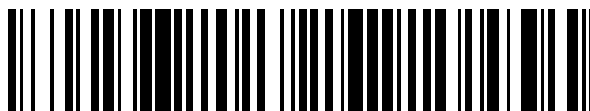


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 575 008**

51 Int. Cl.:

C12P 7/04 (2006.01)
C12N 9/04 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
C12N 15/29 (2006.01)
C12N 15/81 (2006.01)
C12P 7/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.07.2009 E 09784257 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.03.2016 EP 2310517**

54 Título: **Nuevas cepas de levadura mutantes capaces de acumular una gran cantidad de lípidos**

30 Prioridad:

11.07.2008 FR 0854786

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.06.2016

73 Titular/es:

**NSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE
AGRONOMIQUE (INRA) (50.0%)
147 Rue de l'Université
75007 Paris, FR y
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (CNRS) (50.0%)**

72 Inventor/es:

**NICAUD, JEAN-MARC;
CHARDOT, THIERRY y
BEOPOULOS, ATHANASIOS**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 575 008 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

Nuevas cepas de levadura mutantes capaces de acumular una gran cantidad de lípidos.

- 5 La creciente popularidad de las energías de sustitución ha provocado un aumento de las investigaciones de fuentes de energía sustitutivas.

Varias tecnologías, tales como la fermentación a gran escala, se aplican para la producción industrial de aceite a partir de microorganismos, utilizando como sustrato materias grasas o glicerol.

- 10 Entre las aplicaciones industriales potenciales de estos procesos se distingue particularmente la acumulación en los microorganismos de lípidos enriquecidos de ácidos grasos esenciales, estando dichos lípidos particularmente destinados a ser utilizados como complemento nutricional, o para la producción de combustible en forma de energía renovable como alternativa al petróleo.

- 15 Debido al aumento de la importancia económica de las fuentes de energía renovables, se constata un aumento del interés por la mejora de la composición y del contenido en aceite de los microorganismos, particularmente de las levaduras.

- 20 A este respecto, la levadura oleaginosa *Yarrowia lipolytica*, es una de las levaduras "no convencionales" más ampliamente estudiadas, debido a su capacidad para acumular una gran cantidad de lípidos (aproximadamente un 40% de su peso seco).

- 25 Las levaduras, particularmente la *Yarrowia lipolytica*, son capaces de utilizar eficazmente unos sustratos hidrófobos, por ejemplo unos alcanos, unos ácidos grasos y unos aceites, como única fuente de carbono.

Las cadenas alifáticas ingeridas se pueden utilizar para la producción de energía o acumular en formas inalteradas o modificadas.

- 30 Las moléculas de almacenamiento tales como los triglicéridos (TG) y/o los ésteres de esteroles (esterilésteres; SE), incapaces de integrarse en las biocapas de fosfolípidos, se agrupan para formar el núcleo hidrófobo de dichos cuerpos lipídicos (lipid bodies; LB).

- 35 Dichos cuerpos lipídicos se han considerado durante mucho tiempo como un almacenamiento de lípidos neutros que pueden ser movilizados en periodo de privación.

Sin embargo, la imagen de dichos cuerpos lipídicos como simple compartimento de almacenamiento se ha tenido que revisar desde que numerosas proteínas de dichos cuerpos lipídicos se han identificado como enzimas implicadas en el metabolismo lipídico, en particular en la síntesis y/o la degradación de los triglicéridos.

- 40 En las levaduras, la síntesis de los triglicéridos sigue la ruta de Kennedy. Los ácidos grasos libres son activados por la coenzima A (CoA) y utilizados para la acilación del glicerol, base de la síntesis de los triglicéridos.

- 45 En la primera etapa de ensamblaje de triglicéridos, el glicerol-3-fosfato (G-3-P) está acilado por la aciltransferasa específica del glicerol-3-fosfato (glicerol-3-fosfato aciltransferasa o SCT1) para dar el ácido lisofosfatídico, que es después acilado por la aciltransferasa específica del ácido lisofosfatídico (ácido fosfatídico aciltransferasa o SLC1) para dar el ácido fosfatídico (PA). Éste es después desfosforilado por una fosfohidrolasa específica del ácido fosfatídico (ácido fosfatídico fosforhidrolasa (PAP)) para liberar diacilglicerol (DAG).

- 50 En la última etapa, el diacilglicerol se acila o bien por una diacilglicerol aciltransferasa, o bien por una fosfolípido diacilglicerol aciltransferasa para producir triglicéridos.

La tabla 1 siguiente describe los genes implicados en el metabolismo de los ácidos grasos en las levaduras, particularmente en *Yarrowia lipolytica* (YL).

55

Tabla 1

Gen	Nombre	nº EC	Función
GUT1	YALI0F00484g	EC 2.7.1.30	Glicerol quinasa
GPD1	YALI0B02948g	EC 1.1.1.18	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (NAD(+))
GUT2	YALI0B13970g	EC 1.1.99.5	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa
SCT1	YALI0C00209g	EC 2.3.1.15	Glicerol-3-fosfato acil transferasa
SLC1	YALI0E18964g	EC 2.3.1.51	1-acil-sn-glicerol-3-fosfato aciltransferasa
DGA1	YALI0E32769g	EC 2.3.1.20	Diacilglicerol aciltransferasa
LRO1	YALI0E16797g	EC 2.3.1.158	Fosfolípido:diacilglicerol aciltransferasa

Gen	Nombre	nº EC	Función
TGL3	YALI0D17534g	EC 3.1.1.3	Triacilglicerol lipasa
TGL4	YALI0F10010g	EC 3.1.1.3	Triacilglicerol lipasa
ARE1	YALI0F06578g	EC 2.3.1.26	Acil-CoA:esterol aciltransferasa
TGL1	YALI0E32035g	EC 3.1.1.13	Colesterol esterasa
POX1	YALI0E32835g	EC 6.2.1.3	Acil-coenzima A oxidasa
POX2	YALI0F10857g	EC 6.2.1.3	Acil-coenzima A oxidasa
POX3	YALI0D24750g	EC 6.2.1.3	Acil-coenzima A oxidasa
POX4	YALI0E27654g	EC 6.2.1.3	Acil-coenzima A oxidasa
POX5	YALI0C23859g	EC 6.2.1.3	Acil-coenzima A oxidasa
POX6	YALI0E06567g	EC 6.2.1.3	Acil-coenzima A oxidasa
MFE1	YALI0E15378g	EC 4.2.1.74	Proteína beta-oxidación multifuncional
POT1	YALI0E18568g	EC 2.3.1.16	Peroxisomal Oxoacil Tiolasa

En las levaduras, la degradación de los ácidos grasos se produce por una β -oxidación, un proceso de varias etapas que necesita cuatro actividades enzimáticas diferentes.

- 5 En las levaduras, las enzimas están esencialmente localizadas en las peroxisomas, contrariamente a los mamíferos, en los que están localizadas en las mitocondrias y las peroxisomas.

La movilización de los lípidos acumulados se produce durante tres fases distintas:

- 10 (i) durante la fase exponencial, durante la cual se utilizan los compuestos lipídicos almacenados para la síntesis de los lípidos membranares para ayudar al crecimiento y a la división celular,
- (ii) durante la fase estacionaria, durante el agotamiento de los nutrientes, los ácidos grasos libres se liberan, muy lentamente, a partir de los triglicéridos y se someten a β -oxidación peroxisomal;
- 15 (iii) cuando las células salen de las condiciones de privación, por ejemplo a la salida de la fase estacionaria y a la entrada del ciclo de crecimiento vegetativo con suplementación en carbono, los depósitos lipídicos se degradan muy rápidamente en ácidos grasos libres.

- 20 Durante sus investigaciones, los inventores se han centrado en la importancia del glicerol-3-fosfato (G-3-P) en la formación de los triglicéridos.

Ya se sospechó que el glicerol-3-fosfato, localizado en las inclusiones lipídicas, desempeñaba un papel crucial en el metabolismo de los triglicéridos.

- 25 Existen dos vías de síntesis para el glicerol-3-fosfato.

En la primera, el glicerol-3-fosfato deriva del glicerol por medio de la glicerol quinasa codificada por el gen GUT1.

- 30 En la segunda vía, el glicerol-3-fosfato es directamente sintetizado a partir del dihidroxiacetona fosfato (DHAP) catalizado por la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (codificada por el gen GPD1). Esta última reacción es reversible y la formación de DHAP a partir de glicerol-3-fosfato se cataliza mediante una segunda isoforma de la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, cuyo gen se denomina GUT2.

- 35 Se entiende que, en el presente documento, la utilización del término "levadura" implica que se tienen en cuenta, incluso si no se precisa, las cepas de levaduras en general y preferentemente las cepas de levadura *Yarrowia lipolytica*.

- 40 De manera sorprendente e inesperada, los inventores han mostrado, por primera vez, que una extinción concomitante del gen GUT2 y de los genes responsables de la β -oxidación de los lípidos, como por ejemplo los genes POX, parcialmente (POX2 a POX5) o totalmente (POX1 a POX6), o también el gen MFE1 o el gen POT1, con el fin de bloquear la vía de la β -oxidación, permite aumentar aún más la acumulación de lípidos en las levaduras, particularmente en *Yarrowia lipolytica*. En efecto, en las levaduras, particularmente en *Yarrowia lipolytica*, 6 genes POX1, POX2, POX3, POX4, POX5 y POX6 codifican 6 isoformas de acil-CoA oxidasas implicadas, por lo menos
- 45 parcialmente a nivel de la β -oxidación. La extinción, parcial o total, de la expresión de estos genes que codifican estas isoenzimas conduce a la acumulación por las levaduras, particularmente en *Yarrowia lipolytica*, de ácido dodecanodioico, sin consumo de lípidos acumulados.

- 50 Es en base a estos descubrimientos que los inventores proponen una cepa mutante de levadura *Yarrowia lipolytica*, que no expresa el gen GUT2 y los genes responsables de la β -oxidación de los lípidos, particularmente los genes POX (1 a 6), siendo dicha cepa mutante capaz de acumular una gran cantidad de lípidos.

El documento Thevenieau *et al.*, (Fungal Genetics and Biology, san Diego, CA, US, vol. 44, n°6, 6 de mayo de 2007, páginas 531-542) divulga una cepa de levadura de *Yarrowia lipolytica* que no expresa el gen GUT2. No se da ninguna indicación sobre su capacidad para acumular unos lípidos.

La invalidación del gen GUT2 (YALI0B13970g) permite obtener unas cepas mutantes de levaduras, particularmente de levaduras *Yarrowia lipolytica*, capaces de presentar un aumento del nivel de lípido total acumulado y un aumento de la velocidad de acumulación de lípidos durante el crecimiento sobre glucosa y/o sobre lípidos. Estos mutantes son capaces de producir unos ácidos grasos n-2 por bloqueo parcial de la β -oxidación (un solo ciclo de β -oxidación). Así, partiendo de un ácido graso 18:1 (n-9), se acumula el producto de un ciclo de β -oxidación que es el 16:1 (n-9), el ácido (Z)-7-hexadecenoico.

Asimismo, la invalidación concomitante del gen GUT2 (YALI0B13970g) y de los genes responsables de la β -oxidación de los lípidos, particularmente de los genes POX permite obtener unos mutantes de levaduras, particularmente de *Yarrowia lipolytica*, capaces de presentar un aumento del nivel de lípido total acumulado, un aumento de la velocidad de acumulación de lípido durante el crecimiento sobre glucosa o sobre lípido y una ausencia de consumo de lípidos acumulados.

Según un modo particular, la invención tiene por objeto una nueva cepa de levadura, particularmente una cepa *Yarrowia lipolytica*, mutante, que no expresa ni el gen GUT2, ni por lo menos un gen responsable de la β -oxidación de los lípidos, siendo dicha cepa mutante capaz de acumular unos lípidos.

Según otro modo particular, la invención tiene por objeto una nueva cepa de levadura, particularmente una cepa *Yarrowia lipolytica*, mutante, que no expresa ni el gen GUT2, ni por lo menos un gen responsable de la β -oxidación de los lípidos seleccionados de entre los genes POX, MFE1 o POT1, ventajosamente los genes POX, parcialmente (POX2 a POX5) o totalmente (POX1 a POX6), siendo dicha cepa mutante capaz de acumular unos lípidos.

Preferentemente, según la invención dicha cepa *Yarrowia lipolytica*, mutante, no expresa ni el gen GUT2, ni los genes POX1, POX2, POX3, POX4, POX5 y POX6, siendo dicha cepa mutante capaz de acumular unos lípidos. Preferentemente, según la invención, dicha cepa es una cepa JMY1393, Δ gut2 Δ pox1-6, depositada en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM, Instituto Pasteur, 25, rue du Docteur Roux, F-75724 Paris Cedex 15) bajo el n° CNCM I-4169, el 28 de mayo de 2009.

La invención tiene también por objeto un procedimiento de obtención de una cepa de levadura, particularmente una cepa *Yarrowia lipolytica*, mutante, siendo dicha cepa mutante capaz de acumular unos lípidos

La técnica anterior describe diferentes métodos que pueden permitir la obtención de cepas de levadura, particularmente de las cepas *Yarrowia lipolytica*, que no expresan un gen.

Por ejemplo, se citará el método denominado POP IN/POP OUT que se ha utilizado en las levaduras, particularmente en *Yarrowia lipolytica*, para la delección de los genes LEU2, URA3 y XPR2, como se ha descrito en la revista de G. Barth *et al.*: (*Yarrowia lipolytica*, en: Nonconventional Yeasts in Biotechnology A Handbook (Wolf, K., Ed.), Vol. 1, 1996, p. 313-388. Springer-Verlag). Consiste en integrar un vector que comprende un gen de interés delecionado en el locus considerado, después en seleccionar la escisión de dicho vector e identificar un clon que, por recombinación, ha eliminado el gen salvaje y ha conservado el gen mutado.

Preferentemente, según la invención, se podrá utilizar un método que conduce a la invalidación del gen de interés.

Por invalidación de un gen de interés, se entiende según la invención, cualquier método que conduce a la no expresión de la proteína nativa codificada por dicho gen de interés, por modificación del encadenamiento de los nucleótidos que constituyen dicho gen, de tal manera que, aunque su traducción fuera efectiva, no conduciría a la expresión de la proteína nativa codificada por el gen de interés salvaje.

Preferentemente, según la invención, se utiliza un método que conduce a una extinción total de la expresión del gen de interés. Esto se puede realizar mediante una delección total del gen de interés, por una delección parcial del gen de interés, por la inserción de uno o varios nucleótidos en dicho gen de interés, volviendo dicho método utilizado no funcional el gen de interés (gen de interés invalidado), por lo menos codificando una proteína que no posee las propiedades de dicha proteína nativa. Se obtiene así una cepa de levadura que no expresa el gen de interés, que se denominará a continuación en el presente documento "cepa defectuosa en el gen de interés".

Se puede utilizar así el método SEP (Maftahi M., *et al.*; Yeast 12: 859-868) que se ha adaptado en *Yarrowia lipolytica* para la invalidación sucesiva de los genes POX (Wang H. J. *et al.*, 1999; J. Bacteriol., 181:5140-5148). Ventajosamente según la invención se utilizará el método SEP/cre desarrollado por Fickers *et al.* (2003, J. Microbiol. Methods 55/3:727-737) y descrito en la solicitud internacional WO 2006/064131. Es un método rápido y que no necesita la utilización de un marcador que permite una contra selección.

En resumen, este método consiste en

1) seleccionar un gen de interés de levadura, particularmente un gen de *Yarrowia lipolytica*, del cual se desea suprimir la expresión, ya sea por delección del gen, o por lo menos por invalidación;

2) construir un casete de invalidación por Reacción de Polimerización en Cadena (Polymerase Chain Reaction: PCR) o por clonación, que comprende las secuencias promotoras (P) y terminadoras (T) del gen de interés, que enmarcan un gen que codifica un marcador de selección (gen de selección), estando dicho gen de selección enmarcado a su vez a uno y otro lado de su secuencia por una (o unas) secuencia(s) de recombinación, permitiendo dichas secuencias de recombinación una recombinación entre sí que conduce a la eliminación de dicho gen que codifica el marcador de selección;

3) introducir dicho casete de invalidación obtenido en 2, en una cepa de levadura;

4) seleccionar una cepa de levadura defectuosa en el gen de interés, cepa que ha introducido por doble recombinación (doble cross-over) el gen marcador en lugar del gen de interés, conduciendo así a un gen de interés invalidado;

5) verificar la invalidación de dicho gen de interés en dicha cepa de levadura defectuosa en el gen de interés seleccionada en la etapa 4; y eventualmente

6) transformar dicha cepa seleccionada en la etapa 5 con un vector que permite la expresión de una recombinasa con el fin de obtener la eliminación del gen que expresa el marcador de selección;

7) aislar de la recombinasa una cepa de levadura defectuosa en el gen de interés, y que ha perdido el plásmido de expresión.

