta 720  
 ccacctttgc taaggttggg attgccaaaga tttctggtaa gcgaccccag atcatgggta 780  
 agctcacctc taccgagact aagaccattc gaggtattct caagcctgag attaagggta 840  
 aggcccaggg taagctcgtt tactgtgatc accgagagaa gcgacagtac attgctcttg 900  
 acctcttcga tttttacaag gccctcgttt ctactaagaa gtacgagggg aagctcccta 960  
 ccgatgatta aacgcgt 977

<210> 9

< 211> 957

< 212> ADN

5 < 213> *Pyrococcus horikoshii*

<220>

< 223> gen phol

<400> 9

atggaaatgt ataaggttg aagatacctt gttgattccc ttcaaatata ttttcccgt 60  
 tcactagaga tccaggagga gcttataaat aatggcttct acgtaccag gagcccagat 120  
 agaaaagtaa gcatgccaat tccaatagta tactccgatt ttggagggag ggttatatct 180  
 attgagaggt taatacctcc ggagtggctt gaaatctcgc cagagcaatt aggttgggaa 240  
 gaaacttatt tagagaacaa acgtggtttt aaactaccta aagaagaggt ctacgtggat 300  
 gttagtataa gcaacgattc cataatattc gagctagacg tgaaaaatta tcaccttgaa 360  
 aggacatcca ttagaggcat caatcctgaa aatggaaga attgggtgat gttttatatt 420  
 gatttgaagt acgtagatga gttcattaac gctttaaggg aacatatccc agctttcgaa 480  
 aataaaacaa gggttattcg tgaaaagcag caagggggca aggaagtac atattatgct 540  
 aaagttaacg tcaagaatth cagcttatgc ttaggatgct tcgatctcgc tcaaaggat 600  
 cttcaaatca aagctaaaga gcaactgtaac atatatccag gctcaccaac atgtaacgat 660  
 tctctaagca aattaaatt aaggcttgaa tacgatccat ccattactac ctttgctaaa 720  
 gttggaatag ccaagatctc aggcaagaga ccccagatca tggttaaatt aacctctacg 780  
 gaaactaaaa ctataagggg aataactaag ccagaaataa aaggttaaggc gcgtggtaaa 840  
 cttgtatatt gcgatcacag agaaaagaga cagtatatag ctttgactt gtttgatttt 900  
 10 tacaaggcct tggttaagcac taagaagtat gaaggttaagc taccgactga tgattaa 957

<210> 10

< 211> 318

ES 2 762 154 T3

< 212> PRT

< 213> Pyrococcus horikoshii

<220>

< 223> Secuencia de aminoácidos de la nucleasa Phol

5

<400> 10

Met Glu Met Tyr Lys Val Gly Arg Tyr Leu Val Asp Ser Leu Gln Ile  
1 5 10 15

Tyr Phe Pro Ala Ser Leu Glu Ile Gln Glu Glu Leu Ile Asn Asn Gly  
20 25 30

Phe Tyr Val Pro Arg Ser Pro Asp Arg Lys Val Ser Met Pro Ile Pro  
35 40 45

Ile Val Tyr Ser Asp Phe Gly Gly Arg Val Ile Ser Ile Glu Arg Leu  
50 55 60

Ile Pro Pro Glu Trp Leu Glu Ile Ser Pro Glu Gln Leu Gly Trp Glu  
65 70 75 80

Glu Thr Tyr Leu Glu Asn Lys Arg Gly Phe Lys Leu Pro Lys Glu Glu  
85 90 95

Val Tyr Val Asp Val Ser Ile Ser Asn Asp Ser Ile Ile Phe Glu Leu  
100 105 110

Asp Val Lys Asn Tyr His Leu Glu Arg Thr Ser Ile Arg Gly Ile Asn  
115 120 125

Pro Glu Lys Trp Lys Asn Trp Val Met Phe Tyr Ile Asp Leu Lys Tyr  
130 135 140

Val Asp Glu Phe Ile Asn Ala Leu Arg Glu His Ile Pro Ala Phe Glu  
145 150 155 160

Asn Lys Thr Arg Val Ile Arg Glu Lys Gln Gln Gly Gly Lys Glu Val  
165 170 175

Thr Tyr Tyr Ala Lys Val Asn Val Lys Asn Phe Ser Leu Cys Leu Gly  
180 185 190

Cys Phe Asp Leu Ala Gln Arg Tyr Leu Gln Ile Lys Ala Lys Glu His



ES 2 762 154 T3

195

200

205

Cys Asn Ile Tyr Pro Gly Ser Pro Thr Cys Asn Asp Ser Leu Ser Lys  
210 215 220

Leu Lys Leu Arg Leu Glu Tyr Asp Pro Ser Ile Thr Thr Phe Ala Lys  
225 230 235 240

