

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 985 126**

51 Int. Cl.:

C12P 23/00 (2006.01)

C12P 5/00 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01)

C12N 9/90 (2006.01)

C07K 14/245 (2006.01)

C12N 9/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.02.2018 PCT/SG2018/050087**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.08.2018 WO18156086**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2018 E 18758451 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2024 EP 3585903**

54 Título: **Producción de carotenoides y apocarotenoides**

30 Prioridad:

24.02.2017 SG 10201701500U

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

04.11.2024

73 Titular/es:

AGENCY FOR SCIENCE, TECHNOLOGY AND RESEARCH (100.0%)

1 Fusionopolis Way, 20-10 Connexis North Tower Singapore 138632, SG

72 Inventor/es:

**ZHANG, CONGQIANG;
CHEN, XIXIAN y
TOO, HENG-PHON**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 985 126 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

Producción de carotenoides y apocarotenoides

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

[0001] La divulgación se encuentra en el campo de los carotenoides y los apocarotenoides, en particular, la divulgación se refiere a métodos mejorados para producir apocarotenoides.

10 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

[0002] Los carotenoides son un grupo de productos naturales sintetizados en muchas plantas, algas y ciertas bacterias y hongos. Los carotenoides tienen muchos enlaces de carbono insaturados y estos enlaces están conjugados, lo que contribuye a características distintivas, los colores brillantes (que van del amarillo pálido al naranja y al rojo) y potentes efectos anti-UV y antioxidantes. Debido a estas características, los carotenoides se han utilizado ampliamente como coloraciones naturales y nutracéuticos. Particularmente, el fitoeno tiene una capacidad eficaz de absorción de rayos UVB y reduce la síntesis de melanina en la piel humana, lo que genera un mercado creciente en la industria cosmética. El licopeno, el β -caroteno y el α -caroteno son bien conocidos por sus efectos antioxidantes y se han utilizado ampliamente en alimentos, cosméticos, nutracéuticos y piensos para animales.

[0003] Los apocarotenoides son una clase de compuestos derivados de carotenoides mediante oxigenasas de escisión de carotenoides. Ampliamente distribuidos en bacterias, hongos, plantas y animales, los apocarotenoides actúan como compuestos aromáticos y olfativos (α - y β -ionona), pigmentos fotosensoriales (bixina, crocina), hormonas (ácido abscísico) y compuestos de señalización (estrigolactonas). Entre los diversos apocarotenoides, la α - y β -ionona son dos compuestos aromáticos importantes. La α -ionona tiene un aroma dulce y parecido a la violeta con un umbral de olor de $\sim 0,4$ ppm. Su isómero, la β -ionona, tiene un aroma cálido, amaderado y de violeta y un umbral de olor aún más bajo de $\sim 0,007$ ppm en el aire y 1 ppm en el agua. Debido a su umbral de olor significativamente bajo y a su olor agradable, se utilizan ampliamente en la industria cosmética y de perfumería. Además de las iononas, el retinol (o la vitamina A) es otro apocarotenoide comercialmente importante. El retinol desempeña una función esencial en la visión, el desarrollo óseo y la salud de la piel como antioxidante. Como ingredientes cosméticos activos y medicamentos eficaces para las enfermedades de la piel, el tamaño del mercado del retinol se estima en aproximadamente 1,6 mil millones de dólares.

[0004] A pesar de sus altos valores comerciales, el suministro de iononas y retinoides naturales está gravemente limitado por su extremadamente baja abundancia en la naturaleza. Las iononas están presentes en niveles inferiores a ppm en muchas flores y frutas, como la rosa, el osmanto (*osmanthus*) dulce, la raíz de lirio y la frambuesa. Por ejemplo, se necesitan 100 toneladas de frambuesas, o 20 hectáreas de superficie agrícola, para producir solo 1 gramo de α -ionona. En cuanto a los retinoides, no existe una fuente natural de origen vegetal. Existe una cantidad excepcionalmente baja de retinoides en algunos alimentos de origen animal, como los huevos y la mantequilla. Por lo tanto, el suministro actual mediante la extracción de fuentes naturales no puede satisfacer la creciente demanda de iononas y retinoides naturales. Aunque estos compuestos podrían sintetizarse químicamente, los apocarotenoides, como la α -ionona, tienen centros quirales y los sintéticos suelen ser una mezcla de diferentes enantiómeros. Se sabe que los diferentes isómeros de muchos compuestos de fragancias tienen diferentes olores, por lo que es importante sintetizar un solo isómero en vez de una mezcla de isómeros. De manera más importante, los consumidores tienden a preferir los sabores naturales a los sintéticos y, por lo tanto, los ingredientes naturales tienen precios significativamente más altos. La producción de α -ionona se demostró previamente en la *Escherichia coli* modificada, pero con un rendimiento muy bajo.

[0005] Por lo tanto, existe la necesidad de proporcionar compuestos producidos naturalmente con rendimientos mejorados.

[0006] El documento WO 2017/036495 A1 divulga la producción de alfa-ionona en una célula huésped que expresa CCD1 y LycopE.

[0007] CHI-HUA LU ET AL "Laboratory-Scale Production of 13 C-Labeled Lycopene and Phytoene by Bioengineered *Escherichia coli*", JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY, vol. 59, n.º 18, 28 de septiembre de 2011 (28-09-2011), páginas 9996-10005, y el documento US 2003/087337 A1 divulgan métodos para producir fitoeno o licopeno mediante la expresión de enzimas específicas. El fitoeno o el licopeno se produce en células de *E. coli* que expresan crtE y crtB.

[0008] YONG BAE SEO ET AL, "Molecular Cloning and Co-Expression of Phytoene Synthase Gene from *Kocuria gwangalliensis* in *Escherichia coli*", JOURNAL OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOG., vol. 25, n.º 11, 28 de noviembre de 2015 (28-11-2015), páginas 1801-1809, divulgan la producción de fitoeno en *E. coli* tras la transformación con crtE y crtB.

[0009] El documento WO 2016/154314 A1 divulga un método para la producción de alfa-ionona mediante la transformación de microorganismos, en particular levaduras, con CCD1, LcyE, crtY, crtB, crtE, crtI, donde las levaduras expresan intrínsecamente atoB, hmgS, pmk y pmd.

[0010] SUSANNE BALDERMANN ET AL: "Functional characterization of a carotenoid cleavage dioxygenase 1 and its relation to the carotenoid accumulation and volatile emission during the floral development of *Osmanthus fragrans* Lour.", JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY, vol. 61, n.º 11, 17 de mayo de 2010 (17-05-2010), páginas 2967-2977, divulgan células huésped que comprenden una enzima generadora de alfa-ionona, en particular de CCD1 de *Osmanthus fragrans*.

RESUMEN

[0011] En un aspecto, se proporciona un método para producir un apocarotenoide que comprende el paso de expresar en una célula de *Escherichia coli* (*E. coli*) un módulo de expresión que comprende un vector de expresión que tiene una región codificante que codifica enzimas generadoras de apocarotenoides optimizadas, donde la región codificante está unida operativamente a un promotor, donde el apocarotenoide es α -ionona, donde dichas enzimas generadoras de apocarotenoides optimizadas son *LcyE* y *CCD1* que forman un operón que tiene la estructura: *LcyE-CCD1*, donde dicha *LcyE* es *LcyE* de *Lactuca sativa* (*LsLcyE*) y está truncada en el extremo N-terminal; y donde la *LcyE* comprende un truncamiento N-terminal de 50 aminoácidos (Δ N50-*LsLcyE*).