Ventajosamente, en la etapa 2, el marco de lectura del gen de interés se sustituye por la inserción de un gen marcador, enmarcado a su vez por unas secuencias repetidas que pueden permitir una recombinación que podrá conducir a la eliminación del gen marcador. Ventajosamente la o las secuencia(s) de recombinación es (o son) una (o unas) secuencia(s) loxP o una (o unas) secuencia(s) loxR o una (o unas) secuencia(s) derivadas de estas secuencias de recombinación, habiendo dicha (o dichas) secuencia(s) derivada(s) conservado la actividad de las secuencias de recombinación de origen.

Preferentemente, en la etapa 2, el gen que codifica el marcador de selección podrá estar enmarcado por unas secuencias de tipo loxP que, bajo la acción de la recombinasa cre se recombinan entre sí, dando lugar a un plásmido que comprende la secuencia del gen que codifica dicho marcador de selección.

La etapa 3 se puede realizar mediante cualquier método de transformación de las levaduras conocido de la técnica anterior. Ventajosamente, en lo que se refiere al cultivo de las cepas de levadura, así como también para todas las técnicas de biología molecular utilizables según la invención, se referirá a los manuales de referencia en la materia, a saber Sambrook (Sambrook, J., T. Maniatis y E.F. Fritsch, Molecular cloning: a laboratory manual. 2º ed ed. 1989, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press) o a Barth (Barth, G. y C. Gaillardin, Nonconventional Yeasts in Biotechnology, W. K., Editor. 1996, Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York. p. 313-388).

La etapa 4 del método consiste en la selección de las cepas de levaduras transformadas que expresan el marcador de selección.

La etapa 5 se puede realizar según cualquier método conocido y en particular por PCR según la técnica de Gussow *et al.* (Nucleic Acids Res. 17, 1989, 4000), y después confirmada por hibridación por transferencia Southern.

La etapa 6 se puede realizar como en la etapa 3. Ventajosamente, se utilizará un plásmido portador del gen que codifica la recombinasa cre (Sauer, B. (1987), Mol. Cell. Biol., 7, 2087-2096) que permite la recombinación de las secuencias loxP/loxR y la eliminación del marcador. Esta técnica es perfectamente conocida por la técnica anterior (Hoess, R. y Abremski, K. (1984) J. Mol. Biol., 181, 351-362).

La etapa 7 es una etapa estándar de cualquier método de selección de mutante que consiste en aislar un clon seleccionado por subcultivo sucesivo hasta la obtención de una cepa pura.

Precisamente, la invención tiene por objeto un procedimiento de obtención de una cepa de levadura, particularmente una cepa *Yarrowia lipolytica*, mutante, que no expresa el gen GUT2, caracterizada por que

- en una primera etapa, se construye un casete de invalidación que comprende las secuencias promotoras y terminadoras del gen GUT2 de levadura (SEC ID nº 1), particularmente de *Yarrowia lipolytica*, que enmarca un gen que codifica un marcador de selección (gen de selección), estando dicho gen de selección enmarcado a su vez a uno y otro lado de su secuencia por una (o unas) secuencia(s) de recombinación, permitiendo

dichas secuencias de recombinación una recombinación entre sí que conduce a la eliminación de dicho gen que codifica el marcador de selección;

- en una segunda etapa, se introduce dicho casete de invalidación obtenido en 1, en una cepa de levadura, particularmente una cepa *Yarrowia lipolytica*;
- en una tercera etapa se selecciona, de entre las cepas de levadura transformadas en la etapa 2, una cepa de levadura, particularmente una cepa de *Yarrowia lipolytica*, defectuosa para el gen GUT2, cepa que ha introducido por doble recombinación (doble cross-over) el gen marcador en lugar del gen GUT2, conduciendo así a un gen GUT2 invalidado (cepa gut2::URA3);
- en una cuarta etapa, se verifica la invalidación de dicho gen GUT2 en dicha cepa de levadura seleccionada en la etapa 3.

Según una variante de la invención, el procedimiento puede además presentar 2 etapas suplementarias, a saber:

- una quinta etapa durante la cual se transforma dicha cepa seleccionada en la etapa 4 con un vector que permite la expresión de una recombinasa con el fin de obtener la eliminación del gen que expresa el marcador de selección;
- una sexta etapa, durante la cual se aísla una cepa de levadura defectuosa para el gen GUT2, y que no expresa ya el gen marcador, denominada gut2.

Según la invención, en la primera etapa del procedimiento, se construye dicho casete de invalidación que comprende las secuencias promotoras y terminadoras del gen GUT2 de levaduras, particularmente de la cepa *Yarrowia lipolytica*, según la técnica descrita por Fickers *et al.* (2003, J. Microbiol. Methods 55/3:727-737). Para eso

- en una primera fase, se sintetizan, por ejemplo por PCR, y se purifican unos fragmentos de ADN que comprenden o bien la secuencia promotora (P) o bien la secuencia Terminadora (T) del gen GUT2 de levadura, particularmente de *Yarrowia lipolytica*, a partir de ADN, por ejemplo de ADN genómico, de levadura, particularmente de *Yarrowia lipolytica*, mva ventajosamente una cepa salvaje de levadura, aún más ventajosamente una cepa W29 de *Yarrowia lipolytica*, previamente purificada. Cuando se sintetizan estos fragmentos por PCR, se puede utilizar cualquier par de cebador compatible, particularmente con el ADN de *Yarrowia lipolytica*, los pares G3P-P1/G3P-P2 (SEC ID nº 2 y 3) para la parte P y G3P-T1/G3P-T2 (SEC ID nº 4 y 5) para la parte T. Ventajosamente, los cebadores G3P-P2 y G3P-T1 pueden comprender además cada uno la secuencia de un sitio de restricción, preferentemente un sitio raro, como por ejemplo un sitio seleccionado de entre las meganucleasas (Homing endonucleasas), tales como I-CeuI, I-SceI, PI-PspI, PI-SceI, preferentemente el sitio I-SceI;
- en una segunda fase, se solidariza mediante cualquier método conocido en biología molecular, un fragmento P y un fragmento T, ventajosamente por medio del sitio de restricción, ventajosamente el sitio I-SceI, para formar unos fragmentos de ADN P-sitio raro-T (denominados casetes de invalidación 2 o casetes de invalidación GUT2-PT);
- en una tercera fase, se introduce al sitio de restricción del casete de invalidación 2 un gen que codifica un marcador de selección, como por ejemplo un gen asociado a un fenotipo de auxotrofia o de carácter dominante; a título de marcadores de auxotrofia, se citarán por ejemplo URA3, LEU2, ADE2, HIS y LYS5. A título de marcadores dominantes, se citarán los genes de resistencia a los antibióticos, preferentemente el gen de resistencia a la higromicina (HYG), preferentemente un gen que codifica URA3, LEU2, ADE2, HYG, para formar unos fragmentos de ADN P-I-Sce I-marcador-I-Sce I-T (denominados casete de invalidación 1 o casete de invalidación GUT2-PUT cuando el gen marcador es el gen URA3, casete de invalidación GUT2-PLT cuando el gen marcador es el gen LEU2).
- en una cuarta fase, se purifica dicho casete de invalidación 1, ya sea por digestión del plásmido GUT2-PUT o GUT2-PLT por unas enzimas de restricción adecuadamente a uno y otro lado del casete de invalidación, o bien por PCR con los cebadores P1 y T1.

Según la invención, en la segunda etapa del procedimiento, se introduce el casete de invalidación 1 obtenido en la primera etapa, en una cepa de levadura, particularmente una cepa *Yarrowia lipolytica* salvaje como, por ejemplo, una cepa W29, o ventajosamente una cepa de levadura, particularmente una cepa *Yarrowia lipolytica*, que no expresa el gen de marcador de selección contenido en el casete de invalidación, como por ejemplo una cepa Po1d que es una cepa auxotrófica para la leucina (Leu⁻) y el uracilo (Ura⁻), descrita por G. Barth *et al.* (Non conventional Yeasts in Biotechnology A Handbook (Wolf, K., Ed.), Vol. 1, 1996, p. 313-388. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York) y clasificada bajo CLIB139 en la colección del CIRM (Centre International de Ressources Microbiennes, previamente titulado Collection de Levures d'Intérêt Biotechnologique (CLIB), o también la cepa JMY1202 (Leu⁻, Ura⁺, Δgut2PUT)] obtenida por complementación de la defeción Ura⁻ de la cepa Po1d por transformación de la

cepa Po1d con un casete de invalidación de GUT2-PUT o también de la cepa JMY1387 (Leu+, Ura+, Δ gut2PUT)] obtenida por complementación de la defeción Leu- de la cepa JMY1202 por transformación de la cepa JMY1202 con un fragmento de ADN que contiene el gen LEU2.

Aún más ventajosamente, en esta etapa se podrá utilizar una cepa de levadura que no realizará la β -oxidación de los lípidos, por ejemplo una cepa que no expresará los genes responsables de la β -oxidación de los lípidos, como los genes POX, MFE o POT1, ventajosamente una cepa que no expresa los genes POX, por lo menos los genes POX2, POX3, POX4 y POX5, preferentemente los genes POX1, POX2, POX3, POX4, POX5 y POX6, como por ejemplo las cepas descritas en la solicitud internacional WO 2006/064131 publicada el 22 de junio de 2006, preferentemente las cepas

MTLY37 (Leu+, Ura+; Δ pox5, Δ pox2, Δ pox3, Δ pox4::URA3),
MTLY40 (Leu+, Ura-; Δ pox5-PT, Δ pox2-PT, Δ pox3-PT, Δ pox4::ura3-41),
MTLY64 (Leu-, Ura-, Hyg+; Δ pox5, Δ pox2, Δ pox3, Δ pox4::ura3-41, leu2::Hyg),
MTLY66 (Leu-, Ura-; Δ pox5, Δ pox2, Δ pox3, Δ pox4::ura3-41, Δ leu2),
MTLY82 (Leu-, Ura-, Hyg+; Δ pox5, Δ pox2, Δ pox3, Δ pox4::ura3-41, Δ leu2, pox1::Hyg),
MTLY85 (Leu-, Ura-; Δ pox5; Δ pox2, Δ pox3, Δ pox4::ura3-41, Δ leu2, Δ pox1),
MTLY92 (Leu-, Ura-, Hyg+; Δ pox5, Δ pox2, Δ pox3, Δ pox4::ura3-41, Δ leu2, Δ pox1, pox6::Hyg),
MTLY95a (Leu-, Ura-; Δ pox5, Δ pox2, Δ pox3, Δ pox4::ura3-41, Δ leu2, Δ pox1, Δ pox6).

En esta etapa, cualquier método de transferencia conocido de la técnica anterior (véase "Sambrook") puede ser utilizado para introducir el casete de invalidación 1 en la cepa de levadura. Preferentemente, se podrá utilizar el método del acetato de litio y del polietilenglicol, descrito por Gaillardin *et al.* (Curr. Genet. 11, 1987, 369-375).

Según la invención, en la tercera etapa, es posible utilizar cualquier método de selección conocido por la técnica anterior compatible con el gen (o los genes) marcador(es) utilizados, siendo cualquier cepa seleccionada que expresa el gen marcador potencialmente una cepa de levadura defectuosa en el gen GUT2, URA3 o LEU2.

Según la invención, en la cuarta etapa, se verifica la invalidación de dicho gen GUT2 en dicha cepa de levadura seleccionada en la etapa 3, mediante cualquier método compatible descrito en la técnica anterior, preferentemente por PCR según la técnica de Gussow *et al.* (Nucleic Acids Res. 17, 1989, 4000), y después eventualmente confirmada por hibridación por transferencia Southern (Sambrook).

Las cepas mutantes obtenidas en esta etapa, susceptibles de acumular los lípidos, expresan el marcador de selección. Sin embargo, puede ser necesario poseer unas cepas mutantes, susceptibles de acumular los lípidos, pero que no expresen el marcador de selección. Así, el procedimiento según la invención puede además comprender una quinta y una sexta etapas que tienen como objetivo obtener tales cepas mutantes, susceptibles de acumular los lípidos, pero que no expresen el marcador de selección.

Según la invención, en la quinta etapa se transforma dicha cepa seleccionada en la etapa 4 con un vector que permite la expresión de una recombinasa con el fin de obtener la eliminación del gen que expresa el marcador de selección. A título de ejemplo, es posible introducir un vector replicativo que permite la expresión de la recombinasa cre y que posee el marcador de selección LEU2, como el vector pRRQ2 (Fickers, op. cit.).

Según la invención, en la sexta etapa, se aísla una cepa de levadura defectuosa en el gen GUT2, y que no expresa ya el gen marcador utilizado para la invalidación del gen GUT2, y que ha perdido eventualmente el plásmido replicativo que permite la expresión de la recombinasa, mediante cualquier método de selección o de aislamiento conocido por la técnica anterior, como por ejemplo el crecimiento en medio rico y/o el esparcimiento sobre medio rico que ya no permite seleccionar para el marcador de selección.

La invención tiene también por objeto la utilización de una cepa de levadura, particularmente una cepa *Yarrowia lipolytica*, mutante, capaz de acumular unos lípidos, por ejemplo una cepa según la invención, para la síntesis de lípidos, particularmente unos ácidos grasos y unos triacilglicerol. Preferentemente, según la invención, se utilizará una cepa *Yarrowia lipolytica*, mutante, capaz de acumular unos lípidos, ventajosamente una cepa que ya no expresa el gen GUT2 y los genes POX, muy ventajosamente la cepa JMY1393 (CNCM I-4196). Ventajosamente, según la invención, las cepas mutantes podrán ser utilizadas para la producción de ácidos grasos n-2, muy ventajosamente para la producción de 16:1 (n-9), el ácido (Z)-7-hexadecenoico.

La invención tiene también por objeto un procedimiento de síntesis de lípidos en el que

- en una primera etapa se cultiva, en un medio apropiado, una cepa de levadura, particularmente una cepa *Yarrowia lipolytica*, mutante, capaz de acumular unos lípidos, por ejemplo una cepa según la invención;
- en una segunda etapa, se recogen los lípidos producidos por el cultivo de la etapa 1.

Además de las disposiciones anteriores, la presente invención comprende también otras características y ventajas

que aparecerán a partir de los ejemplos y figuras siguientes, y que deben ser considerados para ilustrar la invención sin limitar su alcance.

Así, la figura 1 presenta un esquema de la construcción de mutantes de levadura que no expresa un gen de interés, aquí el gen GUT2 de *Yarrowia lipolytica*, por invalidación con la ayuda de un gen marcador.

: Gen de interés de levadura

: Genoma de la levadura

: Sitio de restricción raro (I-Sce 1)

: Secuencias repetidas

: marcador

P: Secuencias promotoras del gen de interés

T: Secuencias terminadoras del gen de interés

G3P-P1, G3P-P2, G3P-T1, G3P-T2: Cebadores para la síntesis de los fragmentos P y/o T por PCR;

ver1, ver2: Cebadores para la verificación de la invalidación por PCR;

(1) y (2): síntesis de los fragmentos P y T con inserción de un sitio raro en los extremos,

(3): fragmento P-sitio raro-T, después de la fusión de los fragmentos por PCR;

(4): Inserción al sitio raro del gen marcador enmarcado de secuencias de recombinación para obtener el casete de invalidación;

(5): Después de la transformación de la cepa, "crossover" doble entre el casete de invalidación y el genoma de la levadura;

(6): Resultado del "crossover" doble: sustitución del marco de lectura del gen de interés por el gen marcador;

(7): Gen de interés invalidado en la cepa de levadura después de la escisión del gen marcador por recombinación.

La figura 2 presenta en A el crecimiento de las cepas de tipo salvaje y de las cepas mutantes (D.O. a 600 nm) en función del tiempo (h), y en B la acumulación total de ácido graso, expresada en porcentaje del peso seco de la biomasa en función del tiempo (h).

○: cepa de tipo salvaje; □: cepa mutante Δ gut2; Δ : cepa mutante Δ gut2 Δ pox1-6)

Los resultados son los valores medios de tres experimentos independientes.

La figura 3 presenta la cantidad total de ácido graso de las cepas de tipo salvaje y de las cepas mutantes en porcentajes del peso seco de la biomasa al final del cultivo celular (24h).

Las cepas se cultivaron en los medios YNBD, YNBD_{0,5}O₃ y YNBD_{0,5}O₃ u.p.

Los resultados representan los valores medios de tres experimentos independientes.

: Cepa de tipo salvaje

: Cepa Δ gut2

: Cepa Δ gut2 Δ pox1-6

u.p.: ácido oleico ultra-puro (>98% de pureza)

La figura 4 presenta, en la parte A el número medio de cuerpos lipídicos en función del tiempo en una cepa salvaje y unas cepas mutantes, y en la parte B el porcentaje de la superficie de las células cubiertas por los cuerpos lipídicos.

Las cepas se cultivaron sobre YNBD_{0,5}O₃.