Val Gly Ile Ala Lys Ile Ser Gly Lys Arg Pro Gln Ile Met Val Lys  
245 250 255

Leu Thr Ser Thr Glu Thr Lys Thr Ile Arg Gly Ile Leu Lys Pro Glu  
260 265 270

Ile Lys Gly Lys Ala Arg Gly Lys Leu Val Tyr Cys Asp His Arg Glu  
275 280 285

Lys Arg Gln Tyr Ile Ala Leu Asp Leu Phe Asp Phe Tyr Lys Ala Leu  
290 295 300

Val Ser Thr Lys Lys Tyr Glu Gly Lys Leu Pro Thr Asp Asp  
305 310 315

<210> 11

< 211> 800

< 212> ADN

5 < 213> Thermus aquaticus

<220>

< 223> Secuencia de ADN que codifica la nucleasa TaqI

<400> 11

ccatggcatc aacccaagca caaaaagccc tggaaacctt cgaacgcttc ctggcgagcc	60
tggacctgga atcataccaa cagaaatacc gtccgattaa aaccgtggaa caggatctgc	120
cgcgtgaact gaaccogctg ccggacctgt atgaacatta ctggaaagca ctggaagata	180
atccgtcctt tctgggcttc gaagaatddd tccatcactg gtgggaaaaa cgtctgcgcc	240
cgctggacga atttattcgc aaatatttct ggggctgcag ctacgcgttt gttcgtctgg	300
gtctggaagc gcgtctgtat cgcaccgcgc tcagcatctg gacgcaattt cattedtctgt	360
accgctggaa cgcctcttgt gaactgccgc tggaaagcgc accggaactg gatgcacagg	420
gcattgacgc tctgatccac accagtggca gctctacggg tatccaaatc aaaaaagaaa	480
cctaccgtag tgaagcaaaa tccgaaaatc gttttctgcy caaacagcgt ggtacggctc	540
tgattgaaat cccgtatacc ctgcaaacgc cggagaact ggaagaaaaa gcaaacctg	600
ctcgcgtcaa cggcgaacc taccgtctgt gggcgaagt ggcccatcac ctggatcgcc	660
tggaaaatgg tttgtgatt ttccgtgaat catacgttaa atcgatcgaa ctgttcctgc	720
agaaaaacgc cccgacctg tcgggcctga ttcgttggga ccgtgtcgca caagaagcac	780
tgaccgctcc gtgaggtacc	800

10

<210> 12

ES 2 762 154 T3

< 211> 29

< 212> ADN

< 213> Secuencia artificial

<220>

5 < 223> Cebador M09315

<400> 12

cacacacat ggctccact caggctcag 29

<210> 13

< 211> 34

10 < 212> ADN

< 213> Secuencia artificial

<220>

< 223> Cebador M09316

<400> 13

15 cacacagga ccttagggg cggtgagggc ctcc 34

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la producción de biomasa que comprende un compuesto biológico seleccionado del grupo que consiste en fitoeno, licopeno, beta-caroteno, alfa-caroteno, beta-criptoxantina, luteína, zeaxantina, astaxantina, cantaxantina, equinenona, 3-hidroxi equinenona, 3'-hidroxi equinenona, adonirrubina, violaxantina, adonixantina, ubiquinona, vitamina K, vitamina E, retinol, retinal, ácido retinoico, y palmitato de retinilo, que está libre de moléculas activas de ácido nucleico, comprendiendo dicho procedimiento:
- 5 a) fermentar una célula modificada genéticamente a una temperatura entre 25°C y 40°C;
- b) degradar los ácidos nucleicos de la célula modificada genéticamente cambiando la temperatura hasta al menos 50°C; y
- 10 c) recuperar el producto biológico aislado de la biomasa;
- en el que la célula modificada genéticamente que es capaz de producir dicho compuesto biológico y que tiene un óptimo de crecimiento entre 25°C y 40°C se selecciona de *Yarrowia*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Paracoccus*, *Corynebacterium*, *Candida*, *Hansenula*, *Saccharomyces*, *Mortierella*, *Schizosaccharomyces*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Cryptocodium*, *Schizochytrium*, o *Thraustochytrium*, que porta además una
- 15 secuencia de ácido nucleico heteróloga que codifica un gen de nucleasa termófila Taq I o Pho I con una actividad enzimática de 20% o menos comparada con la actividad de dicha Taq I o Pho I a la temperatura óptima, que es 65°C ± 5°C para Taq I y 75°C ± 5°C para Pho I, y
- en el que la degradación se lleva a cabo durante la pasteurización de la célula hospedante.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la célula modificada genéticamente se selecciona de *Yarrowia* o *Saccharomyces*.
- 20 3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que la célula modificada genéticamente es *Yarrowia lipolytica*.
4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el compuesto biológico se selecciona de fitoeno, licopeno, beta-caroteno, alfa-caroteno, beta-criptoxantina, luteína, zeaxantina, astaxantina, cantaxantina, equinenona, 3-hidroxi equinenona, 3'-hidroxi equinenona, adonirrubina, violaxantina o adonixantina.
- 25 5. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que Taq I es codificada por un polinucleótido según SEQ ID NO: 1 o 2 u 11, y Pho I es codificada por un polinucleótido según SEQ ID NOs: 8, o 9.
6. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que los ácidos nucleicos son ADN.
7. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la degradación se lleva a cabo a una temperatura entre 60°C y 70°C en una célula que porta un gen de Taq I heterólogo, o en el que la degradación se lleva a cabo a una temperatura entre 70°C y 80°C en una célula que porta un gen de Pho I heterólogo.
- 30 8. El procedimiento según la reivindicación 7, en el que la degradación se lleva a cabo a una temperatura de 65°C ± 5°C en una célula que porta un gen de Taq I heterólogo, y una temperatura de 75°C ± 5°C en una célula que porta un gen de Pho I heterólogo.