[0012] En un aspecto, se proporciona una célula de *E. coli* que comprende un módulo de expresión que comprende un vector de expresión que tiene una región codificante que codifica enzimas generadoras de apocarotenoides optimizadas, donde la región codificante está unida operativamente a un promotor, donde los productos génicos optimizados son Δ N50-*LsLcyE* y *TrxA-CCD1* de *Osmanthus fragrans*.

[0013] En un aspecto, se proporciona un kit, cuando se usa en el método descrito en este caso, para la producción de un apocarotenoide que comprende: un primer vector que codifica uno o más primeros productos génicos optimizados seleccionados de entre *atoB*, *hmgS*, *thmgR* unidos operativamente a un promotor; un segundo vector que codifica uno o más segundos productos génicos optimizados seleccionados de entre *mevK*, *pmk*, *pmd* o *idi* unidos operativamente a un promotor; un tercer vector que codifica uno o más terceros productos génicos optimizados seleccionados de entre *ispA*, *crtE*, *crtB*, o *crtI*, unidos operativamente a un promotor; y un cuarto vector que codifica productos génicos optimizados Δ N50-*LsLcyE* y *TrxA-CCD1* de *Osmanthus fragrans* unidos operativamente a un promotor para la producción de α -ionona.

[0014] En un aspecto, se proporciona un sistema para producir un apocarotenoide que comprende un módulo de expresión que comprende un vector de expresión que tiene una región codificante que codifica enzimas generadoras de apocarotenoides optimizadas, donde la región codificante está unida operativamente a un promotor, donde dichas enzimas generadoras de apocarotenoides optimizadas son Δ N50-*LsLcyE* y *TrxA-CCD1* de *Osmanthus fragrans* para la producción de α -ionona.

DEFINICIONES

[0015] Como se utiliza en este documento, el término "región codificante", también conocida como secuencia codificante o CDS (de secuencia de ADN codificante), es esa porción de ADN o ARN, compuesta por exones, que codifica una proteína.

[0016] Como se utiliza en este documento, un "operón" se refiere a un grupo de genes o un segmento de ADN que funciona como una única unidad de transcripción. Puede estar compuesto por un operador, un promotor y uno o más genes estructurales que se transcriben en un ARNm policistrónico.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0017] La divulgación se entenderá mejor con referencia a la descripción detallada cuando se considera junto con los ejemplos no limitativos y los dibujos adjuntos, en los que:

La **figura 1** es un diagrama de la plataforma "plug-n-play" para la biosíntesis de carotenos y apocarotenoides. La materia prima son azúcares económicos (como la glucosa) o el glicerol. La plataforma podría producir varios carotenos (fitoeno, licopeno, α -caroteno, β -caroteno, δ -caroteno y ϵ -caroteno) y apocarotenoides (α -ionona, β -ionona, ψ -ionona, retinol, dialdehídos (C17 y C19), geranilacetona, β -ciclocitral y 6-metil-5-hepten-2-ona (MHO)).

La **figura 2** es una representación esquemática de módulos de expresión para la síntesis de caroteno. La vía ascendente del MVA (módulo de expresión 1), la vía descendente del MVA (módulo 2), la vía del fitoeno o licopeno (módulo de expresión 3), la vía del caroteno (módulo de expresión 4). Los genes expresados codifican las siguientes enzimas: *atoB*, acetoacetil-CoA tiolasa; *hmgS*, HMG-CoA sintasa; *thmgR*, HMG-CoA reductasa truncada; *mevK*, mevalonato cinasa; *pmk*, fosfomevalonato quinasa; *pmd*, mevalonato pirofosfato descarboxilasa; *idi*, IPP isomerasa; *ispA*, FPP sintasa; *crtE*, GGPP sintasa; *crtB*, fitoeno sintasa; *crtI*, fitoeno

desaturasa; *crtY*, licopeno beta-ciclasa; *LCYe*, licopeno épsilon-ciclasa. Abreviatura para de los compuestos: G3P, D-gliceraldehído-3-fosfato; DHAP, dihidroxiacetona fosfato; HMG-CoA, 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A; MVA, mevalonato; MVAP, fosfomevalonato; MVAPP, difosfomevalonato; IPP, pirofosfato de isopentenilo; DMAPP, pirofosfato de dimetilalilo; HMBPP, pirofosfato de (E)-4-hidroxi-3-metil-but-2-enilo; GPP, pirofosfato de geranilo; FPP, pirofosfato de farnesilo; GGPP, pirofosfato de geranylgeranilo. La flecha discontinua indica múltiples pasos enzimáticos.

La **figura 3** muestra el espectro de absorbancia UV de varios carotenoides. Se indica la longitud de onda UVB y UVA.

La **figura 4** muestra el uso de un método de optimización sistemática de vías asistidas por diseño experimental (EDASPO, por sus siglas en inglés) para optimizar la producción de fitoeno mediante el control de los módulos SAR, MPPI y EBIA con variantes del promotor T7. El número representa la diferente fuerza de las variantes del promotor T7, donde 1, 2 y 3 representan aproximadamente el 92 %, 37 % y 16 % de la fuerza del promotor T7 nativo, respectivamente. Módulo de expresión 1, o módulo SAR, *hmgS-atoB-hmgR*; módulo de expresión 2, o módulo MPPI, *mevK*, *pmk*, *pmd* e *idi*; módulo de expresión 3, o módulo EBA, vía biosintética del fitoeno (*crtEB* e *ispA*).

La **figura 5** muestra el uso del método EDASPO para optimizar la producción de licopeno mediante el control de los módulos de expresión SAR, MPPI y EBIA con variantes del promotor T7. El número representa la diferente fuerza de las variantes del promotor T7, donde 1, 2 y 3 representan aproximadamente el 92 %, 37 % y 16 % de la fuerza del promotor T7 nativo, respectivamente. Módulo de expresión 1, o módulo SAR, *hmgS-atoB-hmgR*; módulo de expresión 2, o módulo MPPI, *mevK*, *pmk*, *pmd* e *idi*; módulo de expresión 3, o módulo EBIA, vía biosintética del licopeno (*crtEBI* e *ispA*).

La **figura 6** muestra la producción de ϵ -caroteno en la cepa de *E. coli* que acumula licopeno. Producción de carotenoides de cepas que expresan diferentes formas de enzimas LCYe. Una ilustración de promotores y genes regulados para diferentes cepas. Se probaron diferentes LCYe de *Lactuca sativa* truncadas en el extremo N-terminal. Las abreviaturas son las siguientes: LL, enzima LCYe de tipo salvaje de *Lactuca sativa*; L25, enzima LCYe con los primeros 25 aminoácidos eliminados; L34, enzima LCYe con los primeros 34 aminoácidos eliminados; L50, enzima LCYe con los primeros 50 aminoácidos eliminados; L75, enzima LCYe con los primeros 75 aminoácidos eliminados; L92, enzima LCYe con los primeros 92 aminoácidos eliminados; L100, enzima LCYe con los primeros 100 aminoácidos eliminados. Consulte la descripción de la cepa en la tabla 3. Todas las mediciones fueron un promedio de triplicados con la barra de error estándar mostrada en la figura. También se indicó el porcentaje de ϵ -caroteno en los carotenoides totales finales (licopeno + δ -caroteno + ϵ -caroteno).