- : Cepa de tipo salvaje
: Cepa Δ gut2
: Cepa Δ gut2 Δ pox1-6

La figura 5 presenta la acumulación de los lípidos totales en forma de porcentajes del peso seco de la biomasa en función del tiempo (11h y 24h), separado en triacilglicerol y ácidos grasos libres después del cultivo sobre el medio YP₂D₄O₃.

- : ácidos grasos libres
: triacilglicerol.

La figura 6 presenta la evolución de la biomasa (•) y del porcentaje de lípidos (○) producidos en función del tiempo durante el cultivo de la cepa salvaje W29.

La figura 7 presenta la evolución de la biomasa (■) y del porcentaje de lípidos (□) producidos en función del tiempo durante el cultivo de la cepa mutante Δ gut2.

La figura 8 presenta la evolución de la biomasa (▲) y del porcentaje de lípidos (Δ) producidos en función del tiempo durante el cultivo de la cepa mutante Δ gut2 Δ pox1-6.

La figura 9 presenta el balance comparativo de los cultivos de las cepas

- : salvaje W29
: mutante Δ ut2
: mutante Δ gut2 Δ pox1-6

según:

- % lip max: contenido final de lípidos expresado en $\text{g}_{\text{lip}} \cdot \text{g}^{-1}$
 R S/lip: rendimiento de conversión del sustrato en lípidos en $\text{g}_{\text{lip}} \cdot \text{g}_{\text{glc}}^{-1}$
 P(lip): productividad volumétrica de la producción de lípidos en $\text{g}_{\text{lip}} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

Ejemplos

Material y métodos

Cepa de levadura y condiciones de cultivo

Las cepas de *Y. lipolytica*, utilizadas derivan de la cepa salvaje *Y. lipolytica*, W29 (ATCC 20460).

La cepa auxotrófica Po1d (Leu-, Ura-) se ha descrito anteriormente por Barth y Gaillardin [Nonconventional Yeasts in Biotechnology, W. K., Editor. 1996, Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York. p. 313-388].

La cepa prototrófica MTLY37 que contiene una invalidación de los cuatro genes POX que codifican para cuatro acil-CoA oxidasas (AOX) se ha descrito por Wang *et al.* (Wang, H.J., *et al.*, J Bacteriol, 1999. 181 (17): p. 5140-5148).

La cepa auxotrófica MTLY40 (Ura-) se ha obtenido por transformación de MTLY37, mediante un fragmento de 1,5 kb que lleva el alelo ura3-41, obtenido por PCR, seguida por la selección de transformantes sobre medio YNB-5FOA (Mlickova, K., *et al.*, Appl Environ Microbiol, 2004. 70(7): p. 3918-3924).

Medio de cultivo y condiciones de crecimiento

Para *E. coli*. las condiciones se describen en Sambrook y para *Y. lipolytica*, en Barth (op. cit.).

El medio rico YPD, el medio mínimo glucosa YNB y el medio mínimo suplementado de casamino-ácidos YNBcas se han preparado como se ha descrito anteriormente por Mlickova, K., *et al.* (op. cit.) Appl. Environ. Microbiol., 2004. 70(7): p. 3918-3924.

El medio mínimo YNB contiene un 0,17% de YNB_{ww} (medio YNB sin aminoácidos y sulfato de amonio; Difco, Paris, Francia), un 0,5% de NH₄Cl, un 0,1% de extracto de levadura (Bacto-DB) y 50 mM de tampón fosfato a pH 6,8.

Los medios suplementados de fuente de carbono son:

- el medio YNBD (glucosa al 2%, Merck, Fontenay-sous-Bois Cedex, Francia);
- el medio YNBG (glicerol al 2%, Merck);
- el medio YNBDO (medio suplementado con el 3% de ácido oleico de Merck puro al 60%);
- el medio YNBou.p. (medio suplementado con el 3% en ácido oleico de Flucka puro al 98%);
- el medio YNBO (YNBD_{0,5}O₃) utilizado para seguir la acumulación óptima y la removilización de los ácidos grasos es el medio YNB suplementado con el 0,5% de glucosa y el 3% de ácido oleico;
- el medio YP₂D₄O₃, utilizado para optimizar la acumulación de lípidos contiene el extracto de levadura (1%), proteosa peptona (2%), glucosa (4%) y ácido oleico (3%).

En caso de que fuera necesario, se añadirán uracilo (0,1 g/l) y leucina (0,2 g/l).

Para los medios sólidos, se añadió un 1,5% de agar.

El ácido oleico está emulsionado por sonicación, en presencia del 0,02% de Tween 40 (Mlickova, K., *et al.* (Appl. Environ. Microbiol., 2004. 70(7): p. 3918-3924).

Por regla general, los cultivos se han realizado de la siguiente manera:

A partir de caja YPD, se inocula un primer pre-cultivo en un medio YPD (15 ml en Erlenmeyers de 50 ml a 170 rpm, a 28°C durante 6h). Las células se utilizaron para inocular un pre-cultivo en el medio YNBD (50 ml en un Erlenmeyer de 500 ml a 170 rpm, a 28°C, durante una noche).

Para el cultivo, se recogieron unas células en crecimiento exponencial por centrifugación al día siguiente del pre-cultivo, y se resuspendieron en medio YNB fresco a una densidad óptica a 600 nm de 0,5.

Para determinar el crecimiento de las células, los cultivos se centrifugaron a 10000 x g durante 10 minutos, y el residuo de las células se lavó dos veces con unos volúmenes iguales de solución SB (9 g/l de NaCl - 0,5% BSA).

La biomasa producida se determinó midiendo la densidad óptica a 600 nm, y por la estimación del peso seco de las células después del calentamiento a 80°C durante 24h.

Técnicas generales de genética

Las técnicas generales de genética molecular se utilizaron como se ha descrito en Sambrook.

Las enzimas de restricción utilizadas provienen de Eurogentec SA (Liège, Bélgica).

El ADN genómico de levadura (salvaje o transformada) se ha preparado tal como se describe por Querol *et al.* (Appl. Environ. Microbiol., 1992. 58(9): p. 2948-2953).

Las amplificaciones por PCR se realizaron en un termociclador Eppendorf 2720, con o bien ADN polimerasa Taq (Promega, Madison, WI, USA), o bien ADN polimerasa Pfu (STRATAGENE, La Jolla, California).

La tabla 2 siguiente describe los cebadores utilizables según la invención:

Tabla 2

Cebadores	SEC ID nº	Secuencia (5'→3') ^a	Sitio de restricción introducido
G3P-P1	2	GCAGATCCACTGTCAAGCCG	
G3P-P2	3	<u>GCTAGGGATAACAGGGTAATGCGGTAGGAA</u> AGAGAAGTTCCGCG	I-SceI
G3P-T1	4	<u>GCATTACCCTGTTATCCCTAGCCGGACTATTT</u> CCCCGCAGC	I-SceI
G3P-T2	5	GCAGCCAGCAGCACGTAGTAG	
G3P-ver1	6	GAATGACGGGGGCAACGCAG	
G3P-ver2	7	CAGCAGCCACAAATAGCAGACTGCC	
LEU2-P1	8	<u>AATCTAGATGGTCAAGTGGAATCATGTTCC</u> TGG	XbaI

Cebadores	SEC ID nº	Secuencia (5'→3') ^a	Sitio de restricción introducido
LEU2-P2	9	<u>CATTACCCTGTTATCCCTAGGTTCCATTGTGG</u> ATGTGTGTGGTTG	I-SceI
LEU2-T1	10	<u>CTAGGGATAACAGGGTAATGCTCTGGGTCTG</u> CTGCCCTC	I-SceI
LEU2-T2	11	<u>AGTAAGCTTAGATCTGTTCCGAAATCAACGG</u> ATGCTCAACC	HindIII
POX1-P1	12	CATGGAGTGGATCGCTCGAGGACG	
POX1-P2	13	<u>GCATTACCCTGTTATCCCTAGCCAGGAGGAT</u> CGGTGAATGTG	I-SceI
POX1-T1	14	<u>GCTAGGGATAACAGGGTAATGCCTTGTTCGG</u> AGAAGAGGAGGACG	I-SceI
POX1-T2	15	CGGCAGTGGCTCACCAAGC	
POX1 ver1	16	ATCCAGACCTCCAGGCGGG	
POX1 ver2	17	GCTGCGTCTCAATCTGGCGAATG	
POX6-P1	18	CCAAGCTCTAAGATCATGGGGATCCAAG	
POX6-P2	19	<u>GCATTACCCTGTTATCCCTAGCGTTGAGGGA</u> CTGTTGAGAGAG	I-SceI
POX6-T1	20	<u>GCTAGGGATAACAGGGTAATGCGATGAGGA</u> AATTTGCTCTCTTGAGG	I-SceI
POX6-T2	21	ATCTCGAGATTGGTCCCCTCAAACACAC	
POX6 ver1	22	GCTCAAGAAGGTAGCTGAGTC	
POX6 ver2	23	CATTAAGTGTGAGATCAGCTCGC	

^a las secuencias subrayadas corresponden a los sitios de restricción introducidos.

5 Los cebadores P1, P2, T1 y T2 sirven para la construcción de los casetes de invalidación. Los cebadores ver1 y ver2 sirven para la verificación de la invalidación de los genes por PCR.

10 Los fragmentos de PCR se purificaron mediante el kit de purificación QIAGEN (Qiagen, Hilden, Alemania) y los fragmentos de ADN se recuperaron a partir de geles de agarosa utilizando un kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen, Hilden, Alemania).

Se utilizó el conjunto de programas Staden (Dear, S. y Staden, R. A sequence assembly and editing program for efficient management of large projects. Nucleic Acid Res. 19, 3907-3911 (1991)) para el análisis de las secuencias.

15 La transformación de las células de levadura se realizó según el método con acetato de litio descrito en Le Dall, M.T. *et al.* (Curr Genet, 1994. 26(1): p. 38-44).

Supresión de los genes GUT2, LEU2, POX1 o POX6, expresión de la recombinasa Cre y escisión del marcador

20 Los casetes de sobreexpresión se generaron por amplificación PCR según Fickers *et al.* (op. cit.) (J. Microbiol. Methods, 2003, v.55, issue 3 p. 727-737).

El fragmento PT se clonó en el plásmido PCR4 RBlunt-TOPO (vector TOPO-pCR4; Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) para obtener un primer plásmido denominado JME743.

25 El marcador URA3 se introdujo después en el sitio I-SceI del plásmido JME743 para obtener un segundo plásmido denominado JME744 que contiene el casete de invalidación gut2-PUT.

30 Para el gen LEU2, se utilizaron los pares de cebadores LEU2-P1/LEU2-P2 (SEC ID nº 8 y 9) y LEU2-T1/LEU2-T2 (SEC ID nº 10 y 11). El P1 se ha concebido para colocar un sitio de restricción XbaI en el extremo 5' del fragmento P, mientras que T2 se ha concebido para colocar un sitio de restricción HindIII.

35 Después de la amplificación por PCR, el fragmento PT se ha digerido por XbaI y HindIII y se ha clonado en los sitios correspondientes del plásmido pDRIVE (Qiagen, Les Ulis, Francia) para obtener un tercer plásmido denominado JME641. Después se introduce el marcador HPH (HYG) para obtener un cuarto plásmido denominado JME651. El marcador HPH (HYG), originario de un plásmido de *Escherichia coli*, permite la resistencia a la higromicina B (GRITZ & DAVIES, Yeast, vol.8, p.: 667-668, 1992;).

40 Para los genes POX1 o POX6, las secuencias PT se amplificaron con sus pares de cebadores respectivos POXn-P1/POXn-P2 y POXn-T1/POXn-T2 (véase la tabla 2) y se clonaron en extremos francos en el plásmido Bluescript KS⁺ (STRATAGENE).

Después de la transformación en *E. coli* DH5α y cultivo sobre LB Agar Xgal, se seleccionaron unas colonias blancas.

Las cepas MTLE34 y MTLE35 contenían los plásmidos portadores de los casetes POX1-PT y POX6 PT, respectivamente.

- 5 Las cepas MTLE36 y MTLE37 contenían los plásmidos POX1-PHT y POX2-PHT, respectivamente.

Los casetes de invalidación (PUT y PHT), obtenidos por PCR, se utilizaron para la transformación mediante el método con acetato de litio. Los transformantes se seleccionaron en un medio YNBcasa y YPDH, respectivamente.

- 10 La invalidación se verificó por PCR utilizando unos pares de cebadores ver1/ver2 (véase la tabla 2) y la escisión del gen marcador se realizó conforme a Fickers *et al.* (op. cit.) (J. Microbiol. Methods, 2003, v.55, issue 3 p. 727-737)

Microscopia óptica

- 15 Para los experimentos en microscopia óptica, se pre-fijaron 10 ml de un cultivo de levadura en crecimiento mediante 1,34 ml de solución de formaldehído (tampón fosfato 50 mM, pH 6,8; 0,5 mM MgCl₂; 4,8% de formaldehído) y se incubaron durante 1h a 28°C bajo agitación a 250 rpm. Las células pre-fijadas se recogieron, se resuspendieron a una densidad óptica a 600 nm de 2,5 en la solución de formaldehído y se incubaron durante 5h a temperatura ambiente. Después, las células se lavaron dos veces con tampón fosfato 50 mM (pH 6,8) y se almacenaron en un
20 tampón fosfato 0,1 M (pH 7,5) a una densidad óptica a 600 nm de 2,5 a 4°C hasta la observación en microscopia óptica.

Microscopia por fluorescencia

- 25 Para la visualización de los cuerpos lipídicos, se ha añadido rojo del Nilo (1 mg/ml solución en acetona; Bioprobe moléculaire, Montluçon Francia) a la suspensión celular (1/10 v/v) y se continuó con una incubación de 1h a temperatura ambiente.

- 30 Las células se recogieron, se lavaron dos veces con agua destilada y se resuspendieron en un tampón fosfato 50 mM (pH 6,8) a una densidad óptica a 600 nm de 2,5. El estudio se ha realizado con un microscopio óptico Olympus BX 51 con un objetivo X 100 en baño de aceite. Para las grabaciones, se ha utilizado el programa Photometrics CoolSNAP 2048 x 2048- element array, 7,4 x 7,4-µm pixel pitch (Roper Scientific, Inc Photometrics, PVCAM).

Determinación de los lípidos

- Los lípidos de un cultivo que presenta una densidad óptica a 10 de DO se han extraído o bien mediante el procedimiento de Folch *et al.* (Folch, J. *et al.*, J Biol Chem, 1957. 226(1): p. 497-509) para el análisis TLC, o directamente convertidos en sus ésteres metílicos utilizando unas células lipofilizadas según Browse, J., *et al.* (Anal Biochem, 1986. 152(1): p. 141-5) para el análisis por cromatografía en fase gaseosa.

- 40 La transmetilación completa se verificó mediante un método con BF₃ en el metanol (Athenstaedt, K., *et al.*, J Bacteriol, 1999. 181(20): p. 6441-8) y sobre placas TLC.

- 45 El análisis por cromatografía en fase gaseosa de los ésteres metílicos de ácidos grasos se ha realizado con la ayuda de un Varian 3900 equipado de un detector de ionización de llama y una columna Varian FactorFour vf-23ms, (3pA a 260°C [30 m, 0,25, 0,25 µm]).

- 50 Los ácidos grasos se han identificado por comparación con ésteres metílicos de ácidos grasos normalizados (Fatty Acid Methyl Ester, FAME, Cayman, Supelco, Sigma (Francia)) y cuantificados mediante el método de patrón interno añadiendo 50 µg de C17:0 comercial (Sigma).

Análisis de las clases de lípidos

- 55 Los lípidos totales se fraccionaron en triacilglicerol y ácidos grasos libres para la cuantificación de los lípidos utilizando una columna Isolute SPE Aminopropyle (IST, Francia, Paris, Francia). El acondicionamiento de la columna se realizó 3 veces con 3 ml de hexano normal a caudal normal. Se cargó 1 ml del conjunto de los lípidos extraídos mediante el método de Folch en CHCl₃ en la columna y se recogió la fracción de lípidos neutros.

- 60 La elución total de los lípidos neutros se ha realizado por lavado de la columna 3 veces con 3 ml de CHCl₃/isopropanol (2/1). La fracción de ácidos grasos libres se ha recogido lavando la columna 3 veces con 3 ml de ET₂O/ácido acético 2% con un caudal normal. El disolvente de las fracciones se evaporó bajo flujo de nitrógeno directo y la transmetilación se continuó para un análisis por cromatografía en fase gaseosa (Laffargue, A. *et al.*, Plant Physiol Biochem, 2007. 45(3-4): p. 250-7).

- 65 Se utilizaron unas placas TLC para las extracciones de verificación. La eficacia del procedimiento también se ha

verificado por comparación de los perfiles de cromatografía en fase gaseosa de las muestras fraccionadas o no.