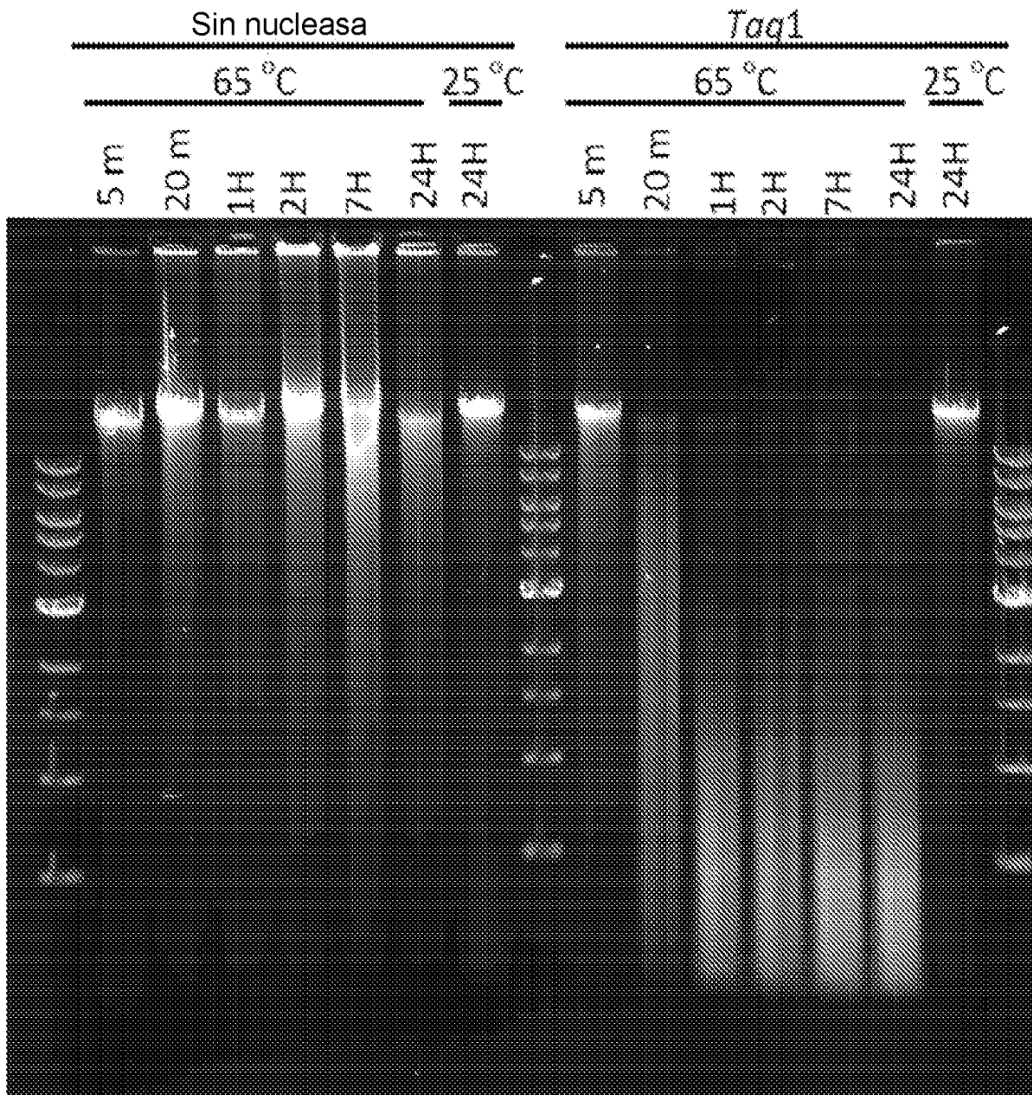


Figura 1

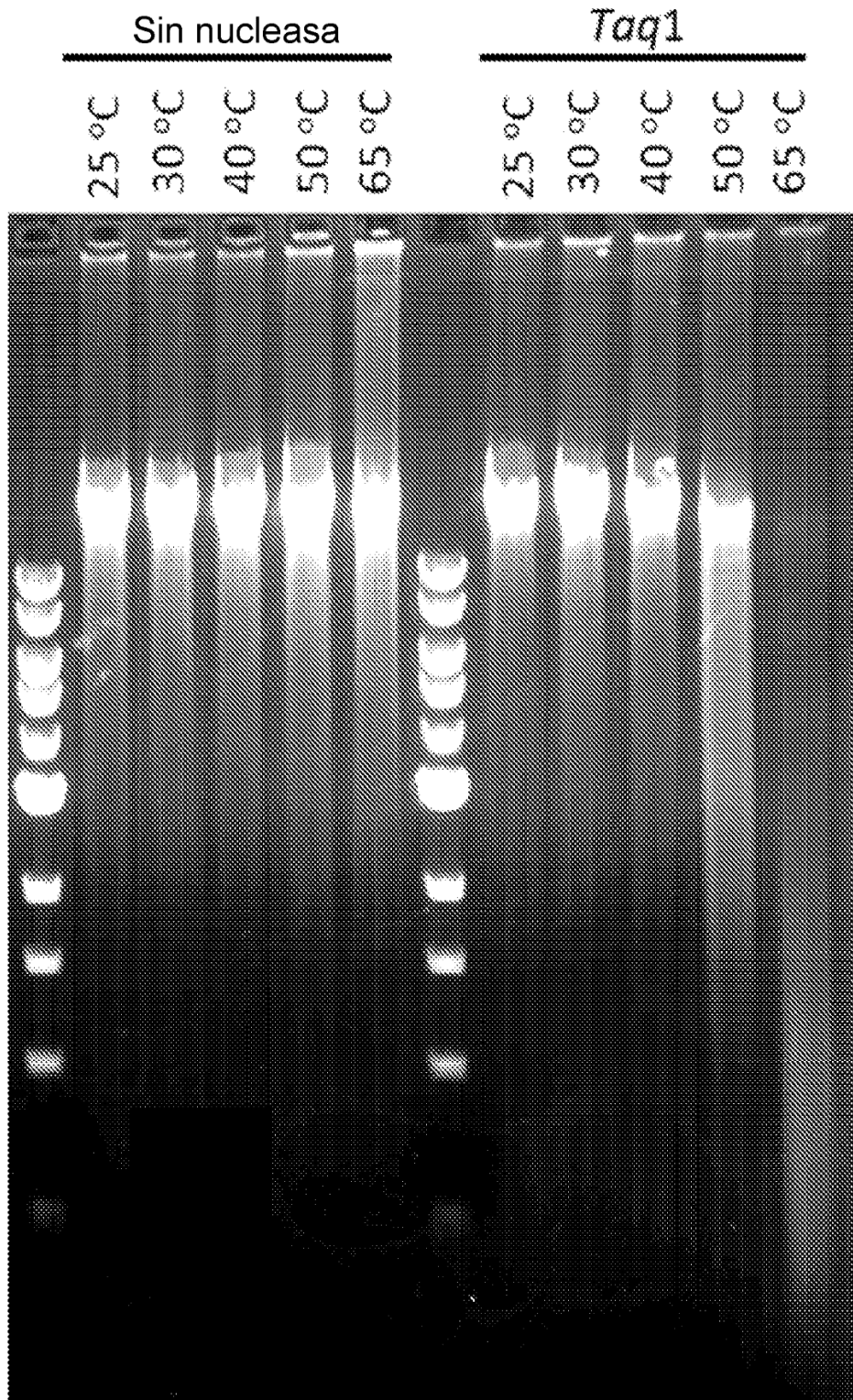