La **figura 7** muestra un análisis de expresión de proteínas y ARNm de *LsLcyE* y *OfCCD1* con modificaciones N-terminales. (A) Imagen en gel de SDS-PAGE de la expresión de proteínas de células completas de *LsLcyE* y *OfCCD1* con varias modificaciones N-terminales. Las proteínas de interés se indicaron con una flecha azul. Carril 1: células de *E. coli* con *LsLcyE* sobreexpresada. Carril 2: células de *E. coli* con $\Delta 50$ -*LsLcyE* sobreexpresada (L50). Carril 3: células de *E. coli* con $\Delta 100$ -*LsLcyE* (L100) sobreexpresada. Carril 4: células de *E. coli* con *OfCCD1* sobreexpresada. Carril 5: células de *E. coli* con SUMO-*OfCCD1* sobreexpresada (SUMO-O). Carril 6: Células de *E. coli* con MBP-*OfCCD1* (MBP-O) sobreexpresada. Carril 7: células de *E. coli* con TrxA-*OfCCD1* sobreexpresada (TrxA-O). Carril 8: células de *E. coli* sin sobreexpresión (control). El análisis cuantitativo del rendimiento de proteína sobreexpresada se basó en la intensidad de la banda en gel de SDS-PAGE. (B) Expresión de *LsLcyE* con varios truncamientos N-terminales. (C) Nivel de expresión de ARNm de *LsLcyE* y su versión truncada. (D) Expresión de *OfCCD1* con diferentes socios de fusión. (E) Nivel de expresión de ARNm de *OfCCD1* con diferentes proteínas de fusión. El cambio en veces relativo de la expresión de proteínas se normalizó mediante la expresión de *LsLcyE* (B y C) y SUMO-*OfCCD1* (D y E). Los resultados fueron el promedio de triplicados con la barra de error estándar mostrada.

La **figura 8** es un diagrama esquemático de la vía biosintética de apocarotenoides (por ejemplo, β -ionona y retinoides). La vía biosintética se agrupó en cuatro módulos principales: la vía ascendente del MVA (módulo de expresión 1), la vía descendente del MVA (módulo de expresión 2), la vía del licopeno (módulo de expresión 3) y la vía del apocarotenoide (módulo de expresión 4). Los genes expresados codifican las siguientes enzimas: *atoB*, acetoacetil-CoA tiolasa; *hmgS*, HMG-CoA sintasa; *thmgR*, HMG-CoA reductasa truncada; *mevK*, mevalonato quinasa; *pmk*, fosfomevalonato quinasa; *pmd*, mevalonato pirofosfato descarboxilasa; *idi*, IPP isomerasa; *ispA*, FPP sintasa; *crtE*, GGPP sintasa; *crtB*, fitoeno sintasa; *crtI*, fitoeno desaturasa; *LCYe*, licopeno épsilon-ciclasa; *crtY*, licopeno beta-ciclasa; *CCD1*, dioxigenasa de escisión de carotenoides; *BCDO* (o *blh*), β -caroteno dioxigenasa; *ybbO*, aldehído reductasa dependiente de NADP⁺. Abreviatura de los compuestos: G3P, D-gliceraldehído-3-fosfato; DHAP, fosfato de dihidroxiacetona; HMG-CoA, 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A; MVA, mevalonato; MVAP, fosfomevalonato; MVAPP, difosfomevalonato; IPP, pirofosfato de isopentenilo; DMAPP, pirofosfato de dimetilalilo; HMBPP, pirofosfato de (E)-4-hidroxi-3-metil-but-2-enilo; GPP, pirofosfato de geranilo; FPP, pirofosfato de farnesilo; GGPP, pirofosfato de geranylgeranilo. La flecha discontinua indica múltiples pasos enzimáticos.

La **figura 9** muestra la producción de α -ionona en cepa de *E. coli* que acumula ϵ -caroteno. (A) Optimización de *CCD1* con socios de fusión (FP, por sus siglas en inglés) N-terminales, se completó un inserto de figura con una escala de eje y diferente para comparar los títulos de ionona de las cepas 121-LO y 121-L50-O. (B) Carotenoides intracelulares que permanecieron sin escindir. (C) Una ilustración de promotores y genes regulados para diferentes cepas. Las abreviaturas son las siguientes: LO, *LsLcyE* y *OfCCD1* se expresaron de forma policistónica en el mismo plásmido; L50-O, L50-O, la enzima *LsLcyE* con los primeros 50

aminoácidos eliminados (L50) y OfCCD1 se expresaron de forma policistónica. Se coexpresaron L50-SUMO-O, L50 y OfCCD1 fusionada con SUMO. Se coexpresaron L50-MBP-O, L50 y OfCCD1 fusionada con MBP. Se coexpresaron L50-TrxA-O, L50 y OfCCD1 fusionada con TrxA.

La **figura 10** muestra la solubilidad proteica de OfCCD1 con modificaciones N-terminales. Las proteínas de interés se indicaron con flechas. Carril 1: OfCCD1 insoluble. Carril 2: OfCCD1 soluble. Carril 3: SUMO-OfCCD1 insoluble. Carril 4: SUMO-OfCCD1 soluble. Carril 5: MBP-OfCCD1 insoluble. Carril 6: MBP-OfCCD1 soluble. Carril 7: TrxA-OfCCD1 insoluble. Carril 8: TrxA-OfCCD1 soluble.

La **figura 11** muestra el modelado de homología de OfCCD1 basado en la estructura cristalina de viviparous14 de *Zea mays* (PDB: 3NPE). Las dos hélices que interactúan con la membrana están marcadas. La membrana está representada por el área sombreada. El cofactor, Fe^{2+} y el oxígeno están marcados.

La **figura 12** muestra la ingeniería de la segunda hélice de OfCCD1 que interactúa con la membrana. (A) Una comparación del título de α -ionona y ψ -ionona entre OfCCD1 de tipo ancho y OfCCD1 modificada con mutaciones (L151F, M152T y N154Y). (B) Biomasa de la cepa modificada. (C) La solubilidad y el cambio en veces en la expresión total de OfCCD1 de tipo ancho fusionada con TrxA y OfCCD1 mutante fusionada con trxA. (D) La imagen en gel de SDS-PAGE de OfCCD1 de tipo ancho fusionada con TrxA y OfCCD1 mutante fusionada con trxA. Carril M, marcador molecular. Carril 1, las proteínas totales de células de *E. coli* que expresan OfCCD1 de tipo ancho fusionada con trxA. Carril 2, las proteínas solubles de células de *E. coli* que expresan OfCCD1 de tipo ancho fusionada con trxA. Carril 3, las proteínas totales de células de *E. coli* que expresan OfCCD1 mutante fusionada con trxA. Carril 4, las proteínas solubles de células de *E. coli* que expresan OfCCD1 mutante fusionada con trxA.

La **figura 13** muestra la fermentación por lotes alimentados de apocarotenoides. (A) Perfiles de curso temporal para iononas y biomasa. (B) Una ilustración de promotores y genes regulados para la cepa usada en la fermentación por lotes alimentados. Separado por inducción, el proceso constaba de dos fases principales: la fase de biomasa que acumulaba solo biomasa y la fase de producción que producía simultáneamente ionona y biomasa. Se usó miristato de isopropilo como capa orgánica para extraer la α , β y ψ -ionona. (C) Una ilustración de la separación *in situ* de apocarotenoides en un biorreactor. Aceite de coco de calidad alimentaria (o aceite de soja, etc.) como capa orgánica para extraer la α , β y ψ -ionona. Se utilizaron medios químicamente definidos sin aminoácidos ni vitaminas para reducir el costo del medio.