Separación de los lípidos por TLC

Se utilizaron unas placas TLC (sílice G60, 20*20 cm, 0,25 mm de grosor) (Merck, Alemania). Se separaron las diferentes clases de lípidos utilizando un sistema de disolvente de doble desarrollo: Sistema A (media placa de migración): éter de petróleo/éter etílico/ácido acético: 20/20/0,8 (v/v/v); Sistema B (toda la placa de migración): Éter de petróleo/Et₂O 49/1 (v/v). Se pulverizó sobre las placas una solución al 5% de ácido fosfomolibdico y las bandas de lípidos se revelaron después de 10 min a 105°C.

Ejemplo 1: Obtención de la cepa mutante Δ gut2

Preparación del ADN genómico de la cepa salvaje *Yarrowia lipolytica*, W29

La cepa salvaje *Yarrowia lipolytica*, W29 se cultiva en caja YPD sólida durante 1 día a 28°C.

A partir de una colonia aislada, se incuba un cultivo YPD líquido (5 ml) durante 40 a 48 horas a 28°C bajo agitación (170 rpm).

Las células de 3 ml de cultivo se recogen por centrifugación a 13000 rpm durante 5 min.

El residuo se resuspende entonces en 500 µl de tampón Sorbitol (Sorbitol 1 M, Tris-HCl 0,1 M; pH 8; EDTA 0,1M).

Después de la adición de 50 µl de una solución zimoliasa a 3 mg/ml (Zymolyase 100T, Seikagaku Corp. Coger) y de 50 µl de β-mercaptoetanol (0,28 M), las células se incuban a 37°C durante 1h.

Las células se recogen entonces por centrifugación y se resuspenden en 500 µl de TE (50 mM Tris-HCl; pH 8,0; 20 mM EDTA).

Después de la adición de 50 µl de SDS al 10%, se incuban durante 20 min a 65°C. Después, se añaden 200 µl de solución de acetato de potasio 5 M.

Las células se conservan en hielo durante 30 min., antes de la centrifugación (5 min, 13000 rpm).

El residuo se resuspende en 700 µl de isopropanol, se centrifuga durante 5 min. a 13000 rpm y se lava con 500 µl de etanol al 70%.

Después de la eliminación del sobrenadante, se añaden 400 µl de TE-ARNasa A (TE + 100 µg/ml de ARNasa A) y las células se incuban durante 15 min. a 1h a 37°C.

El ADN se precipita con la ayuda de 40 µl de acetato de potasio (2,5 M; pH 5,2) y 1 ml de etanol al 100%. Se centrifuga durante 5 minutos a 13000 rpm y se elimina el sobrenadante.

Se efectúa un lavado con 700 µl de etanol al 70%. Después del secado del residuo se recupera el ADN genómico en 100 µl de agua.

Síntesis del ADN del gen GUT2

La síntesis del ADN del gen GUT2 se realiza por PCR (Eppendorf 2720 thermocycler) en un microtubo de 0,5 ml.

La mezcla de reacción está compuesta por 10 ng de ADN genómico de la cepa salvaje *Yarrowia lipolytica*, W29 obtenida en el ejemplo 1 en presencia de 50 pmoles de cada cebador correspondiente en las regiones aguas arriba (P1) y aguas abajo (T2) respectivamente del ORF del gen GUT2, 200 µM de cada dNTP, 1,5 mM MgCl₂, 2,5 U de Pfu (STRATAGENE, La Jolla, CA) y el tampón proporcionado con la enzima a la concentración indicada en un volumen final de 50 µl.

La PCR se desarrolla en 30 ciclos de amplificación sucesivos.

Cada ciclo está compuesto por una etapa de desnaturalización del ADN durante 1 min a 94°C, una etapa de hibridación de los 2 cebadores específicos durante 30 s a 57°C y una etapa de elongación de la copia de ADN a 72°C.

Los fragmentos de ADN se recuperan a partir de geles de agarosa utilizando el kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany).

Síntesis de los fragmentos P y T del gen GUT2 y constitución del fragmento P-T

El casete PT (Promotor-Terminador) se obtiene mediante dos etapas de amplificación PCR.

- 5 El promotor y el terminador se sitúan respectivamente aguas arriba y aguas abajo del ORF del gen GUT2.

Estas dos regiones, de aproximadamente 1 kb, se amplifican a partir del ADN genómico de la cepa salvaje *Yarrowia lipolytica*, W29 con, respectivamente, los pares de cebadores P1/P2 y T1/T2.

- 10 Los cebadores P2 y T1 contienen el sitio raro de reconocimiento de la meganucleasa I-SceI.

Los fragmentos PCR obtenidos, P-I-SceI y I-SceI-T, se reunieron después por ligación y después se utilizaron como matriz para la amplificación PCR del casete P-I-SceI-T (PT) utilizando los cebadores P1, T2.

- 15 Este casete se clona después en el plásmido pCR4-Blunt TOPO (INVITROGEN).

Después de la transformación en *E. coli*, se aísla el vector pCR4-TOPO-PT denominado GUT2-PT (JME743).

Obtención del gen URA3:

- 20 El casete I-SceI URA3 se obtiene por digestión por I-SceI del plásmido KS-URA3 (JME507; Fickers *et al.* 2003 Op. cit.).

El fragmento I-SceI-URA3 se purifica sobre gel de agarosa.

- 25 Inserción en el fragmento P-T:

El plásmido que lleva el casete GUT2-PT (JME743) es digerido por I-SceI.

- 30 Después de la desfosforilación del producto de digestión del plásmido PT, se realiza una ligadura entre éste y el marcador de selección I-SceI-URA3.

Los plásmidos resultantes presentan el módulo P-URA3-T y son denominados JME744 (GUT2-PUT).

- 35 El casete de invalidación PUT se genera por amplificación PCR utilizando el plásmido GUT2-PUT y los cebadores P1/T2.

El fragmento PCR se utiliza después para la invalidación del gen GUT2 por transformación de *Y. lipolytica*.

- 40 Transformación de la cepa de levadura:

El método utilizado para la transformación de *Y. lipolytica*, se basa en la utilización del acetato de litio para permeabilizar las células (Gaillardin *et al.*, 1985).

- 45 Las células (cepa Po1d) se cultivan a 28°C en 20 ml de medio YPD complementado de tampón citrato 50 mM pH 4.

Cuando el cultivo presenta una concentración celular próxima a 10^8 células/ml, ésta se centrifuga.

- 50 La competencia se adquiere después de la incubación de las células, resuspendidas en 20 ml de acetato de litio 0,1 M pH 6, durante 1 hora a 28°C bajo agitación (1 00 rpm).

Las células se centrifugan después durante 2 minutos a 2000 rpm, y se recogen en la misma solución con el fin de obtener una concentración de $5 \cdot 10^8$ células/ml.

- 55 La transformación se efectúa añadiendo 5 µl de ADN portador (pescado) y 10 µl de ADN a transformar (casete GUT2-PUT) a 100 ml de células competentes.

La mezcla se incuba sin agitación a 28°C, después se añaden 0,7 ml de PEG 4000 (40%) en acetato de litio (0,1 M; pH 6).

- 60 Esta mezcla se incuba bajo agitación (250 rpm) durante una hora a 28°C. Después, las células sufren un choque térmico de 1 min a 39°C.

La mezcla se diluye por adición de 1,2 ml de solución de acetato de litio 0,1 M pH 6.

- 65

Selección y purificación de las cepas de levaduras mutantes que expresan el gen URA3.

La transformación se extiende a razón de 200 µl por caja de medio YNB - casaminoácidos (medio que no contiene uracilo).

Los transformantes aparecen entre 3 y 5 días de incubación a 28°C.

Se efectúa una segunda extensión, a partir de una colonia aislada, en el medio selectivo con el fin de purificar los transformantes.

Verificación de la invalidación del gen GUT2

La verificación de la delección del gen se realiza por PCR utilizando los cebadores ver1 y ver2 específicos del gen GUT2 y situados en el interior del casete de invalidación.

El tamaño del fragmento amplificado permite la verificación de la invalidación del gen GUT2 comparado con el tamaño del fragmento amplificado en la cepa salvaje con los mismos cebadores.

Escisión del gen URA3

El marcador URA3ex utilizador puede escindirse por expresión de la recombinasa Cre.

Las células de levadura son transformadas por el plásmido pRRQ2 (hp4d-cre, yILEU2) y los transformantes Leu+ son seleccionados en medio sin leucina.

Después, para permitir la pérdida del vector de expresión de la recombinasa Cre, los transformantes Leu+ se cultivan en medio YPD durante 12h a partir de un pre-cultivo YPD diluido al 1/1000.

Las células se esparcen después en un medio YNB.

Se seleccionan los clones Ura- (escisión del marcador) y Leu- (pérdida del plásmido pQRR2).

La escisión del marcador se confirma por PCR con los cebadores ver1/ver2.

Tabla 3

Etapa	Operaciones de transformación		
	Mutante a transformar	Casete de transformación	Mutante transformado
1	Po1d, Leu-, Ura-,	Casete PUTgut2, selección Ura+	JMY1202, Leu-, Ura+, Δ gut2
2	JMY1202, Leu-, Ura+, Δ gut2	Fragmento genómico que contiene el gen LEU2	JMY1387, Leu+, Ura+, Δ gut2

Leu+/Leu-: cepa que expresa/no expresa el gen LEU2.

Ura+/Ura-: cepa que expresa/no expresa el gen URA3.

Ejemplo 2: Obtención de las cepas de levadura *Yarrowia lipolytica* mutantes MTLY40, MTLY64, MTLY66, MTLY82, MTLY85, MTLY92, MTLY95a y JMY 1393

Repitiendo el protocolo del ejemplo 1 y siguiendo las especificaciones dadas en la tabla 4 siguiente, se construyen las cepas de levadura *Yarrowia lipolytica*, mutantes MTLY40, MTLY64, MTLY66, MTLY82, MTLY85, MTLY92, MTLY95a y JMY 1393.

La cepa MTLY37 (Leu+, Ura+, Δ pox2-5), anteriormente descrita en la solicitud internacional WO 2006/064131, es una cepa fototrófica para la leucina y el uracilo.

Tabla 4

Etapa	Operaciones de transformación		
	Mutante a transformar	Casete de transformación	Mutante transformado
1	MTLY37, Leu+ Ura+ Δ pox5-PT, Δ pox2-PT, Δ pox3-PT, Δ pox4-PUT	Fragmento de PCR ura3-41, selección 5FOA	MTLY40, Leu+, Ura-, Δ pox5-PT, Δ pox2-PT, Δ pox3-PT, Δ pox4-Pura3-41T
2	MTLY40, Leu+, Ura-, Δ pox5-PT, Δ pox2-PT, Δ pox3-PT, Δ pox4-Pura3-41T	Casete PHTleu2, selección higromicina	MTLY64, Leu-, Ura-, Hyg+, Δ pox5-PT, Δ pox2-PT, Δ pox3-PT, Δ pox4-Pura3-41T, leu2-PHT

Etapas	Operaciones de transformación		
	Mutante a transformar	Casete de transformación	Mutante transformado
3	MTLY64, Leu-, Ura-, Hyg+, Δ pox5-PT, Δ pox2-PT, Δ pox3-PT, Δ pox4-Pura3-41T, leu2-PHT	Vector pRRQ2, selección Leu+, verificación Hyg-, pérdida del plásmido pRRQ2 sobre YPD, aislamiento de Leu-	MTLY66, Leu-, Ura-, Δ pox5-PT, Δ pox2-PT, Δ pox3-PT, Δ pox4-Pura3-41T, Δ leu2
4	MTLY66, Leu-, Ura-, Δ pox5-PT, Δ pox2-PT, Δ pox3-PT, Δ pox4-Pura3-41 T, Δ leu2	Casete PHTpox1, selección higromicina	MTLY82, Leu-, Ura-, Hyg+, Δ pox5-PT, Δ pox2-PT, Δ pox3-PT, Δ pox4-Pura3-41T, Δ leu2, pox1-PHT
5	MTLY82, Leu-, Ura-, Hyg+, Δ pox5-PT, Δ pox2-PT, Δ pox3-PT, Δ pox4-Pura3-41T, Δ leu2, pox1-PHT	Vector pRRQ2, verificación Hyg-, pérdida del plásmido pRRQ2 sobre YPD	MTLY85, Leu-, Ura-, Δ pox5-PT, Δ pox2-PT, Δ pox3-PT, Δ pox4-Pura3-41T, Δ leu2, Δ pox1
6	MTLY85, Leu-, Ura-, Δ pox5-PT, Δ pox2-PT, Δ pox3-PT, Δ pox4-Pura3-41 T, Δ leu2, Δ pox1	Casete PHTpox6, selección higromicina	MTLY92, Leu-, Ura-, Hyg+, Δ pox5-PT, Δ pox2-PT, Δ pox3-PT, Δ pox4-Pura3-41T, Δ leu2, Δ pox1, pox6-PHT
7	MTLY92, Leu-, Ura-, Hyg+, Δ pox5-PT, Δ pox2-PT, Δ pox3-PT, Δ pox4-Pura3-41T, Δ leu2, Δ pox1, pox6-PHT	Vector pRRQ2, verificación Hyg-, pérdida del plásmido pRRQ2 sobre YPD	MTLY95a, Leu-, Ura-, Δ pox5-PT, Δ pox2-PT, Δ pox3-PT, Δ pox4-Pura3-41T, Δ leu2, Δ pox1, Δ pox6
8	MTLY95a, Leu-, Ura-, Δ pox5-PT, Δ pox2-PT, Δ pox3-PT, Δ pox4-Pura3-41T, Δ leu2, Δ pox1, Δ pox6	Casete PUTgut2, Casete PUTgut2, selección uracilo	JMY1351, Leu-, Ura+, Δ pox5-PT, Δ pox2-PT, Δ pox3-PT, Δ pox4-Pura3-41T, Δ leu2, Δ pox1, Δ pox6, Δ gut2-PUT
9	JMY1351, Leu-, Ura+, Δ pox5-PT, Δ pox2-PT, Δ pox3-PT, Δ pox4-Pura3-41T, Δ leu2, Δ pox1, Δ pox6, Δ gut2-PUT	Fragmento genómico que contiene el gen LEU2	JMY 1393, Leu+, Ura+, Δ pox5-PT, Δ pox2-PT, Δ pox3-PT, Δ pox4-Pura3-41T, Δ pox1, Δ pox6, Δ gut2-PUT

Leu+/Leu-: cepa que expresa/que no expresa el gen LEU2.

Ura+/Ura-: cepa que expresa/que no expresa el gen URA3.

Hyg+/Hyg-: cepa que expresa/que no expresa el gen HYG (resistencia a la higromicina).

Δ poxn-PT: cepa que no expresa el gen POXn, por invalidación con la ayuda del fragmento PT del gen n de POX.;

Δ pox4-PUT: cepa que no expresa el gen POX4, por invalidación con la ayuda del fragmento PUT que contiene el gen URA3.

Fragmento de PCR ura3-41: (Mauersberger S. *et al.*: J. Bacteriol. 183:5102-5109). Se ha realizado la amplificación por PCR de un fragmento de 4650 pb que engloba el gen URA3 delecionado de 10 pares de base (alelo ura3-41) sobre el ADN genómico de *Y. lipolytica*, JMY322 utilizando los cebadores

Ura3-dis1 (5'-GGGGTGACACTGCACTATTGGTTTG-3'), y
Ura3-dis2 (5'-GCGTTACTGAGAGGCAGAGTACATG-3').

El medio de reacción de la PCR está constituido por 0,5 μ l ADN, 1 μ l de cebador ura3-dis1 y ura3-dis2 100 pM, 4 μ l de dNTP 2,5 mM, 1 unidad de ADN polimerasa (por ejemplo taq, Takara), 5 μ l de tampón (10 x taq buffer, Takara) y 39 μ l de agua. El programa de temperatura es de 94°C 2 min y después 30 ciclos de 30 s a 94°C, 45 s a 55°C, 5 min. a 72°C.

Selección 5FOA: Selección sobre un medio que contiene 5-FOA (ácido 5-fluoroorótico), permite seleccionar las cepas Ura-.

Δ pox4-Pura3-41T: cepa que no expresa el gen POX4, por invalidación con la ayuda del fragmento PUT que contiene el marcador URA3 que se convirtió en alelo ura3-41 por transformación con el fragmento ura3-41 del gen URA3 y que confiere el fenotipo Ura-.

Casete PHTleu2: casete de invalidación que comprende un gen de resistencia a la higromicina (H) insertado entre los fragmentos P y T del gen LEU2.

leu2/ Δ leu2-PHT cepa que no expresa el gen LEU2, por invalidación con la ayuda del fragmento PHT que contiene el gen de resistencia a la higromicina Hyg.

Hyg: marcador de selección Hyg (H) que permite la resistencia a la higromicina.

Vector pRRQ2: Vector replicativo que permite la expresión de la recombinasa cre y que contiene el marcador de

selección LEU2 (Fickers, op. cit.).

Casete PHTpox1: casete de invalidación que comprende un gen de resistencia a la higromicina (H) insertado entre los fragmentos P y T del gen POX1.