Figura 2

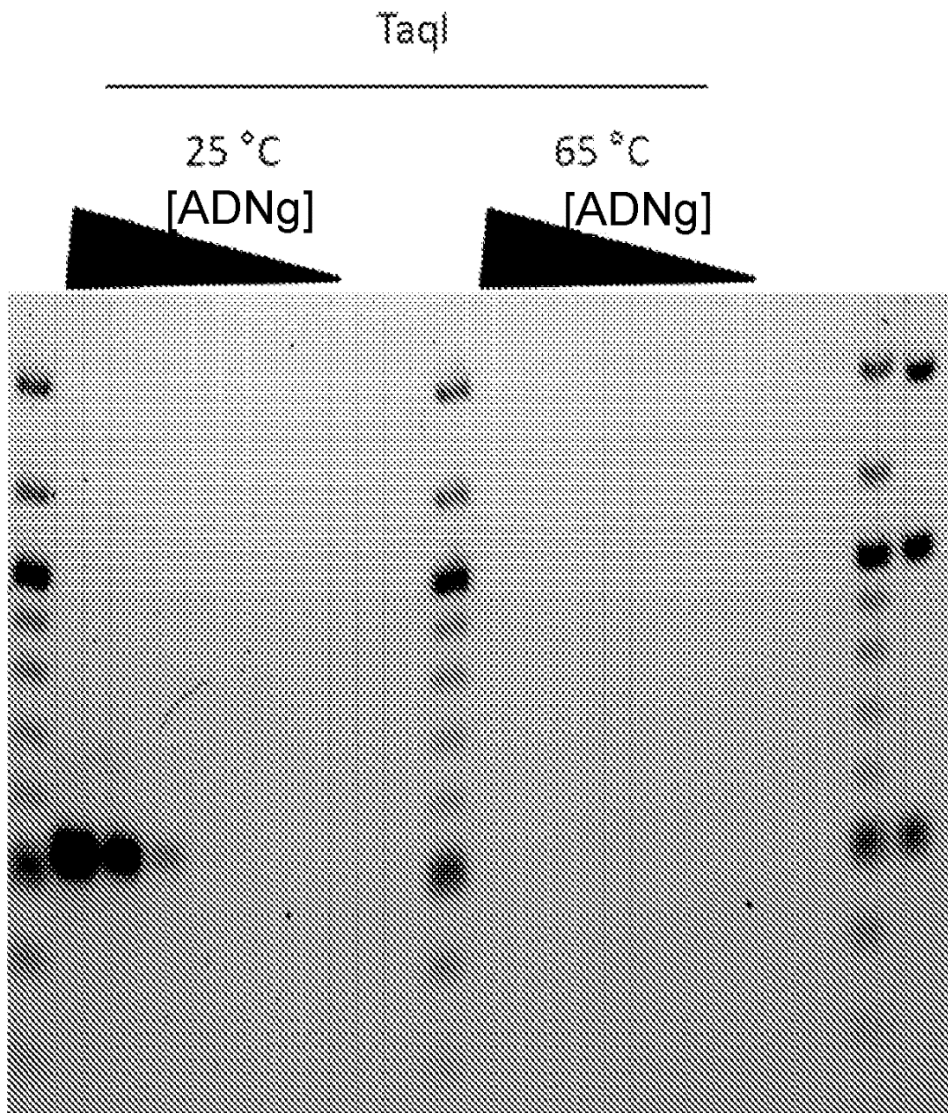


Figura 3