La **figura 14** muestra el análisis de quiralidad de la α -ionona. El producto es 100 % enantiómero R de α -ionona e idéntico a la α -ionona natural. En contraste, la ionona sintetizada químicamente es una mezcla de 50 % de enantiómero R y 50 % de enantiómero S.

La **figura 15** demuestra las estrategias de ingeniería metabólica empleadas para la producción de β -ionona. Comparación de OfCCD1 de tipo salvaje, OfCCD1 modificada en el extremo N-terminal y suplementación de *crtY*. En las cepas, Of, TOf y crtY, se expresaron el operón/gen *crtY-OfCCD1*, *crtY-TrxA-OfCCD1* y *crtY*, respectivamente. En la cepa TOf+Y, se suplementó una copia adicional del gen *crtY* en el vector p15A-spec. (A) Producción de ionona en la cepa modificada. La cepa crtY fue la cepa de control que no expresó el gen CCD1, por lo que solo produjo β -caroteno. (B) Carotenoides acumulados en la cepa modificada. (C) Biomasa de las cepas modificadas. Aunque la fusión de tioredoxina no logró mejorar la producción de β -ionona, dio como resultado un aumento de 37 veces en la producción del subproducto ψ -ionona que se convirtió a partir de licopeno mediante TOfCCD1. La suplementación de *crtY* adicional convirtió eficazmente más licopeno en β -caroteno, por lo que la producción de β -ionona mejoró significativamente y la ψ -ionona se redujo significativamente.

La **figura 16** muestra los cromatogramas de GC de productos en las cepas TOf y TOf+Y.

La **figura 17** muestra los espectros de masas de α , β y ψ -ionona.

La **figura 18** muestra el alineamiento de diferentes variantes de CCD1 en este estudio. El alineamiento se realizó mediante la herramienta de alineamiento de secuencias múltiples Clustal Omega. La información sobre CCD1 se resumió en la tabla 4.

La **figura 19** demuestra el cribado de CCD con mayor selectividad. (A) Producción de ionona usando diferente CCD. (B) Carotenoides acumulados en células de *E. coli* con diferentes CCD. En las cepas TOf, At, Vv, Ph, TPh se expresaron el operón/gen *crtY-TrxA-OfCCD1*, *crtY-AtCCD1*, *crtY-VvCCD1*, *crtY-fCCD1* y *crtY-TrxA-fCCD1*, respectivamente. En las cepas Ph+Y y TPh+Y, se complementó una copia adicional del gen *crtY* en el vector p15A-spec. Se ha observado que *PhCCD1* tenía una mayor selectividad por β -caroteno frente a licopeno que *VvCCD1* y *OfCCD1*, por lo que producía un título más alto de ionona y una menor cantidad de ψ -ionona. (C) Fermentación por lotes alimentados de β -ionona con la cepa TPh+Y. (D) Una ilustración de promotores y genes regulados para diferentes cepas.

La **figura 20** muestra los espectros de masas de dialdehídos y dialcoholes producidos en el fermentador. Se detectaron C17 y C19 de dialdehídos y dialcoholes, pero no C14.

La **figura 21** muestra el cribado de CCD2 y CCD4 con mejor actividad y selectividad. El gráfico superior muestra el uso de β -caroteno como sustrato para la producción de β -ionona. El gráfico inferior muestra el uso de caroteno como sustrato para la producción de α -ionona.

La **figura 22** muestra la producción de retinoides en el sistema modularizado. (A) Producción de retinoides usando diferentes genes *blh* y mayor copia genética de *crtY*. (B) Carotenoides acumulados en diferentes células de *E. coli*. Para producir otros apocarotenoides, simplemente podríamos reemplazar la enzima CCD1 por otras oxigenasas de escisión de carotenoides correspondientes. Aquí, usamos BCDO (*blh*) para producir retinoides. (C) Una ilustración resumida del sistema modular para la producción de diferentes apocarotenoides.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA PRESENTE INVENCION

- 5 [0018] En un primer aspecto, la presente descripción se refiere a un método para producir un apocarotenoide. El método comprende el paso de expresar en una célula huésped un módulo de expresión que comprende un vector de expresión que tiene una región codificante que codifica enzimas generadoras de apocarotenoides optimizadas, donde la región codificante está unida operativamente a un promotor.
- 10 [0019] El apocarotenoide puede ser α -ionona.
- [0020] La enzima generadora de apocarotenoides optimizada, como se describe en el presente documento, se puede seleccionar de entre *CCD1* o *LcyE*.
- 15 [0021] En una forma de realización, el apocarotenoide puede ser α -ionona y la enzima generadora de apocarotenoides optimizada se puede seleccionar de entre *LcyE* y *CCD1*, y puede formar un operón que tiene la estructura: *LcyE-CCD1*.
- [0022] En algunas formas de realización, la *LcyE* se puede derivar de *Lactuca sativa* y está truncada en el extremo N-terminal (que oscila entre 1 y 100 aminoácidos de *LsLcyE*, especialmente $\Delta N50$ -*LsLcyE*).
- 20 [0023] La *CCD1* se puede expresar como una proteína de fusión seleccionada de entre *TrxA-CCD1*, *SUMO-CCD1* o *MEP-CCD1*.
- [0024] En algunas formas de realización, la proteína de fusión es *TrxA-CCD1*. La proteína de fusión se puede seleccionar de entre *TrxA-CCD1* de *Osmanthus fragrans* o *TrxA-CCD1* de *Petunia hybrid*.
- 25 [0025] En algunas formas de realización, la *CCD1* se puede derivar de *Osmanthus fragrans* (*OfCCD1*). En algunas formas de realización, la *OfCCD1*, como se describe en este caso, se puede optimizar entre las posiciones de aminoácidos F148 a I167. En particular, *OfCCD1* puede comprender una o más de las siguientes mutaciones: N154Y, M152T, L151F.
- 30 [0026] En algunas formas de realización, el método puede comprender el análisis de un nivel de expresión de α -ionona en una cantidad de 10 a 1000 mg/l; de 200 a 800 mg/l; de 300 a 700 mg/L; de 400 a 600 mg/l en un periodo de 24 horas. En algunas formas de realización, la cantidad de α -ionona es aproximadamente 500 mg/l en un periodo de 24 horas.
- 35 [0027] La *CCD1*, como se describe en este caso, se puede derivar de *Petunia hybrida* (*PhCCD1*).
- [0028] En algunas formas de realización, la cantidad de α -ionona es aproximadamente 500 mg/L en un periodo de 24 horas.
- 40 [0029] La enzima generadora de apocarotenoides optimizada puede ser *LcyE*. En algunas formas de realización, la *LcyE* se puede derivar de *Lactuca sativa* (*LsLcyE*) y puede estar truncada en el extremo N-terminal. En algunas formas de realización, la *LsLcyE* puede comprender un truncamiento N-terminal de 1-100 aminoácidos; de 30-70 aminoácidos o de 40-60 aminoácidos. En algunas formas de realización, la *LsLcyE* comprende un truncamiento N-terminal de 50 aminoácidos ($\Delta N50$ -*LsLcyE*).
- 45 [0030] En algunas formas de realización, el método puede comprender, además, expresar en dicha célula huésped: un primer módulo de expresión que comprende un vector de expresión que tiene una primera región codificante que codifica uno o más primeros productos génicos optimizados seleccionados de entre *atoB*, *hmgS*, y *thmgR*, donde la primera región codificante está unida operativamente a un promotor; un segundo módulo de expresión que comprende un vector de expresión que tiene una segunda región codificante que codifica uno o más segundos productos génicos optimizados seleccionados de entre *mevK*, *pmk*, *pmd* o *idi*, donde la segunda región codificante está unida operativamente a un promotor; un tercer módulo de expresión que comprende un vector de expresión que tiene una tercera región codificante que codifica uno o más terceros productos génicos optimizados seleccionados de entre *ispA*, *crtE*, *crtB* o *crtI*, donde la tercera región codificante está unida operativamente a un promotor.
- 50 [0031] En algunas formas de realización, el uno o más primeros productos génicos pueden formar un operón que tiene la estructura: *atoB-hmgS-thmgR*.
- 55 [0032] En algunas formas de realización, el uno o más segundos productos génicos pueden formar un operón que tiene la estructura: *mevK-pmk-pmd-idi*.
- 60 [0033] En algunas formas de realización, el uno o más terceros productos génicos pueden formar un operón que tiene la estructura: *crtE-crtB-crtI-ispA*.
- 65

[0034] La célula de *Escherichia coli*, como se describe en este caso, se puede seleccionar de entre BL21 DE3 o MG1655 DE3.