Casete PHTpox6: casete de invalidación que comprende un gen de resistencia a la higromicina (H) insertado entre los fragmentos P y T del gen POX6.

YPD: Medio rico YPD para perder el plásmido replicativo.

Δ gut2-PUT: cepa que no expresa el gen de interés GUT2 y que expresa el marcador de selección URA3 insertado en un casete entre los fragmentos P y T.

En los ejemplos siguientes, se ha determinado la influencia de la delección del gen GUT2 en diferentes condiciones de cultivo y de composición del medio sobre la acumulación de lípido por la levadura (nivel de acumulación de lípido, velocidad de acumulación y tipo de lípido acumulado).

Así, se ha constatado que una cepa que contiene la delección Δ gut2 acumula más rápidamente los lípidos y que el contenido en lípido es más elevado que en una cepa que no contiene esta delección.

Ejemplo 3: Comparación de la acumulación de lípido por el mutante Δ gut2 (JMY1202) del ejemplo 1 y el mutante Δ gut2 Δ pox1-6 (JMY 1393) del ejemplo 2 a partir de glucosa

Se efectúa un pre-cultivo del mutante Δ gut2 del ejemplo 1, conservado en medio agar de composición: extracto de levadura 10 g·l⁻¹; peptona 10 g·l⁻¹; glucosa 10 g·l⁻¹; Agar 20 g·l⁻¹, gracias a una inoculación que proporciona una absorbancia inicial a 600 nm del medio de pre-cultivo próxima a 0,50.

El pre-cultivo se lleva a cabo bajo agitación orbital (200 rpm⁻¹) durante 6h a 28°C en un matraz con aletas de 50 ml que contiene 5 ml de medio constituido por 10 g·l⁻¹ de extracto de levadura, 10 g·l⁻¹ de peptona y 10 g·l⁻¹ de glucosa.

El medio utilizado para el cultivo está compuesto por agua desionizada, por extracto de levadura a 10 g·l⁻¹; por YNB a 1,7% g·l⁻¹ a 20 g·l⁻¹; por NH₄Cl a 5 ml·l⁻¹ y por glucosa al 20 g·l⁻¹. El pH del cultivo se mantiene gracias a la adición de tampón fosfato a pH 6,8 a una concentración final de 50 mM.

La inoculación del cultivo se efectúa con el equivalente de una absorbancia inicial a 600 nm de 0,5 proporcionada por el medio de pre-cultivo.

El cultivo se lleva a cabo a 28°C en matraces con aletas de 500 ml con 50 ml de medio a una velocidad de agitación de 200 rpm⁻¹.

A 11, 24 y 48 horas de cultivo, se efectúan unas extracciones de biomasa correspondientes a 10 DO a 600 nm. Se elimina el sobrenadante por centrifugación. Se efectúan 2 lavados de la biomasa celular con NaCl a 9 g·l⁻¹. La biomasa se liofiliza después y los ácidos grasos se extraen mediante el método de Folch *et al.* (J. Biol. Chem., 1957. 226(1): p. 497-509).

La composición en ácidos grasos acumulados se determina por cromatografía en fase gaseosa sobre una columna Varian Factor Four vf-23ms, equipada con un detector de ionización de llama, después de la transmetilación de los ácidos grasos según el métodos de BF₃ en metanol descrito por Athenstaedt *et al.* (J. Bacteriol., 1999. 181(20): p. 6441-8).

También se ha realizado una transmetilación directa sin efectuar antes ninguna extracción de los lípidos, según el método descrito por Browse *et al.* (Anal. Biochem., 1986. 152(1): p. 141-5).

La variación de la temperatura del horno del cromatógrafo se programa de 150°C a 260°C a razón de 8°C por minuto.

Los resultados muestran una producción máxima de lípidos de 420 mg·l⁻¹ después de 24 horas.

Los lípidos totales representan el 12,9% del peso seco (p/p).

Ejemplo 4: Comparación de la acumulación de lípido por el mutante Δ gut2 (JMY1202) del ejemplo 1 y el mutante Δ gut2 Δ pox1-6 (JMY1393) del ejemplo 2 a partir del ácido oleico

Se repite el ejemplo 3 con la cepa (JMY1393) en presencia de ácido oleico (3%) al que se añade glucosa (0,5%).

Los resultados muestran una producción de lípidos 1,56 g·l⁻¹ a 11h de cultivo y de 1,77 g·l⁻¹ a 24h de cultivo.

Los lípidos representan a las 11h el 38,51% del peso seco y a las 24h el 42% del peso seco.

Ejemplo 5: Distribución de los lípidos acumulados sobre medio oleico en ácidos grasos libres y triacilgliceroles

A partir del medio de cultivo a las 24h del ejemplo 4, se realiza una extracción de los lípidos totales mediante el método Folch.

Los lípidos así purificados son después separados en ácidos grasos libres (FFA) y en triacilgliceroles (TAG) por extracción en fase sólida con la ayuda de una columna SPE Aminopropyl column (IST-Francia) según el protocolo de Laffargue *et al.* (Plant Physiol. Biochem., 2007. 45(3-4): p. 250-257).

La composición de cada fracción se determina por cromatografía en fase gaseosa y se resume en la tabla 5 siguiente (los resultados se expresan en % de lípidos totales).

Tabla 5:

Mutante lípidos	$\Delta gut2 \Delta pox1-6$	
	TAG	FFA
C16:0	4,45	6,56
C16:1 (n-9)	0,25	0,06
C16:1(n-7)	0,12	0,09
C18:0	0,72	1,94
C18:1 (n-9)	63,58	70,31
C18:2(n-6)	24,93	17,26
Totales:	94,04	96,22

Ejemplo 6: Comparación de la acumulación de lípidos por una cepa salvaje GUT2 y los mutantes $\Delta gut2$ (JMY1202) y $\Delta gut2 \Delta pox1-6$ (JMY 1393) de los ejemplos 1 y 2 a partir de un medio que contiene ácido oleico y glucosa

Se repite el proceso del ejemplo 3 con un medio de cultivo compuesto por agua desionizada, por extracto de levadura a $10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$; por proteosa peptona a $20 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$; por NH_4Cl a $5 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$, por glucosa al $40 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ y por ácido oleico a $30 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ (pureza 65%, Sigma). El pH del cultivo se mantiene gracias a la adición de tampón fosfato a pH 6,8 a una concentración final de 50 mM.

En estas condiciones

- la cantidad de lípidos acumulados se establece de la siguiente manera:

	24h	48h	72h
$\Delta gut2$	$2,55 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$	$6,71 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$	$8,24 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$
$\Delta gut2 \Delta pox1-6$	$4,12 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$	$7,27 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$	$9,1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$

- el porcentaje del peso seco en lípidos se establece de la siguiente manera:

	11h	24h	48h	72h
gut2	7,2%	10,6%	-	-
$\Delta gut2$	12,0%	18,0%	23,0%	20,0%
$\Delta gut2 \Delta pox1-6$	25,0%	29,0%	35,0%	35,0%

El conjunto de los resultados obtenidos muestra el interés por utilizar unas cepas mutantes de levadura según la invención para producir unos lípidos.

Ejemplo 7: Análisis comparativo de la producción de lípido por las cepas salvajes (W29), delta gut2 (derivada de la JMY1202 hecha prototrófica, JMY1387) y delta gut2 delta Pox1-6 (JMY1393)

Los cultivos en reactores se realizan en modo discontinuo alimentado (fed-batch) en un fermentador (Braun Biostat E) de 20 litros útiles.

Las diferentes funciones disponibles son:

- las mediciones y regulaciones de temperatura, pH, oxígeno disuelto, presión,
- la detección de espuma con adición regulada de antiespuma,

- el control del procedimiento de esterilización por vapor vivo,
- el control de las bombas de alimentación,
- la lectura de las masas de los balances.

5 La regulación del pH está asegurada por dos bombas peristálticas, aportando una de ellas una solución básica (hidróxido de potasio o amoníaco $10 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$), aportando la otra una solución ácida (ácido ortofosfórico $0,29 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Una tercera bomba peristáltica permite la adición de un anti-espumante (Strucktol) por adición regulada.

10 El biorreactor está alimentado de sustrato carbonado (solución de glucosa: 700 a 750 g/l) por control de dos bombas volumétricas (alto y bajo caudal). Una tercera bomba, que es sometida al aporte de sustrato, permite la adición de una solución salina concentrada a un caudal 10 veces superior al del sustrato.

Tabla 6: composición de la solución salina de alimentación para *Y. lipolytica*

Compuesto	Concentración [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]
KCl	20,000
NaCl	20,000
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,000
$\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7,710
$\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$	0,470
$\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,300
$\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,600
$\text{Na}_2\text{MoSO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,094
$\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	6,400
$\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,970
H_3BO_3	0,300
H_3PO_4	125,000

15 Los aportes conjuntos del medio salino y del sustrato carbonado permiten asegurar las necesidades nutricionales de la biomasa (fase de crecimiento) sin incluir el nitrógeno. Una última bomba aporta el nitrógeno de manera controlada a caudales muy bajos durante la fase de acumulación de lípidos bajo limitación de aporte de nitrógeno.

20 El caudal másico de gas entrante (oxígeno aportado) se mide y regula así como la velocidad de agitación (turbina Rhuston).

La levadura que inocula el cultivo en reactor se obtiene después de una serie de tres precultivos:

- 25
1. pre-cultivo I de 8 ml de YPD durante 24h a 30°C en un matraz de 100 ml.
 2. el pre-cultivo II de 72 ml del medio mínimo se inocula por el cultivo I, incubado durante 12h a 30°C en un matraz de 250 ml.
- 30
3. el pre-cultivo III de 720 ml de medio mínimo se inocula por el cultivo II, incubado durante 12h a 30°C en un matraz de 5000 ml. El biorreactor se inocula entonces por este último pre-cultivo.

El medio mínimo está complementado con 0,8 g de glucosa y un 1% de solución concentrada de vitaminas. La composición del medio mínimo y de la solución concentrada de vitaminas se describe en la tabla 7 y en la tabla 8.

35

Tabla 7: composición del medio mínimo

Compuesto	Concentración [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$]
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5,278
$\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,051
$\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,215
$\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,078
$\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,009
$\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,158
$\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$	0,009
$\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,0360
H_3PO_4	28,620
H_2SO_4	16,370
H_3BO_3	0,0025
KCl	7,450

Tabla 8: composición de la solución de vitaminas 1000 veces concentrada

Compuesto	Concentración [g·l ⁻¹]
d-biotina	0,05
Pantotenato	1,00
Ácido nicotínico	1,00
Hidrocloreto de tiamina	1,00
Ácido p-amino-benzoico	0,20
Hidrocloreto de piridoxol	1,00
Mioinositol	25,00

Se extraen regularmente unas muestras en el reactor, muestras en las que se realizan unas mediciones de:

- cantidad de materia seca, que corresponde a la biomasa total según el método gravimétrico después de la filtración de un volumen preciso de suspensión de levadura.
- cantidad de lípidos. La cantidad de lípidos totales se determina según un método derivado del método de Folch, Folch J, Lees M, Slane-Stanley J (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J Biol Chem 226:497-509.

Se han realizado tres cultivos celulares en un entorno perfectamente controlado con, en particular, los controles del índice de crecimiento y de la cinética de acumulación de los lípidos por un control minucioso de la limitación de nitrógeno. El primer cultivo celular de la cepa salvaje *Y. lipolytica* W29 sirve de cultivo de referencia con el fin de comparar los rendimientos de las dos cepas mutantes Δgut2 y $\Delta\text{gut2}\Delta\text{pox1-6}$.

Los cultivos celulares integran diferentes fases, que son:

- Fase 1 ($t < 13\text{-}15\text{h}$): crecimiento celular en fase exponencial (índice de crecimiento controlado por el aporte de sustrato carbonado).
- Fase 2 ($13\text{-}15\text{h} < t < 16\text{-}21\text{h}$): colocación de la limitación de nitrógeno (cambio de una regulación del pH del amoníaco al hidróxido de potasio), principio de acumulación de los lípidos (aporte del sustrato carbonado en exceso) y disminución del crecimiento celular (control del índice de crecimiento por aporte de nitrógeno externo).
- Fase 3 ($t > 21\text{h}$): acumulación

Los resultados del cultivo en reactor de la cepa salvaje W29 (figura 6) muestran una concentración celular máxima de $60\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ y un contenido máximo de lípidos de $0,42\text{ g}_{\text{lip}}\cdot\text{g}_x^{-1}$ después de 78h de cultivo en reactor. Durante este cultivo, la fase de acumulación de lípido se ha iniciado a las 16h. No hay ninguna fase de consumo de lípidos intracelulares.

Los resultados del cultivo en reactor de la cepa mutante Δgut2 (figura 7) muestran una concentración celular máxima de $103\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, bien un aumento de más del 70% con respecto a la cepa salvaje y un contenido máximo de lípidos de $0,47\text{ g}_{\text{lip}}\cdot\text{g}_x^{-1}$ después de 47h, o bien un aumento del 13% de cultivo en reactor en un tiempo un 40% más corto. Durante este cultivo, la fase de acumulación de lípido se ha iniciado a las 18h. No hay ninguna fase de consumo de lípidos intracelulares, pero el contenido en lípidos alcanza una asíntota horizontal que tiende hacia $0,47\text{ g}_{\text{lip}}\cdot\text{g}_x^{-1}$.

Los resultados del cultivo en reactor de la cepa mutante $\Delta\text{gut2}\Delta\text{pox1-6}$ (figura 8) muestran una concentración celular máxima de $102\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$, es decir un aumento de más del 70% con respecto a la cepa salvaje y un contenido máximo de lípidos de $0,47\text{ g}_{\text{lip}}\cdot\text{g}_x^{-1}$ después de 84h, o bien un aumento del 13% de cultivo en reactor en un tiempo un 40% más corto. Durante este cultivo, se ha iniciado la fase de acumulación de lípido a las 21h. No hay ninguna fase de consumo de lípidos intracelulares, pero el cultivo se detuvo al principio del estancamiento del contenido en lípidos.

Resultado (figura 9)

Siguiendo los rendimientos y productividades instantáneos, es posible comparar las cepas con la ayuda de mejores rendimientos obtenidos durante cada cultivo.

Se observa que la cepa Δgut2 presenta un rendimiento de conversión de la glucosa en lípidos totales superior al 10% con respecto a la cepa salvaje y de una productividad volumétrica ($[\text{g}_{\text{lip}}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}]$) superior al 19%. En lo que se refiere a la cepa $\Delta\text{gut2}\Delta\text{pox1-6}$, la mejora de los rendimientos con respecto a la cepa salvaje es del 24% a nivel del rendimiento y del 20% a nivel de la productividad.

Listado de secuencias

<110> INRA

<120> Nuevas cepas de levadura mutantes capaces de acumular una gran cantidad de lípidos.