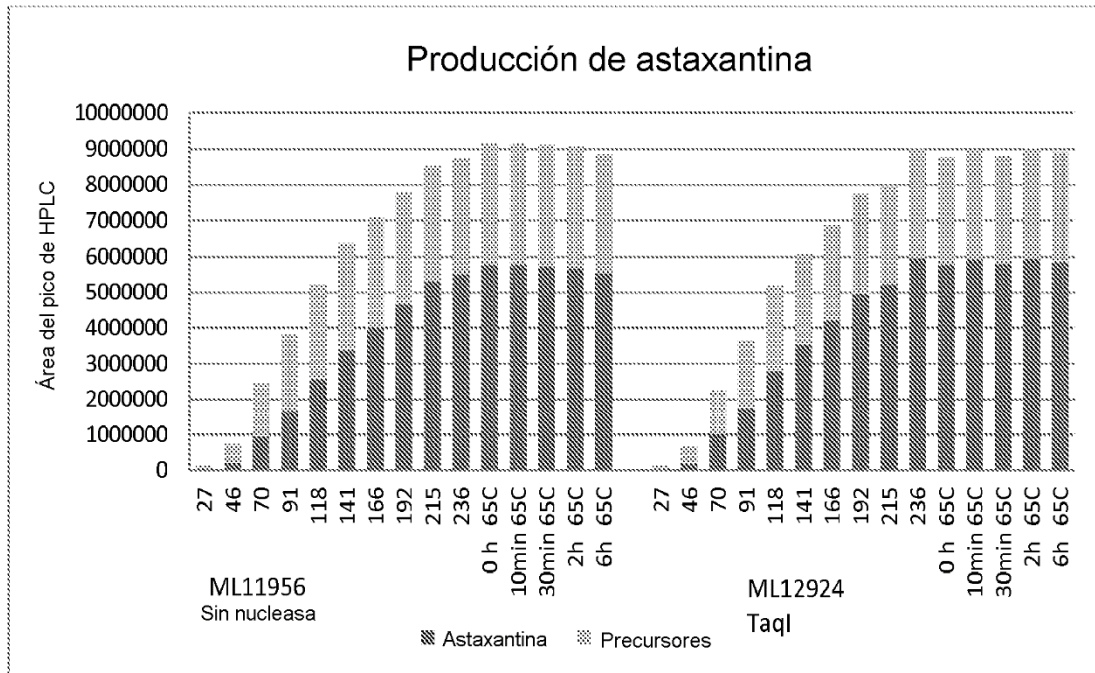


Figura 4

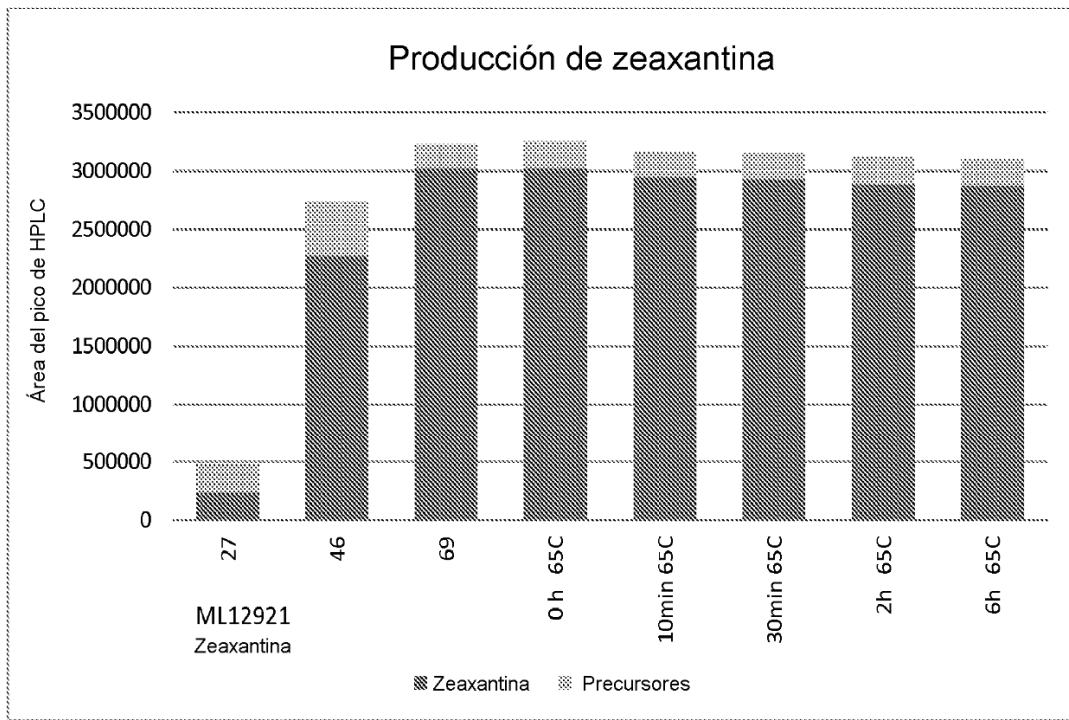