5 [0035] El promotor se puede seleccionar de entre uno o más de TM1, TM2 o TM3, un promotor de ARN polimerasa T7, un promotor de ARN polimerasa T5, un promotor de ARN polimerasa T3, un promotor de ARN polimerasa SP6 o un promotor inducible.

10 [0036] En algunas formas de realización, la optimización de la enzima generadora de apocarotenoides y los productos génicos optimizados se logra mediante optimización de codones o mutagénesis dirigida al sitio.

[0037] En otro aspecto, se proporciona una célula de *E. coli* que comprende un módulo de expresión que comprende un vector de expresión que tiene una región codificante que codifica enzimas generadoras de apocarotenoides optimizadas, donde la región codificante está unida operativamente a un promotor.

15 [0038] La enzima generadora de apocarotenoides optimizada se puede seleccionar de entre *CCD1* o *LcyE*.

[0039] La célula de *E. coli* puede comprender, además, un primer módulo de expresión que comprende un vector de expresión que tiene una primera región codificante que codifica uno o más primeros productos génicos optimizados seleccionados de entre *atoB*, *hmgS*, y *thmgR*, donde la primera región codificante está unida operativamente a un promotor; un segundo módulo de expresión que comprende un vector de expresión que tiene una segunda región codificante que codifica uno o más segundos productos génicos optimizados seleccionados de entre *mevK*, *pmk*, *pmd* o *idi*, donde la segunda región codificante está unida operativamente a un promotor; un tercer módulo de expresión que comprende un vector de expresión que tiene una tercera región codificante que codifica uno o más terceros productos génicos optimizados seleccionados de entre *ispA*, *crtE*, *crtB* o *crtl*, donde la tercera región codificante está unida operativamente a un promotor.

[0040] En algunas formas de realización, los productos génicos optimizados se pueden seleccionar del grupo que consta de $\Delta N50$ -*LsLcyE* y *TrxA-CCD1* de *Osmanthus fragrans*.

30 [0041] En otro aspecto, se proporciona un sistema para producir un apocarotenoide que comprende un módulo de expresión que comprende un vector de expresión que tiene una región codificante que codifica enzimas generadoras de apocarotenoides optimizadas, donde la región codificante está unida operativamente a un promotor, donde dichas enzimas generadoras de apocarotenoides optimizadas son $\Delta N50$ -*LsLcyE* y *TrxA-CCD1* de *Osmanthus fragrans* para la producción de α -ionona.

[0042] En algunas formas de realización, el sistema puede comprender, además: un primer módulo de expresión que comprende un vector de expresión que tiene una primera región codificante que codifica uno o más primeros productos génicos optimizados seleccionados de entre *atoB*, *hmgS* y *thmgR*, donde la primera región codificante está unida operativamente a un promotor; un segundo módulo de expresión que comprende un vector de expresión que tiene una segunda región codificante que codifica uno o más segundos productos génicos optimizados seleccionados de entre *mevK*, *pmk*, *pmd* o *idi*, donde la segunda región codificante está unida operativamente a un promotor; un tercer módulo de expresión que comprende un vector de expresión que tiene una tercera región codificante que codifica uno o más terceros productos génicos optimizados seleccionados de entre *ispA*, *crtE*, *crtB* o *crtl*, donde la tercera región codificante está unida operativamente a un promotor.

[0043] En otro aspecto, se proporciona un kit, cuando se usa en el método descrito en este caso, para la producción de un apocarotenoide que comprende: un primer vector que codifica uno o más primeros productos génicos optimizados seleccionados de entre *atoB*, *hmgS* y *thmgR* unidos operativamente a un promotor; un segundo vector que codifica uno o más segundos productos génicos optimizados seleccionados de entre *mevK*, *pmk*, *pmd* o *idi* unidos operativamente a un promotor; un tercer vector que codifica uno o más terceros productos génicos optimizados seleccionados de entre *ispA*, *crtE*, *crtB* o *crtl* unidos operativamente a un promotor; y un cuarto vector que codifica productos génicos optimizados $\Delta N50$ -*LsLcyE* y *TrxA-CCD1* de *Osmanthus fragrans* unidos operativamente a un promotor para la producción de α -ionona.

55 [0044] El método para producir un apocarotenoide puede comprender los pasos de: A. poner en contacto una célula de *E. coli*, como se describe en este caso, en un medio químicamente definido con un sustrato para la producción de apocarotenoides; B. incubar la célula de *E. coli* en dichos medios químicamente definidos para producir uno o más apocarotenoides preseleccionados, y C. extraer el uno o más apocarotenoides preseleccionados de los medios químicamente definidos usando una capa orgánica.

[0045] La capa orgánica puede ser aceite de coco o aceite de soja u otros aceites comestibles.

60 [0046] El apocarotenoide puede ser α -ionona.

65

[0047] La divulgación descrita ilustrativamente en este documento se puede practicar adecuadamente en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones, no descritos específicamente aquí. Por tanto, por ejemplo, los términos "que comprende/n", "que incluye/n", "que contiene/n", etc. deben leerse de forma amplia y sin limitación. Adicionalmente, los términos y las expresiones empleados en este documento se han usado como términos de descripción y no de limitación, y no existe ninguna intención en el uso de dichos términos y expresiones de excluir ningún equivalente de las características mostradas y descritas o partes de las mismas, pero se reconoce que son posibles varias modificaciones dentro del alcance de la presente descripción. Por lo tanto, se debe entender que, aunque la presente descripción se ha descrito específicamente mediante formas de realización preferidas y características opcionales, los expertos en la técnica pueden recurrir a la modificación y variación de las divulgaciones aquí plasmadas, y que dichas modificaciones y variaciones se consideran que están dentro del alcance de esta divulgación.

[0048] La divulgación se ha descrito amplia y genéricamente en el presente documento. Cada una de las especies más reducidas y cada uno los grupos subgenéricos que se encuentran dentro de la divulgación genérica también forman parte de la divulgación. Esto incluye la descripción genérica de la divulgación con una condición o limitación negativa que elimina cualquier tema del género, independientemente de si el material eliminado se menciona específicamente aquí.

[0049] Otras formas de realización están dentro de las siguientes reivindicaciones y los siguientes ejemplos no limitantes. Además, cuando las características o los aspectos de la divulgación se describen en términos de grupos de Markush, los expertos en la técnica reconocerán que la divulgación también se describe en términos de cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo de Markush.