5 <130> BIF117612

<160> 23

<170> PatentIn versión 3.3

10 <210> 1
<211> 4140
<212> ADN
<213> *Yarrowia lipolytica*

15 <220>
<221> Fragmento P-GUT2-T
<222> (1)..(4140)
<223> ADN que contiene el fragmento P y el fragmento T que enmarca el gen GUT 2

20 <220>
<221> Ver1
<222> (1)..(2-0)
<223> Cebador ver 1 de verificación de la invalidación del gen GUT2

25 <220>
<221> G3P-P1
<222> (17)..(36)
<223> Cebador P1 de síntesis del fragmento P del gen GUT 2

30 <220>
<221> G3P-P2
<222> (1114)..(1135)
<223> Cebador P2 de síntesis del fragmento P del gen GUT 2

35 <220>
<221> Gen GUT 2
<222> (1151)..(2989)
<223> secuencia codificante del gen GUT 2

40 <220>
<221> G3P-T1
<222> (3067)..(3085)
<223> Cebador T1 de síntesis del fragmento T del gen GUT 2

45 <220>
<221> G3P-T2
<222> (3863)..(3883)
<223> Cebador T2 de síntesis del fragmento T del gen GUT 2

50 <220>
<221> Ver2
<222> (44116)..(4140)
<223> Cebador ver 2 de verificación de la invalidación del gen GUT2

55 <400> 1

ES 2 575 008 T3

gaatgacggg ggcaacgcag atccactgtc aagccgagtc tgtccgccac gcatcatgtg	60
atagaggcta gggagtcattg tgaatatgtc acacctggat gacctctaca tacaagagcg	120
gtttgttttc tatggcatgt tgttgacgca tgcctgccaac ggctattcaa cggtgacaac	180
ggatgatgct gtcacatgac gccatttttt atgttgtatc caacagcacg gtactaaaac	240
aggccatttg taaaggcctc actcagctca cacacgctca acggtcacga taaggtcgca	300
ctagaggcgt tagttggttt caagaatagt ggttattggt cttgggatac gggttggaca	360
atatacaaat gggctcgcgt acacttatac agtcctacca ttctgtcgcc ctctgattct	420
cggccacatc agccacgcgc caacgtctcc tctcatccc cctcctgtc ttccactcgc	480
aaaacgtcca aactcaattg tgtcaaaatt ggaggttctc ttcgtttgag cctaccattt	540
tcaatttttt agttgcgaca gcggcccggg cagaggttca caacaaggtc tagagacact	600
ttgtcatggg gccgagaagg accataaaaa ccaaacgatg gtcacgtcag gtcaattact	660
gaccagtctc acatccgacc cctcgcgtgc tcgacggag gatttctctg cactcgtcct	720
tgcatacctc ggctagcggg atttattcac caatcacaca gccgagagtt ttccggacc	780
cttcatccaa cagcttagag ttgcatgagt cagtagcaac gtagactttg agcctttgtg	840
acagatgtcc aagtgcagca cgttgtagga aaataagggtg aaggattggc caatgtgaac	900
agaggcgaca agagtccgtc tggagggcgt gttgtagtca attgcccgcg caattgattg	960
acctcatcgt ttctgcgcga accccccac aagcccgat aaatagacac gccccacaag	1020
cgttctgtct ggtctgtcga cagcacactt ccatttaaaa ttcaaaaaa gcgcaccacc	1080
gaaaagcata cttaaacccac tcaatgtaga cgtcggggaa cttctctttc ctaccacca	1140
ccccaaacaa atgttcagaa ccattcgaaa acccgcggtg gctgctgccg ccgcccgtggc	1200
agccgctggc gctggagcgc tcgccctgtc tgtgctgcc caggcccagg aggagctcca	1260
caagaagcac aaattcacag tgccccccgt ggccgcgag cccccctctc gagccgccca	1320
gctcgagaag atgaagaccg aggagtttga tctcgtcgtt gttggtggag gagctaccgg	1380
atccggtatc gccctcgacg ctgtcacacg aggcctcaag gttgctctgg tcgagcgaga	1440
cgatttctcc tgccgaacct cgtcccgatc caccaagctc atccacggag gtgtccgata	1500
cctcgagaag gctgtgtgga acctcgacta caaccagtac gagctggtca aggaggccct	1560
gcacgagcga aaggctctcc tcgacattgc tccccacctc acctttgtct tgcccatcat	1620
gatccccgtc tacacctggt ggcagcttcc ctacttctgg atgggtgtca agtgetacga	1680
tctgcttgcc ggccgacaga acctcgagtc ctcttacatg ctctcccgat cccgtgctct	1740
cgatgccttc cccatgcttt ccgatgacaa gctcaagggc gccattgtct actatgatgg	1800
ctcccagaac gactctcgaa tgaacgttct tcttattatg actgctgttg agaaggggtgc	1860

ES 2 575 008 T3

caccatcctg aaccattgcg aggtcaccga gctcaccaag ggcgccaatg gccagctcaa	1920
cgggtgttgtt gccaaaggata ctgacggaaa cgctggatcc ttcaacatca aggccaagt	1980
tgtcgttaat gctactggac ccttactga ctctctgcga cagatggacg acaagaacac	2040
caaggagatc tgtgctcctt cctccggtgt tcacatcatt ctccccggtt actactcccc	2100
caagaagatg ggactccttg accccgctac ttctgacggc cgagttatct tcttctctcc	2160
ctggcagggg aacacccttg ccggtactac tgaccagcct accaagatca ctgctaacc	2220
tatccctcc gaggaggaca ttgacttcat tctcaacgag gtccgacact acgttgaggg	2280
caaggttgat gtgcgacgag aggacgttct ggccgctgg tccggaatcc gacccttgt	2340
ccgggacccc cacgccaaga acaccgagtc tcttgtccga aaccatctca tcacctactc	2400
cgagtctggt cttgtcacca ttgctggcgg aaagtggacc acttaccgac agatggctga	2460
ggagactgtc gatgctgca ttgccaaagt cggctctcaag cctgaaatct ccgccaaggc	2520
cgtcacccga gacgtcaagc tcacggtgc taaggactgg actcctctca cttacattga	2580
tctgatccag caggaggacc ttgacccga ggttgctaag cacctttctg agaactacgg	2640
atctcgagct ttcacogttg cttctcttgc tgagatgcc accccgaac ccggtgtgat	2700
ccccagctc actctcaca agggttaagc aatcctgtac ccctaccct acctogatgc	2760
cgagtgaag tactctatga agtacgagta tgccaccacc gccatcgact tccttgctcg	2820
acgaactcgt cttgctttcc ttaacgcgc tgccgctac gaggtctctc ctgaggtcat	2880
tgagatcatg gccaaaggag tccagtggga cgaggtcga aaggagcagg aattcaacac	2940
cgggtgtcag tacctctact ccatgggcct taccocaaag gacaaataac tgtatagtaa	3000
aagcgtatag ccaataagat aatcacttga atgaaggagc agcaactcgt atgtttagca	3060
cttcaacgga ctatttcccc gcagcaaaga gactattgct gagttgttga gtatctgctt	3120
tacaataatg gggatatggac acacaaggag gggctcttagt gagaagttag ataggtctag	3180
catacatgag atcaatgttg tottacctat atcgtttgtt atcattttatc ttggtttgaa	3240
ttgataaacac gagttgttca ttgaagtgat ggcaccgggt ctcacacgca acagttggcg	3300
aacaggtcgt attgttcctt agatacgacg ctcttttgga catgatggga agtgaaacta	3360
caattacagt agctacatag cttggctaac tagaccgctt acagaaccag tagtcgtcac	3420
aagaccacca cgaacaaagt ccaactaccc cactcccacc actcgtatctt acttacogca	3480
gatcacacgc ttccgtgtat ctccgtgggg catcgtgggg cattgttcta agttttccgt	3540
atggtgcaca gtcggtacgt gctttgacta accagtagaa gttaggctac tgtagtgag	3600
attgagcaat gaaacgatga caggaagacc ccaaattgcg accacctcaa ctatacacgg	3660

ES 2 575 008 T3

	cttgttgcta ttgccgcctt gcactccaca cagcaaacat gcacacgata tgcactcaag	3720
	tcttaaccga atgaaggtaa aagtagcaac caacaagcga gagttactgt atacttacia	3780
	gttatacgac agtctcactt atcaccaatt ggcaacttga ccgcacagac aaacacccta	3840
	caatgacctt cctcaatgtg ctctactacg tgctgctggc tgccatcatg atcggcaccg	3900
	gtactttcta ctacctgtgg ttactgaga ccaacgacca aaccgagaag atcatcagag	3960
	ctgcgcttgg agtctttgat atcgccatct ggtacattct aggtatctcc acctccttta	4020
	agatcctcac ccagatgatt ctgcctgtt tcttgtggt tctggctggt cttaagatct	4080
	acatcaaccc tcgagttgga ggggctcttc tggccggcag tctgctatct gtggctgctg	4140
	<210> 2	
	<211> 20	
5	<212> ADN	
	<213> no identificado	
	<220>	
	<221> G3P-P1	
10	<222> (1)..(20)	
	<223> Cebador para la síntesis del fragmento P del gen GUT2	
	<400> 2	
15	gcagatccac tgtcaagccg	20
	<210> 3	
	<211> 44	
	<212> ADN	
20	<213> no identificado	
	<220>	
	<221> G3P-P2	
	<222> (1)..(44)	
25	<223> Cebador para la síntesis del fragmento P del gen GUT2	
	<220>	
	<221> G3P-P2	
	<222> (1)..(22)	
30	<223> Sitio I-SceI en el cebador para la síntesis del fragmento P del gen GUT2	
	<400> 3	
35	gctagggata acagggtaat gcggtaggaa agagaagttc cgcg	44
	<210> 4	
	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> no identificado	
40	<220>	
	<221> G3P-T1	
	<222> (1)..(41)	
	<223> Cebador para la síntesis del fragmento T del gen GUT2	
45	<220>	
	<221> G3P-T1	
	<222> (1)..(22)	
	<223> Sitio I-SceI en el cebador para la síntesis del fragmento T del gen GUT2	
50	<400> 4	
	gcattaccct gttatcccta gccggactat ttccccgcag c	41

5	<210> 5 <211> 21 <212> ADN <213> no identificado	
10	<220> <221> G3P-T2 <222> (1)..(21) <223> Cebador para la síntesis del fragmento T del gen GUT2	
15	<400> 5 gcagccagca gcacgtagta g	21
20	<210> 6 <211> 20 <212> ADN <213> no identificado	
25	<220> <221> G3P-ver1 <222> (1)..(20) <223> Cebador para la verificación de la invalidación del gen GUT2	
30	<400> 6 gaatgacggg ggcaacgcag	20
35	<210> 7 <211> 25 <212> ADN <213> no identificado	
40	<220> <221> G3P-ver2 <222> (1)..(25) <223> Cebador para la verificación de la invalidación del gen GUT2	
45	<400> 7 cagcagccac aaatagcaga ctgcc	25
50	<210> 8 <211> 34 <212> ADN <213> no identificado	
55	<220> <221> LEU2-P1 <222> (1)..(34) <223> Cebador para la síntesis del fragmento P del gen LEU2	
60	<220> <221> LEU2-P1 <222> (3)..(8) <223> Sitio XbaI en el cebador para la síntesis del fragmento P del gen LEU2	
65	<400> 8 aatctagatg gtcacagtgg aatcatgttc gtgg	34
	<210> 9 <211> 45 <212> ADN <213> no identificado	

<220>
 <221> LEU2-P2
 <222> (1)..(45)
 5 <223> Cebador para la síntesis del fragmento P del gen LEU2

 <220>
 <221> LEU2-P2
 <222> (1)..(20)
 10 <223> Sitio I-SceI en el cebador para la síntesis del fragmento P del gen LEU2

 <400> 9

 cattaccctg ttatccctag gttccattgt ggatgtgtgt ggttg 45
 15
 <210> 10
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> no identificado
 20
 <220>
 <221> LEU2-T1
 <222> (1)..(39)
 <223> Cebador para la síntesis del fragmento T del gen LEU2
 25
 <220>
 <221> LEU2-T1
 <222> (1)..(20)
 <223> Sitio I-SceI en el cebador para la síntesis del fragmento T del gen LEU2
 30
 <400> 10

 ctagggataa cagggtaatg ctctgggtct gctgccctc 39
 35
 <210> 11
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> no identificado
 40
 <220>
 <221> LEU2-T2
 <222> (1)..(41)
 <223> Cebador para la síntesis del fragmento T del gen LEU2
 45
 <220>
 <221> LEU2-T2
 <222> (4)..(10)
 <223> Sitio Hind III en el cebador para la síntesis del fragmento T del gen LEU2
 50
 <400> 11

 agtaagctta gatctgttcg gaaatcaacg gatgctcaac c 41
 55
 <210> 12
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> no identificado
 60
 <220>
 <221> POX1-P1
 <222> (1)..(24)
 <223> Cebador para la síntesis del fragmento P del gen POX1

 <400> 12
 65
 catggagtgg atcgctcgag gacg 24

<210> 13
 <211> 42
 <212> ADN
 5 <213> no identificado

 <220>
 <221> POX1-P2
 <222> (1)..(42)
 10 <223> Cebador para la síntesis del fragmento P del gen POX1

 <220>
 <221> POX1-P2
 <222> (1)..(22)
 15 <223> Sitio I-SceI en el cebador para la síntesis del fragmento P del gen POX1

 <400> 13

 20 gcattaccct gttatcccta gccaggagga tcggtgaatg tg 42

 <210> 14
 <211> 45
 <212> ADN
 25 <213> no identificado

 <220>
 <221> POX1-T1
 <222> (1)..(45)
 30 <223> Cebador para la síntesis del fragmento T del gen POX1

 <220>
 <221> POX1-T1
 <222> (1)..(22)
 35 <223> Sitio I-SceI en el cebador para la síntesis del fragmento T del gen POX1

 <400> 14

 gctagggata acagggtaat gcctgttcc gagaagagga ggacg 45

 40 <210> 15
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> no identificado

 45 <220>
 <221> POX1-T2
 <222> (1)..(19)
 <223> Cebador para la síntesis del fragmento T del gen POX1

 50 <400> 15

 cggcagtggc tcaccaagc 19

 55 <210> 16
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> no identificado

 60 <220>
 <221> POX1-ver1
 <222> (1)..(19)
 <223> Cebador para la verificación de la invalidación del gen POX1

 <400> 16
 65 atccagacct ccaggcggg 19

5 <210> 17
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> no identificado

 10 <220>
 <221> POX1-ver2
 <222> (1)..(23)
 <223> Cebador para verificación de la invalidación del gen POX1

 <400> 17

 15 gctgcgtctc aatctggcga atg 23

 <210> 18
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> no identificado
 20

 <220>
 <221> POX6-P1
 <222> (1)..(28)
 <223> Cebador para la síntesis del fragmento P del gen POX6
 25

 <400> 18

 ccaagctcta agatcatggg gatccaag 28
 30
 <210> 19
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> no identificado
 35
 <220>
 <221> POX6-P2
 <222> (1)..(43)
 <223> Cebador para la síntesis del fragmento P del gen POX6
 40
 <220>
 <221> POX6-P2
 <222> (1)..(22)
 <223> Sitio i-SceI en el cebador para la síntesis del fragmento P del gen POX6
 45
 <400> 19

 gcattaccct gttatcccta gcgttgaggg actgttgaga gag 43
 50
 <210> 20
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> no identificado
 55
 <220>
 <221> POX6-T1
 <222> (1)..(47)
 <223> Cebador para la síntesis del fragmento T del gen POX6
 60
 <220>
 <221> POX6-T1
 <222> (1)..(22)
 <223> Sitio I-SceI en el cebador para la síntesis del fragmento T del gen POX6
 65
 <400> 20

 gctagggata acagggtaat gcgatgagga aatttgctct ctgagg 47

<210> 21
 <211> 28
 <212> ADN
 5 <213> no identificado

 <220>
 <221> POX6-T2
 <222> (1)..(28)
 10 <223> Cebador para la síntesis del fragmento T del gen POX6

 <400> 21

 atctcgagat tggccccctc aaacacac 28
 15
 <210> 22
 <211> 21
 <212> ADN
 20 <213> no identificado

 <220>
 <221> POX6-ver1
 <222> (1)..(21)
 25 <223> Cebador para la verificación de la invalidación del gen POX6

 <400> 22

 gctcaagaag gtagctgagt c 21
 30
 <210> 23
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> no identificado

 35 <220>
 <221> POX6ver2
 <222> (1)..(23)
 <223> Cebador para la verificación de la invalidación del gen POX6

 40 <400> 23

 cattaagtgt cagatcagct cgc 23

REIVINDICACIONES

1. Cepa de levadura *Yarrowia lipolytica*, mutante, que no expresa el gen GUT2, siendo dicha cepa mutante capaz de acumular unos lípidos, caracterizada por que no expresa por lo menos un gen responsable de la β -oxidación de los lípidos, seleccionado de entre los genes POX (POX1 a POX6), el gen MFE1 o el gen POT1.
2. Cepa de levadura según la reivindicación 1, caracterizada por que no expresa los genes POX2 a POX5.
3. Cepa de levadura según la reivindicación 2, caracterizada por que no expresa los genes POX1 a POX6.
4. Cepa de levadura según la reivindicación 3, caracterizada por que dicha cepa es la cepa $[\Delta]gut2[\Delta]pox1-6$, depositada en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM, Instituto Pasteur, 25, rue du Docteur Roux, F-75724 Paris Cedex 15) bajo el n° CNCM I-416 9, el 28 de mayo de 2009.
5. Procedimiento de obtención de una cepa de levadura *Yarrowia lipolytica*, mutante, que no expresa el gen GUT2, capaz de acumular unos lípidos, caracterizado por que:
 - 5.1 en una primera etapa, se construye un casete de invalidación que comprende las secuencias promotoras (P) y terminadoras (T) del gen GUT2 de levadura, que enmarcan un gen que codifica un marcador de selección (gen de selección), estando dicho gen de selección enmarcado a su vez a uno y otro lado de su secuencia por una (o unas) secuencia(s) de recombinación;
 - 5.2 en una segunda etapa, se introduce dicho casete de invalidación obtenido en la primera etapa, en una cepa de levadura;
 - 5.3 en una tercera etapa, se selecciona, de entre las cepas de levadura transformadas en la segunda etapa, una cepa de levadura defectuosa en el gen GUT2;
 - 5.4 en una cuarta etapa, se verifica la invalidación de dicho gen GUT2 en dicha cepa de levadura seleccionada en la tercera etapa.
6. Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado por que, en una quinta etapa (5.5) se transforma dicha cepa seleccionada en la cuarta etapa con un vector que permite la expresión de una recombinasa y en una sexta etapa (5.6), se aísla una cepa de levadura defectuosa en el gen GUT2, que ya no expresa el gen marcador.
7. Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado por que en la primera etapa, se construye dicho casete de invalidación que comprende las secuencias promotoras y terminadoras del gen GUT2 de levadura, según un método en el que
 - 7.1 en una primera fase, se sintetizan y se purifican unos fragmentos de ADN que comprenden o bien la secuencia promotora (P) o bien la secuencia terminadora (T) del gen GUT2 de levadura, a partir de ADN, por ejemplo del ADN genómico de levadura, ventajosamente una cepa salvaje, aún más ventajosamente una cepa W29, previamente purificada;
 - 7.2 en una segunda fase, se solidarizan un fragmento P y un fragmento T obtenidos anteriormente por medio del sitio de restricción, preferentemente un sitio raro, ventajosamente el sitio I-SceI, para formar unos fragmentos de ADN P-sitio raro-T (denominados casetes de invalidación 2);
 - 7.3 en una tercera fase, se introduce en el sitio de restricción del casete de invalidación 2, un gen que codifica un marcador de selección, como por ejemplo un gen asociado a un fenotipo de auxotrofia o de carácter dominante, para formar unos fragmentos de ADN P-I-Sce I-Marcador-I-Sce I-T (casete de invalidación 1) y se purifica dicho casete de invalidación 1.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado por que en la primera fase se sintetizan los fragmentos de ADN que comprenden o bien la secuencia promotora (P) o bien la secuencia Terminadora (T) del gen GUT2 de levadura, por PCR.
9. Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado por que la PCR se realiza sobre el ADN de *Yarrowia lipolytica* utilizando como cebador los pares G3P-P1/G3P-P2 (SEC ID n° 2 y 3) para la parte P y G3P-T1/G3P-T2 (SEC ID n° 4 y 5) para la parte T.
10. Procedimiento según la reivindicación 9, caracterizado por que los cebadores G3P-P2 y G3P-T1 comprenden además cada uno una secuencia de un sitio de restricción, preferentemente un sitio raro, como por ejemplo un sitio seleccionado de entre las meganucleasas, preferentemente el sitio I-SceI.
11. Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado por que en la segunda etapa (5.2) se introduce el casete

de invalidación 1 en una cepa de levadura salvaje como, por ejemplo, una cepa W29 o ventajosamente una cepa de levadura que no expresa el gen de marcador de selección contenido en el casete de invalidación.