Figura 5



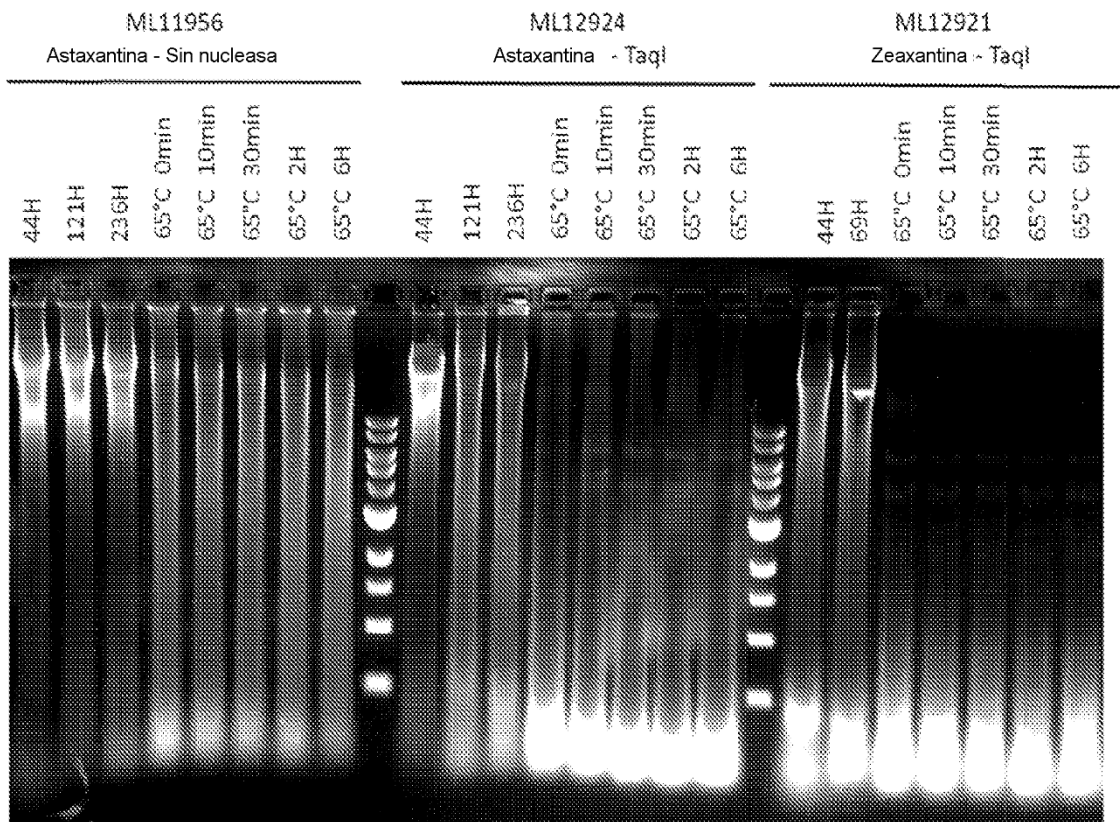


Figura 6