SECCIÓN EXPERIMENTAL

[0050] Los ejemplos no limitantes de la divulgación y los ejemplos comparativos se describirán con mayor detalle mediante referencia a ejemplos específicos, que no se deben interpretar como limitantes de ninguna manera del alcance de la divulgación.

Materiales y métodos

[0051] En este estudio se utilizó la cepa de *E. coli* *Bl21-Gold DE3* (*Stratagene*). Los genes *hmgS*, *hmgR*, *mevK*, *pmk* y *pmd* (o *MVD1*) se amplificaron mediante PCR usando el ADN cromosómico de *Saccharomyces cerevisiae*. Los genes *atoB* e *idi* se amplificaron a partir del ADN genómico de *E. coli*. Todos los genes se clonaron en dos plásmidos, p15A-*spec-hmgS-atoB-hmgR* (L2-8) y p15A-*cam-mevK-pmk-pmd-idi* (L2-5). Los genes de la vía biosintética del licopeno (*crtEBl*) amplificadas a partir del plásmido pAC-LYC se introdujeron en el plásmido p15A-*kan-crtEEI-ispA*. El gen *LCYe* de *Lactuca sativa* (enzima LsLCYe), el gen *crtY* de *Pantoea ananatis*, el gen *CCD1* de *Arabidopsis thaliana*, *Osmanthus fragrans*, *Vitis vinifera* y *Petunia hybrid* y los genes *blh* de la bacteria marina no cultivada (*Uncultured marine bacterium*) *HF10_19P19* (*blh1*) y la bacteria marina no cultivada 66A03 (*blh2*) fueron optimizados con codones y sintetizados por Integrated DNA Technologies. El gen *LsLCYe* y el gen *crtY* se clonaron por primera vez en el plásmido p15A-*amp-LsLCYe* (L2-9) y p15A-*amp-crtY* (L2-9), respectivamente. El gen *OfCCD1* se insertó en el plásmido p15A-*amp-LsLCYe* (L2-9). Posteriormente se insertaron diferentes genes *CCD1* o *blh* en la cepa p15A-*amp-crtY* (L2-9). La mutagénesis dirigida al sitio se introdujo a partir de cebadores sintetizados por Integrated DNA Technologies. Se insertó una copia adicional de *crtY* en el plásmido p15A-*spec-hmgS-aloB-hmgR* (L2-8). Todos los plásmidos p15A se derivaron del plásmido pAC-LYC. La estructura en tallo-bucle del ARN I en el origen del plásmido p15A mutó para hacer que los plásmidos fueran compatibles entre sí. Las variantes del promotor T7 son TM1, TM2 y TM3 y se resumieron en la tabla 1. La información sobre plásmidos y cepas se resumió en las tablas 2 y 3.

La tabla 1 resume las secuencias de los promotores usadas.

Nombre del promotor	Secuencia
T7	TAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCG
M1	TAATACGACTCACTAATGGGGAATTGTGAGCG
TM2	TAATACGACTCACTCGAGGGGAATTGTGAGCG
TM3	TAATACGACTCACTATAAAGGAATTGTGAGCG

La tabla 2 resume las cepas y los plásmidos usados.

Cepas o plásmidos	Descripciones
BL21 DE3	Cepa de <i>E. coli</i> <i>Bl21-Gold DE3</i> (<i>Stratagene</i>).
p15A- <i>spec-hmgS-atoB-hmgR</i> (L2-8)	Vector P15A que lleva el operón <i>atoB-hmgS-hmgR</i> controlado por el promotor TM1, con el origen p15A mutado
p15A- <i>crtY-spec-hmgS-atoB-hmgR</i> (L2-8)	Vector P15A que lleva el operón <i>crtY-atoB-hmgS-hmgR</i>

	controlado por el promotor TM1, con el origen p15A mutado
p15A- <i>cam-mevK-pmk-pmd-idi</i> (L2-5)	Vector P15A que lleva el operón <i>mevK-pmk-pmd-idi</i> controlado por el promotor TM2, con el origen p15A mutado
p15A- <i>kan-crtEBI-ispA</i>	Vector P15A que lleva el operón <i>crtEBI-ispA</i> controlado por el promotor TM1
p15A- <i>amp-LsLCYe</i> (L2-9)	Vector P15A que lleva el gen <i>LsLCYe</i> controlado por el promotor TM1, con el origen p15A mutado
p15A- <i>amp-ΔN25LsLCYe</i> (L2-9)	Vector P15A que lleva el gen <i>LsLCYe</i> , con los primeros 25 aminoácido eliminados, controlado por el promotor TM1, con el origen p15A mutado
p15A- <i>amp-ΔN34LsLCYe</i> (L2-9)	Vector P15A que lleva el gen <i>LsLCYe</i> , con los primeros 34 aminoácido eliminados, controlado por el promotor TM1, con el origen p15A mutado
p15A- <i>amp-ΔN50LsLCYe</i> (L2-9)	Vector P15A que lleva el gen <i>LsLCYe</i> , con los primeros 50 aminoácido eliminados, controlado por el promotor TM1, con el origen p15A mutado
p15A- <i>amp-ΔN75LsLCYe</i> (L2-9)	Vector P15A que lleva el gen <i>LsLCYe</i> , con los primeros 75 aminoácido eliminados, controlado por el promotor TM1, con el origen p15A mutado
p15A- <i>amp-ΔN92LsLCYe</i> (L2-9)	Vector P15A que lleva el gen <i>LsLCYe</i> , con los primeros 92 aminoácido eliminados, controlado por el promotor TM1, con el origen p15A mutado
p15A- <i>amp-ΔN100LsLCYe</i> (L2-9)	Vector P15A que lleva el gen <i>LsLCYe</i> , con los primeros 100 aminoácido eliminados, controlado por el promotor TM1, con el origen p15A mutado
p15A- <i>amp-LsLCYe-OfCCD1</i> (L2-9)	p15A- <i>amp-LsLCYe</i> (L2-9) que contiene el gen <i>OfCCD1</i>
p15A- <i>amp-ΔN50LsLCYe-OfCCD1</i> (L2-9)	p15A- <i>amp-ΔN50LsLCYe</i> (L2-9) que contiene el gen <i>OfCCD1</i>
p15A- <i>amp-ΔN50LsLCYe-SUMO-OfCCD1</i> (L2-9)	p15A- <i>amp-ΔN50LsLCYe</i> (L2-9) que contiene el gen <i>OfCCD1</i> con fusión de <i>SUMO</i>
p15A- <i>amp-ΔN50LsLCYe-MBP-OfCCD1</i> (L2-9)	p15A- <i>amp-ΔN50LsLCYe</i> (L2-9) que contiene el gen <i>OfCCD1</i> con fusión de <i>MBP</i>
p15A- <i>amp-ΔN50LsLCYe-TrxA-OfCCD1</i> (L2-9)	p15A- <i>amp-ΔN50LsLCYe</i> (L2-9) que contiene el gen <i>OfCCD1</i> con fusión de <i>trxA</i>
p15A- <i>amp-ΔN50LsLCYe-TrxA-OfCCD1_I151F_M152T_N154Y</i> (L2-9)	p15A- <i>amp-ΔN50LsLCYe</i> (L2-9) que contiene el gen <i>OfCCD1</i> con fusión de <i>trxA</i> y tres mutaciones, a saber, I151F, M152T, N154Y
p15A- <i>amp-crtY</i> (L2-9)	Vector P15A que lleva el gen <i>crtY</i> controlado por el promotor TM1, con el origen p15A mutado
p15A- <i>amp-crtY-AtCCD1</i> (L2-9)	p15A- <i>amp-TM1-crtY</i> (L2-9) que contiene el gen <i>OfCCD1</i>
p15A- <i>amp-crtY-OfCCD1</i> (L2-9)	p15A- <i>amp-TM1-crtY</i> (L2-9) que contiene el gen <i>OfCCD1</i>
p15A- <i>amp-crtY-TrxA-OfCCD1</i> (L2-9)	p15A- <i>amp-TM1-crtY</i> (L2-9) que contiene el gen <i>OfCCD1</i> con la fusión de <i>trxA</i>
p15A- <i>amp-crtY-PhCCD1</i> (L2-9)	p15A- <i>amp-TM1-crtY</i> (L2-9) que contiene el gen <i>PHCCD1</i>
p15A- <i>amp-crtY-TrxA-PhCCD1</i> (L2-9)	p15A- <i>amp-TM1-crtY</i> (L2-9) que contiene el gen <i>PhCCD1</i> con la fusión de <i>trxA</i>
p15A- <i>amp-crtY-blh1</i> (L2-9)	p15A- <i>amp-TM1-crtY</i> (L2-9) que contiene el gen <i>blh</i> de la bacteria marina no cultivada HF10_19P19
p15A- <i>amp-crtY-blh2</i> (L2-9)	p15A- <i>amp-TM1-crtY</i> (L2-9) que contiene el gen <i>blh</i> de la bacteria marina no cultivada 66A03
pET11a- <i>trxA-CaCCD2</i>	Vector pET11a que contiene el gen <i>CaCCD2</i> fusionado con <i>trxA</i> de <i>Crocus angustifolius</i>
pET11a- <i>trxA-CsCCD2</i>	Vector pET11a que contiene el gen <i>CsCCD2</i> fusionado con <i>trxA</i> de <i>Crocus sativus</i>
pET11a- <i>trxA-AtCCD4</i>	Vector pET11a que contiene el gen <i>AtCCD4</i> fusionado con <i>trxA</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>
pET11a- <i>trxA-BoCCD4b</i>	Vector pET11a que contiene el gen <i>BoCCD4b</i> fusionado con <i>trxA</i> de <i>Bixa orellana</i>
pET11a- <i>trxA-CmCCD4</i>	Vector pET11a que contiene el gen <i>CmCCD4</i> de <i>Chrysanthemum morifolium</i>
pET11a- <i>trxA-CsCCD4a</i>	Vector pET11a que contiene el gen <i>CsCCD4a</i> fusionado con <i>trxA</i> de <i>Crocus Sativus</i>
pET11a- <i>trxA-MaCCD4</i>	Vector pET11a que contiene el gen <i>MaCCD4</i> fusionado con <i>trxA</i> de <i>Musa acuminata</i> grupo AAA