12. Procedimiento según la reivindicación 11, caracterizado por que la cepa de levadura, que no expresa el gen de marcador de selección contenido en el casete de invalidación, es una cepa Po1d.

13. Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado por que la cepa de levadura, mutante, es la cepa [delta]gut2 depositada en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM, Instituto Pasteur, 25, rue du Docteur Roux, F-75724 Paris Cedex 15) bajo el nºCNCM I-4038, el 8 de julio de 2008.

14. Procedimiento según la reivindicación 5, caracterizado por que la cepa de levadura mutante es una cepa que no expresa además por lo menos un gen responsable de la β -oxidación de los lípidos, seleccionado de entre los genes POX (POX1 a POX6), el gen MFE1 o el gen POT1.

15. Procedimiento según la reivindicación 14, caracterizado por que la cepa de levadura no expresa los genes POX2 a POX5.

16. Procedimiento según la reivindicación 15, caracterizado por que la cepa de levadura no expresa los genes POX1 a POX6.

17. Procedimiento según la reivindicación 16, caracterizado por que la cepa de *Yarrowia* mutante es la cepa [delta]gut2[delta]pox1-6, depositada en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM, Instituto Pasteur, 25, rue du Docteur Roux, F-75724 Paris Cedex 15) bajo el nºCNCM I-4169, el 28 de mayo de 2009.

18. Procedimiento según la reivindicación 14, caracterizado por que la cepa de levadura se selecciona de entre las cepas MTL Y37 (*Leu*⁺, *Ura*⁺, Δ pox5, Δ pox2, Δ pox3, Δ pox4::URA3), MTL Y40 (*Leu*⁺, *Ura*⁻, Δ pox5-PT, Δ pox2-PT, Δ pox3-PT, Δ pox4::ura3-41), MTL Y64 (*Leu*⁻, *Ura*⁻, *Hyg*⁺, Δ pox5, Δ pox2, Δ pox3, Δ pox4::ura3-41, *leu2*::*Hyg*), MTL Y66 (*Leu*⁻, *Ura*⁻, Δ pox5, Δ pox2, Δ pox3, Δ pox4::ura3-41, Δ leu2), MTL Y82 (*Leu*⁻, *Ura*⁻, *Hyg*⁺, Δ pox5, Δ pox2, Δ pox3, Δ pox4::ura3-41, Δ leu2, *pox1*::*Hyg*), MTL Y85 (*Leu*⁻, *Ura*⁻, Δ pox5, Δ pox2, Δ pox3, Δ pox4::ura3-41, Δ leu2, Δ pox1), MTL Y92 (*Leu*⁻, *Ura*⁻, *Hyg*⁺, Δ pox5, Δ pox2, Δ pox3, Δ pox4::ura3-41, Δ leu2, Δ pox1, *pox6*::*Hyg*), y MTL Y95a (*Leu*⁻, *Ura*⁻, Δ pox5, Δ pox2, Δ pox3, Δ pox4::ura3-41, Δ leu2, Δ pox1, Δ pox6).

19. Utilización de una cepa de levadura de *Yarrowia lipolytica*, mutante, que no expresa el gen GUT2, para la síntesis de lípidos.

20. Utilización según la reivindicación 19, caracterizada por que la cepa de *Yarrowia lipolytica*, mutante, es la cepa [delta]gut2 depositada en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM, Instituto Pasteur, 25, rue du Docteur Roux, F-75724 Paris Cedex 15) bajo el nº CNCM I-4038, el 8 de julio de 2008.

21. Utilización según la reivindicación 19, caracterizada por que la cepa de *Yarrowia* mutante es la cepa [delta]gut2[delta]pox1-6, depositada en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM, Instituto Pasteur, 25, rue du Docteur Roux, F-75724 Paris Cedex 15) bajo el nºCNCM I-4169, el 28 de mayo de 2009.

22. Procedimiento de síntesis de lípidos en el que

22.1 en una primera etapa, se cultiva una cepa de levadura *Yarrowia lipolytica*, mutante, que no expresa el gen GUT2, capaz de acumular unos lípidos, en un medio apropiado;

22.2 en una segunda etapa, se recogen los lípidos producidos por el cultivo de la etapa 1.