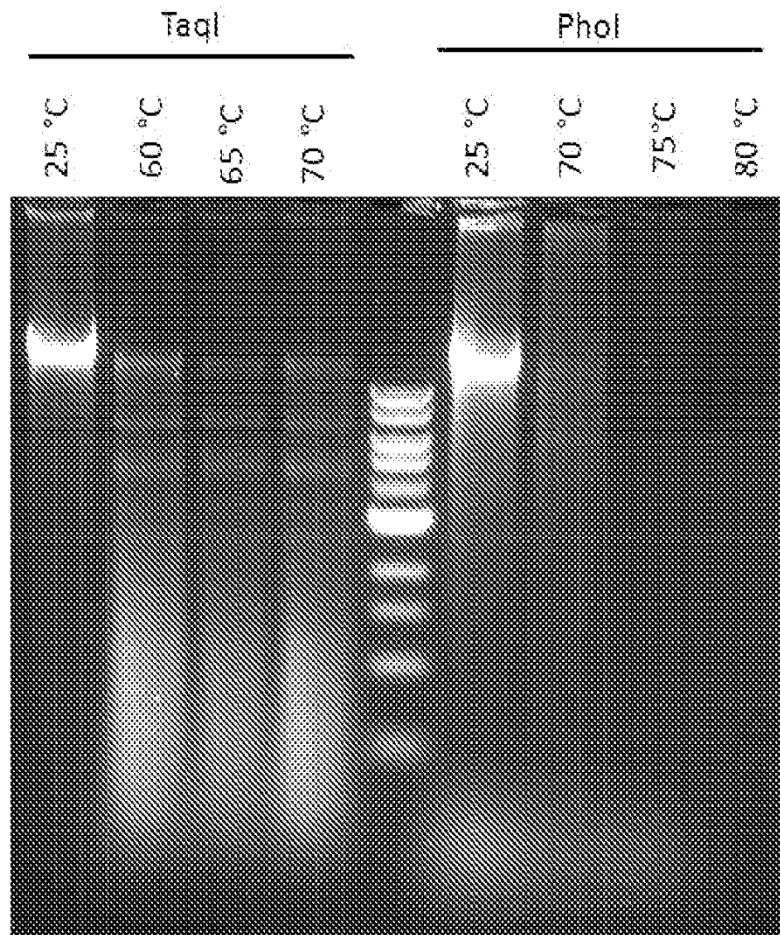


Figura 7

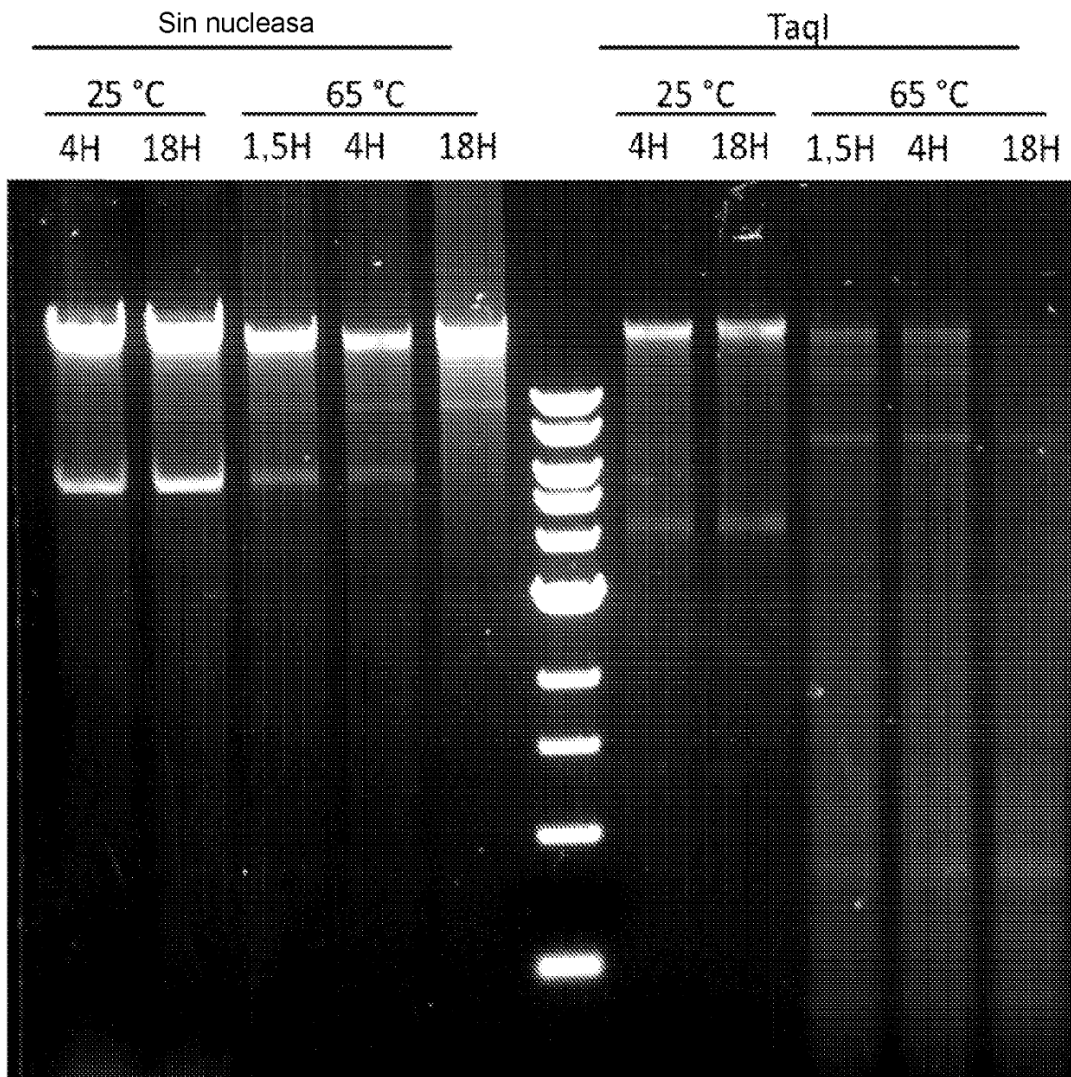