pET11a- <i>trxA</i> -MdCCD4	Vector pET11a que contiene el gen MdCCD4 fusionado con <i>trxA</i> de <i>Malus domestica</i>
pET11a- <i>trxA</i> -OfCCD4	Vector pET11a que contiene el gen OfCCD4 fusionado con <i>trxA</i> de <i>Osmanthus fragrans</i>
pET11a- <i>trxA</i> -PpCCD4	Vector pET11a que contiene el gen PpCCD4 fusionado con <i>trxA</i> de <i>Prunus persica</i>
pET11a- <i>trxA</i> -RdCCD4	Vector pET11a que contiene el gen RdCCD4 fusionado con <i>trxA</i> de <i>Rosa damascena</i>
pET11a- <i>trxA</i> -VvCCD4a	Vector pET11a que contiene el gen VvCCD4a fusionado con <i>trxA</i> de <i>Vitis vinifera</i>

La tabla 3 describe las cepas usadas en el estudio.

N.º	Nombre de las cepas	Descripciones
1	121	Cepa productora de licopeno , con tres plásmidos p15A- <i>spec-hmgS-atoB-hmgR</i> (L2-8), p15A- <i>cam-mevK-pmk-pmd-idi</i> (L2-5) y p15A- <i>kan-crtEBI-ispA</i> .
2	121Y	Cepa productora de β-caroteno , con tres plásmidos p15A- <i>crtY-spec-hmgS-atoB-hmgR</i> (L2-8), p15A- <i>cam-mevK-pmk-pmd-idi</i> (L2-5) y p15A- <i>kan-crtEEI-ispA</i> .
3	121+LL	Cepa productora de ϵ-caroteno , cepa 121 con p15A- <i>amp-LsLCYe</i> (L2-9), que expresa <i>LCYe</i> de tipo salvaje.
4	121+L50	Cepa productora de ϵ-caroteno , cepa 121 con p15A- <i>amp-ΔN50LsLCYe</i> (L2-9), que expresa <i>LCYe</i> con los primeros 50 aminoácidos truncados.
5	121+L100	Cepa productora de ϵ-caroteno , cepa 121 con p15A- <i>amp-ΔN100LsLCYe</i> (L2-9), que expresa <i>LCYe</i> con los primeros 100 aminoácidos truncados.
6	121-LO	Cepa productora de α-ionona , cepa 121 con p15A- <i>amp-LsLCYe-OfCCD1</i> (L2-9), que expresa <i>LCYe</i> de tipo salvaje y <i>OfCCD1</i> de tipo salvaje.
7	121-L50-O	Cepa productora de α-ionona , cepa 121 con p15A- <i>amp-LsLCYe-OfCCD1</i> (L2-9), que expresa <i>LCYe</i> con los primeros 50 aminoácidos truncados y <i>OfCCD1</i> de tipo salvaje.
8	121-L50-SUMO-O	Cepa productora de α-ionona , cepa 121 con p15A- <i>amp-ΔN50LsLCYe-SUMO-OfCCD1</i> (L2-9), que expresa <i>LCYe</i> con los primeros 50 aminoácidos truncados y <i>OfCCD1</i> fusionada con SUMO.
9	121-L50-MBP-O	Cepa productora de α-ionona , cepa 121 con p15A- <i>amp-ΔN50LsLCYe-MBP-OfCCD1</i> (L2-9), que expresa <i>LCYe</i> con los primeros 50 aminoácidos truncados y <i>OfCCD1</i> fusionada con MBP.
10	121-L50-TrxA-O	Cepa productora de α-ionona , cepa 121 con p15A- <i>amp-ΔN50LsLCYe-TrxA-OfCCD1</i> (L2-9), que expresa <i>LCYe</i> con los primeros 50 aminoácidos truncados y <i>OfCCD1</i> fusionada con <i>TrxA</i> .
11	121-L50-TrxA-O-L151F_M152T_N154Y	Cepa productora de α-ionona , cepa 121 con p15A- <i>amp-ΔN50LsLCYe-TrxA-OfCCD1_L151F_M152T_N154Y</i> (L29), que expresa <i>LCYe</i> con los primeros 50 aminoácidos truncados y <i>OfCCD1</i> fusionada con <i>TrxA</i> con tres mutaciones.
12	Of	Cepa productora de β-ionona , cepa 121 con p15A- <i>amp-crtY-OfCCD1</i> (L2-9), que expresa <i>crtY</i> y <i>OfCCD1</i> de tipo salvaje.
13	TOf	Cepa productora de β-ionona , cepa 121 con p15A- <i>amp-crtY-TrxA-OfCCD1</i> (L2-9), que expresa <i>crtY</i> y <i>OfCCD1</i> fusionada con <i>TrxA</i> .
14	TOf+Y	Cepa productora de β-ionona , cepa 121Y con p15A- <i>amp-crtY-TrxA-OfCCD1</i> (L2-9), que expresa <i>crtY</i> y <i>OfCCD1</i> fusionada con <i>TrxA</i> .
15	crtY	Cepa productora de β-caroteno , cepa 121 con p15A- <i>amp-crtY</i> (L2-9).
16	Ph	Cepa productora de β-ionona , cepa 121 con p15A- <i>amp-crtY-PhCCD1</i> (L2-9), que expresa <i>crtY</i> y <i>PhCCD1</i> .
17	At	Cepa productora de β-ionona , cepa 121 con p15A- <i>amp-crtY-AtCCD1</i> (L2-9), que expresa <i>crtY</i> y <i>PhCCD1</i> .
18	Vv	Cepa productora de β-ionona , cepa 121 con p15A- <i>amp-crtY-VvCCD1</i> (L2-9), que expresa <i>crtY</i> y <i>PhCCD1</i> .
19	Ph+Y	Cepa productora de β-ionona , cepa 121Y con p15A- <i>amp-crtY-PhCCD1</i> (L2-9), que expresa <i>crtY</i> y <i>PhCCD1</i> .
20	TPh	Cepa productora de β-ionona , cepa 121 con p15A- <i>amp-crtY-TrxA-PhCCD1</i> (L2-9), que expresa <i>crtY</i> y <i>PhCCD1</i> fusionada con <i>TrxA</i> .
21	TPh+Y	Cepa productora de β-ionona , cepa 121Y con p15A- <i>amp-crtY-TrxA-PhCCD1</i> (L2-9), que expresa <i>crtY</i> y <i>PhCCD1</i> fusionada con <i>TrxA</i> .
22	Blh1	Cepa productora de retinoides , cepa 121 con p15A- <i>amp-crtY-blh1</i> (L2-9),