23. Utilización según la reivindicación 19, para la síntesis de los ácidos grasos libres y de los triacilglicerol.

24. Utilización según la reivindicación 19, para la producción de ácidos grasos n-2.

25. Utilización según la reivindicación 19, para la producción del 16:1 (n-9), el ácido (Z)-7-hexadecenoico.

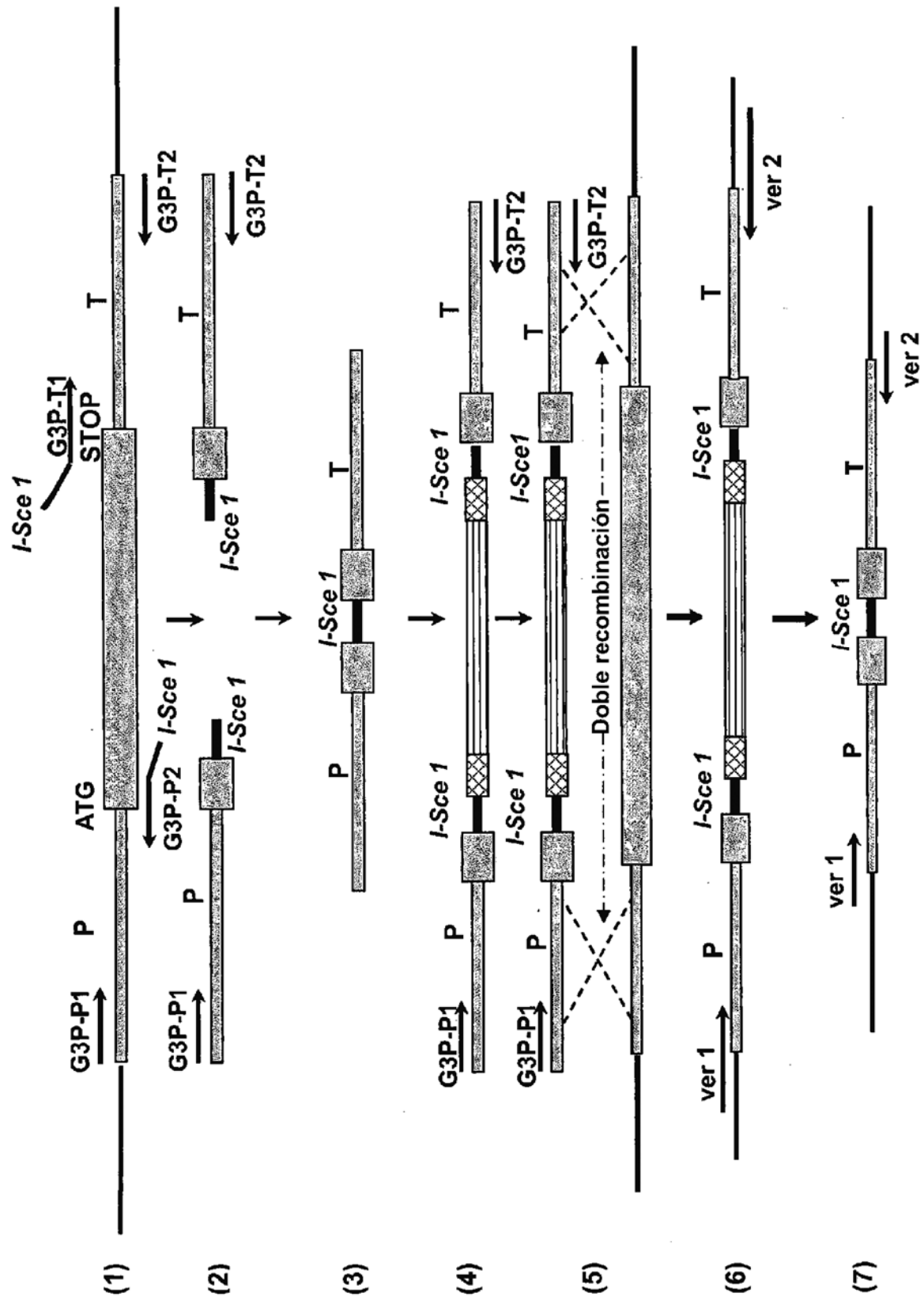


Figura 1

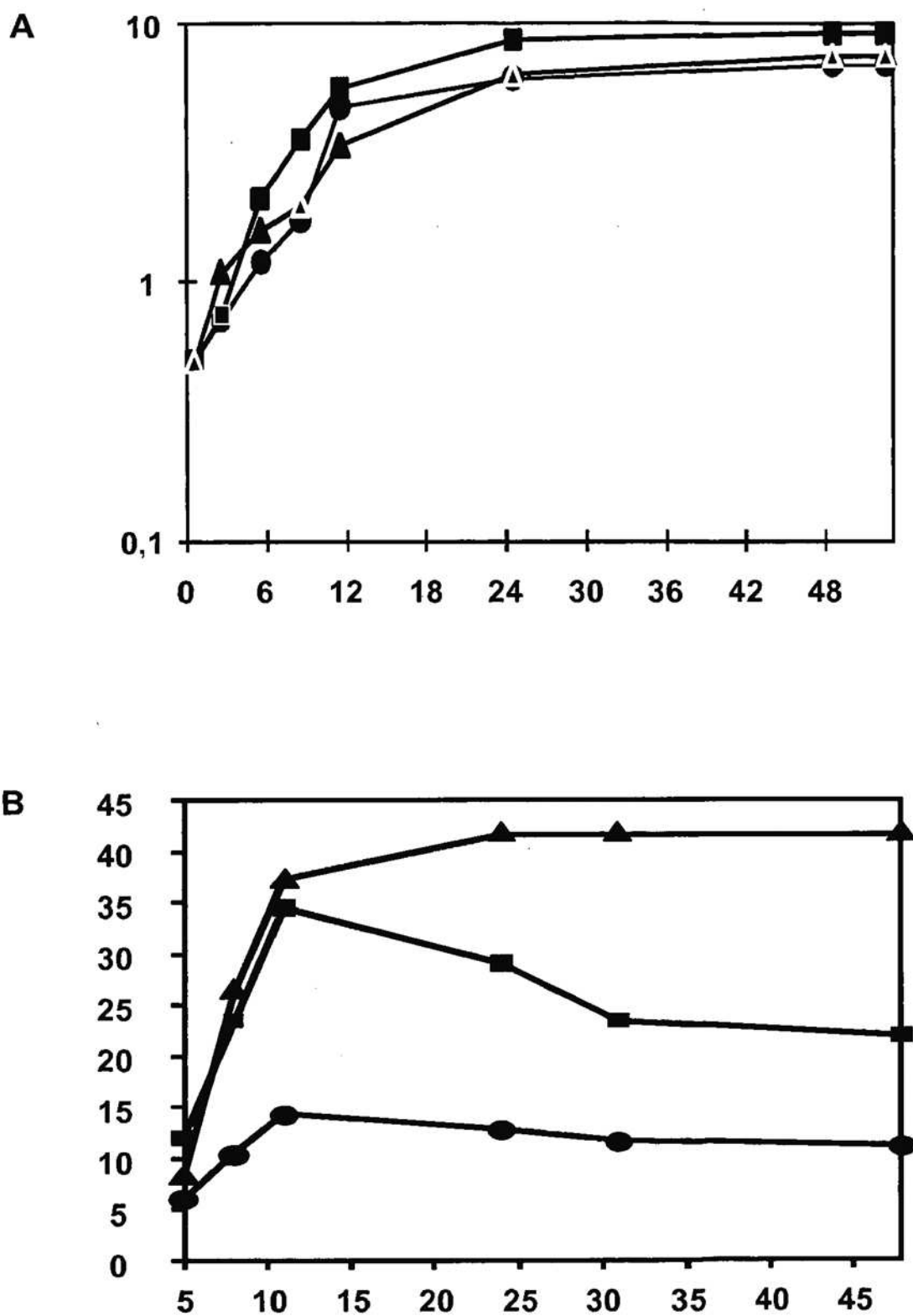


Figura 2

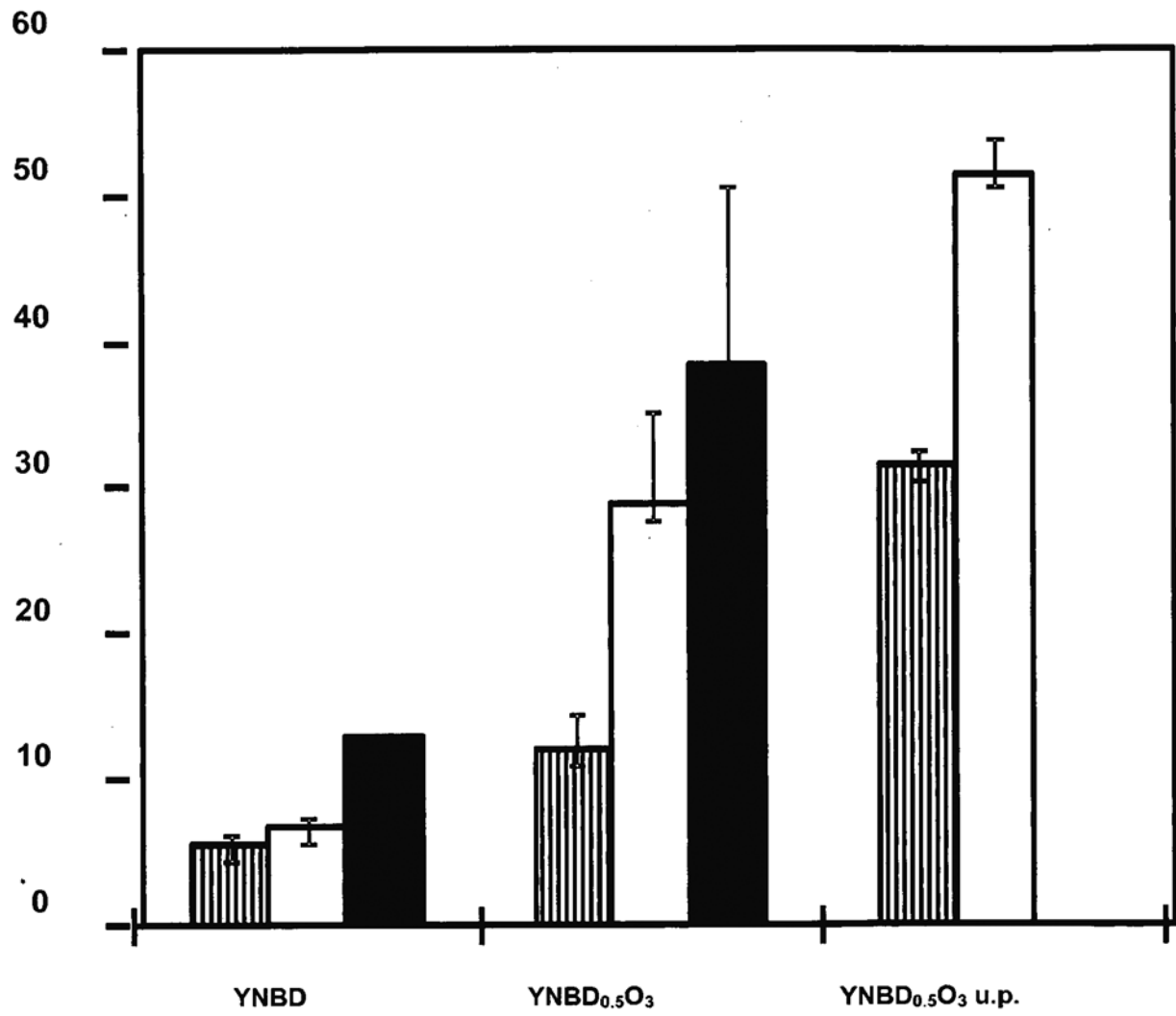


Figura 3

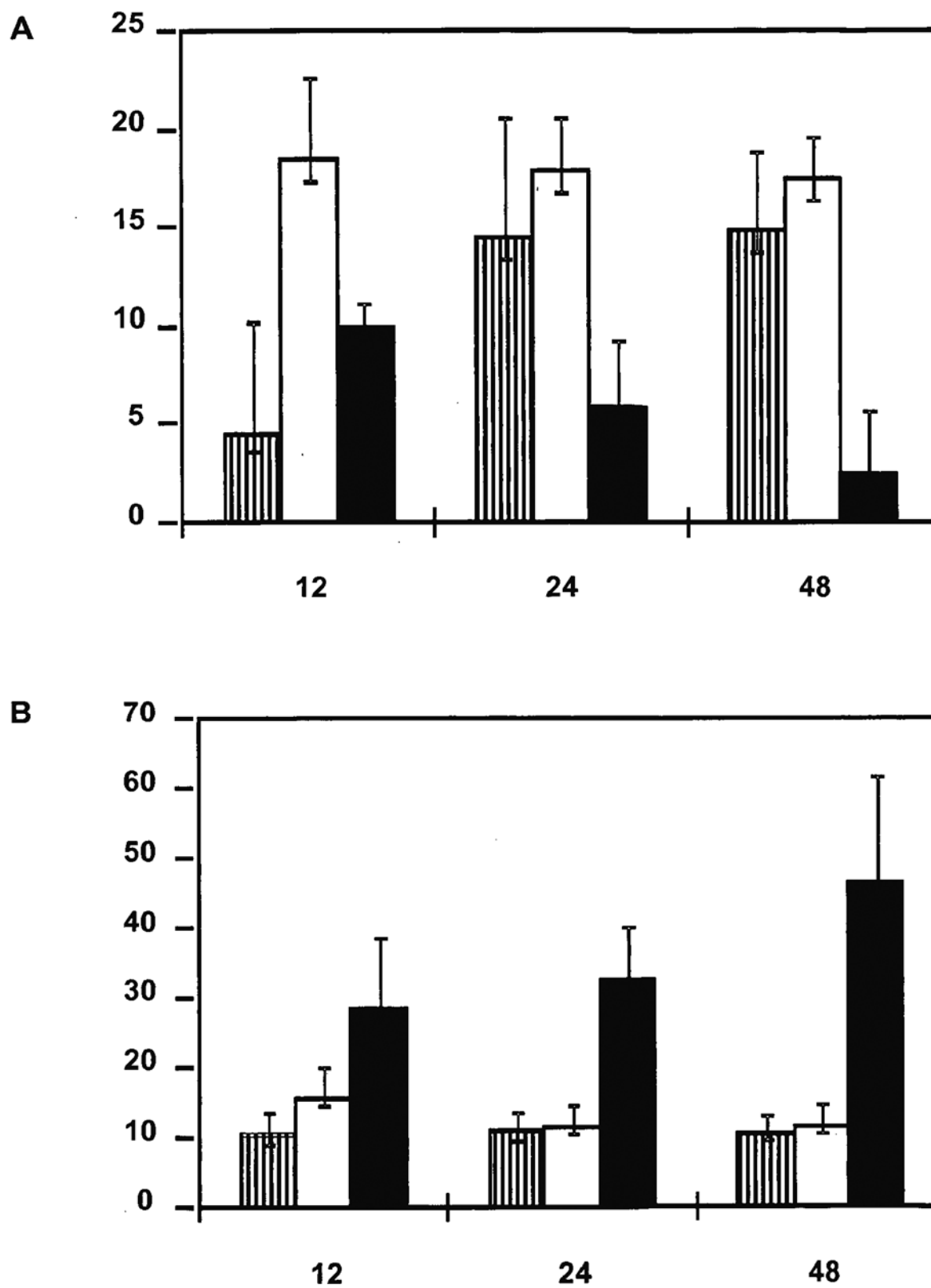


Figura 4

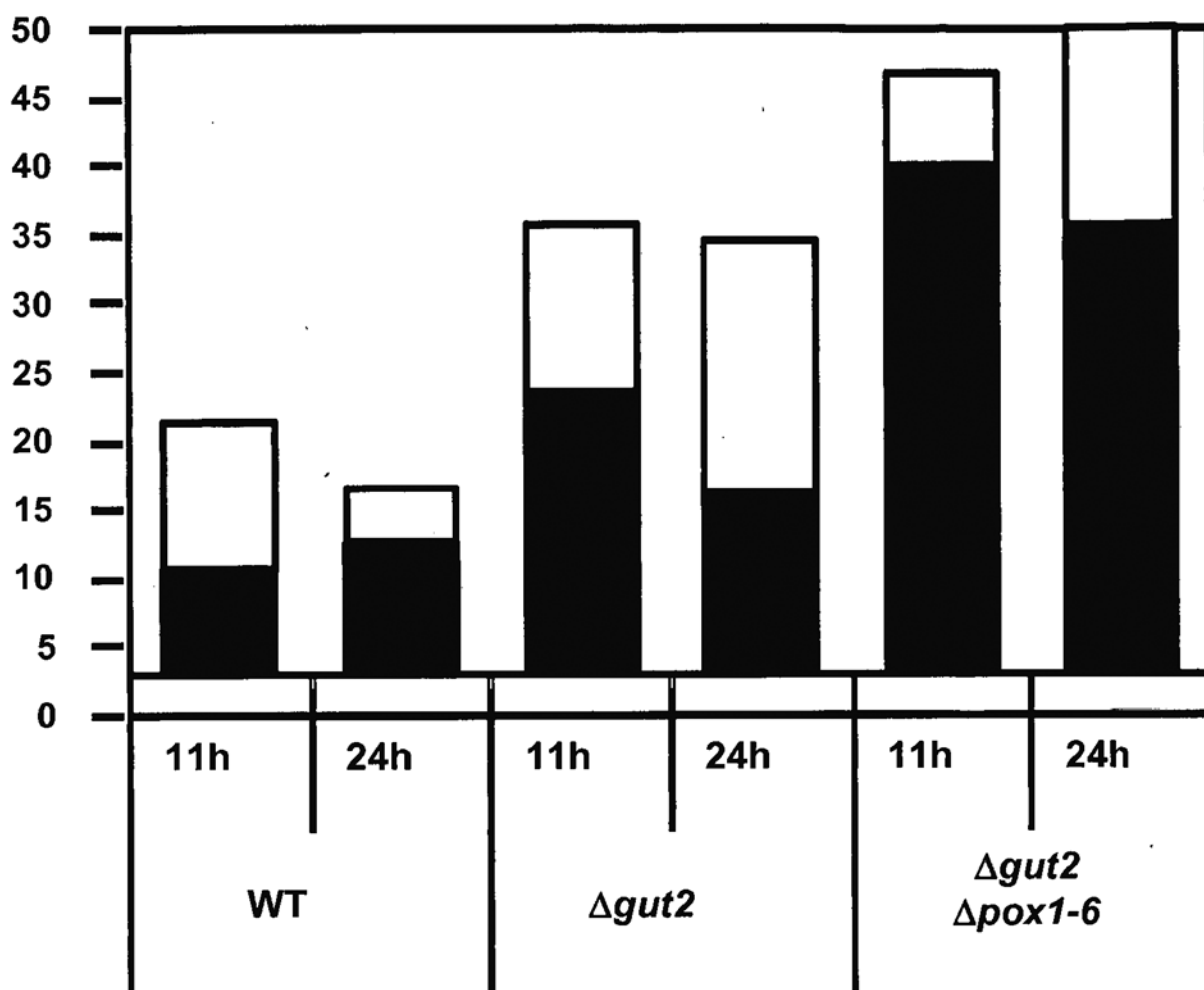


Figura 5

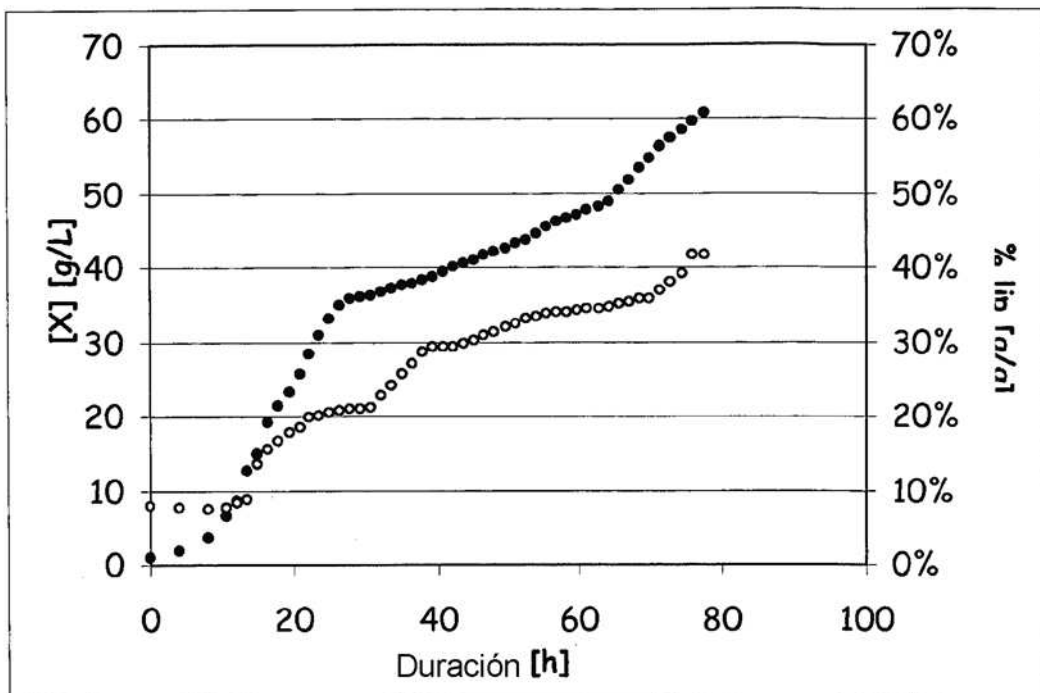


Figura 6

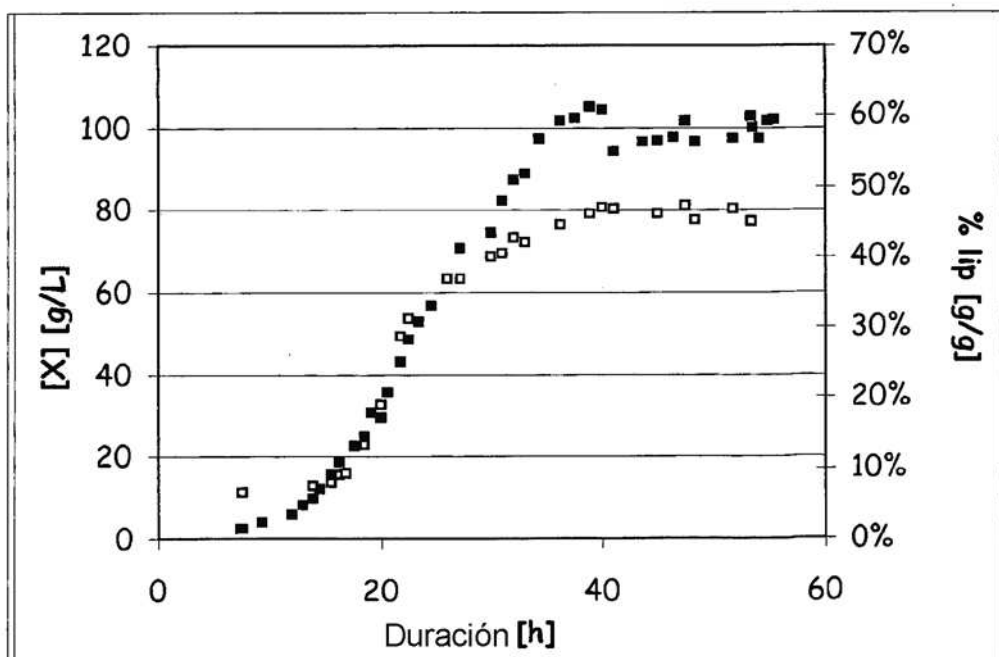


Figura 7

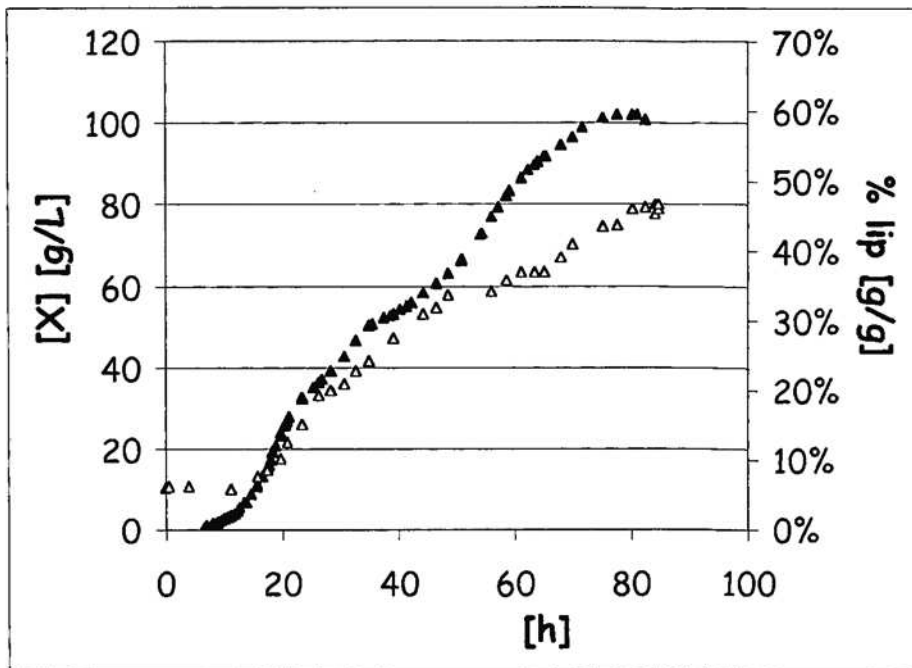
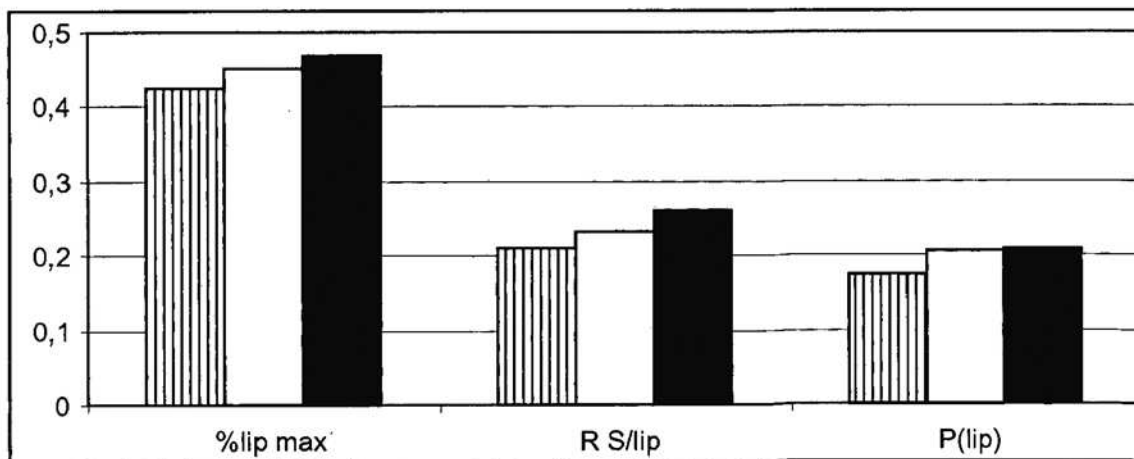


Figura 8



% lip max contenido final en lípidos en $g_{lip} \cdot gx^{-1}$
 R S/lip rendimiento de conversión del sustrato en lípidos en $g_{lip} \cdot gglc^{-1}$
 P(lip) productividad volúmica de la producción de lípidos en $g_{lip} \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$

Figura 9