Figura 8



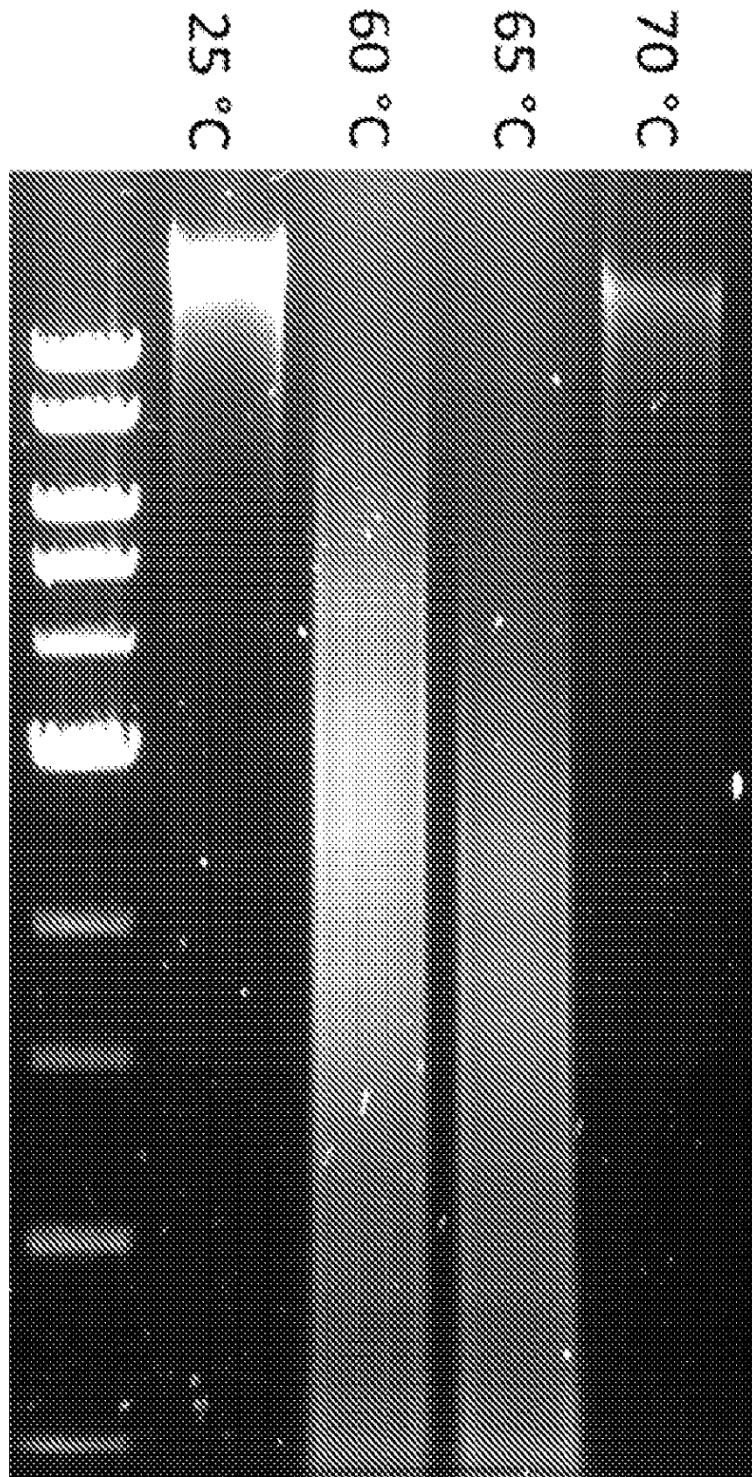


Figura 10