		que expresa <i>crtY</i> y <i>blh1</i> .
23	Blh2	Cepa productora de retinoides , cepa 121 con p15A- <i>amp-crtY-blh1</i> (L2-9), que expresa <i>crtY</i> y <i>blh1</i> .
24	Blh1+Y	Cepa productora de retinoides , cepa 121Y con p15A- <i>amp-crtY-blh2</i> (L2-9), que expresa <i>crtY</i> y <i>blh2</i> .
25	Blh2+Y	Cepa productora de retinoides , cepa 121Y con p15A- <i>amp-crtY-blh2</i> (L2-9), que expresa <i>crtY</i> y <i>blh2</i> .

Medios y condiciones de cultivo

5 [0052] Todas las células se cultivaron en medios 2XPY (20 g/l de peptona, 10 g/l de extracto de levadura y 10 g/l de NaCl), suplementados con 10 g/l de glicerol, ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperacina-etanosulfónico (HEPES) 50 mM. Para una incubación prolongada (48 h), también se añadieron 5 mg/l de Tween80 a los medios para evitar la agregación celular. Brevemente, se inocularon 10 µl de cultivo celular fresco en 1 ml de medios frescos en un tubo BD Falcon™ de 14 ml. Inicialmente, las células se cultivaron a 37 °C con una velocidad de agitación de 300 r.p.m. y se indujeron mediante un rango de concentraciones de IPTG (como se indica en el texto) cuando la DO600 alcanzó alrededor de 0,6. Después de la inducción, se añadieron 200 µl de dodecano al cultivo para extraer ionona o retinoides, y las células se incubaron a 28 °C durante otras 20 h o 48 h antes de la recolección. Los medios se suplementaron con antibióticos apropiados (100 mg/l de ampicilina, 34 mg/l de cloranfenicol, 50 mg/l de kanamicina y 50 mg/l de espectinomicina) para mantener los plásmidos correspondientes.

15 Cuantificación de carotenoides y retinoides

20 [0053] Los carotenoides intracelulares se extrajeron de los gránulos celulares según el método de extracción con acetona. Brevemente, se recogieron y centrifugaron 10 - 50 µl de cultivo bacteriano (dependiendo del contenido de carotenoides en las células). Los sedimentos celulares se lavaron con PBS y se resuspendieron en 20 µl de agua, seguido de la adición de 180 µl de acetona. El método de HPLC empleó un sistema LC Agilent 1260 Infinity equipado con una columna ZORBAX, Eclipse Plus C18, 4,6 mm x 250 mm, 5 µm y un detector de matriz de diodos (DAD, por sus siglas en inglés). La condición isocrática (50 % de metanol, 48 % de acetato de etilo y 2 % de agua) se mantuvo a 1,5 ml/min durante 5 min. Los carotenoides se detectaron a una longitud de onda de 450 nm. Las curvas estándar se generaron utilizando estándares comerciales que incluyen ε-caroteno, β-caroteno, licopeno, retinol y retinal. Las muestras de retinoide extracelulares se prepararon diluyendo 20 - 50 µl de capa orgánica en 1000 µl de hexano y se analizaron mediante el mismo sistema de HPLC. La condición isocrática se usó de la siguiente manera. La fase móvil fue 95 % de metanol y 5 % de deacetoneitrilo y el caudal fue de 1,5 ml/min. Los retinoides se detectaron a una longitud de onda de 340 nm.

30 Cuantificación de α, β-ionona y psi-ionona

35 [0054] Las muestras de α o β-ionona se prepararon diluyendo 20-50 µl de capa orgánica en 1000 µl de hexano. Las muestras se analizaron en una cromatografía de gases Agilent 7980B equipada con una columna Agilent VF-WAXms y un tiempo de vuelo (GC/MS) cuadrupolo de masa precisa Agilent 7200. La inyección de muestras se realizó en el modo "splitless" a 240 °C. El programa del horno comenzó a 100 °C durante 2 min, luego la temperatura se elevó a 30 °C/min hasta 240 °C y se mantuvo a 240 °C durante otros 2 min. Las concentraciones de ionona se calcularon interpolando con una curva estándar preparada con estándares comerciales. El espectrómetro de masas se hizo funcionar en modo EI con análisis de barrido completo (m/z 30-300, 1 espectro/s).

40 Análisis de quiralidad

45 [0055] La quiralidad de la α-ionona de las muestras se analizó con cromatografía de gases Agilent 7980B equipada con una columna para GC Agilent Cyclosil-B y un tiempo de vuelo (GC/MS) cuadrupolo de masa precisa Agilent 7200. El programa del horno comenzó a 80 °C durante 2 min, luego se elevó la temperatura a 5 °C/min hasta 210 °C y a 250 °C a 20°C/min y finalmente se mantuvo a 250 °C durante otros 2 min. Las concentraciones de ionona se calcularon interpolando con una curva estándar preparada con estándares comerciales. El espectrómetro de masas se hizo funcionar en modo EI con análisis de barrido completo (m/z 30-300, 2 espectros/s).

50 Fermentación por lotes alimentados

55 [0056] El medio de inicio era un medio modificado químicamente definido que contenía 15 g/l de glucosa, 2 g/l de (NH₄)₂SO₄, 4,2 g/l de KH₂PO₄ y 11,24 g/l de K₂HPO₄, 1,7 g/L de ácido cítrico, 0,5 g/l de MgSO₄ y 10 ml/l de solución de oligoelementos. La solución de oligoelementos (100X) contenía 0,25 g/l de CoCl₂·6H₂O, 1,5 g/l de MnSO₄·4H₂O, 0,15 g/l de CuSO₄·2H₂O, 0,3 g/l de H₃BO₃, 0,25 g/l de Na₂MoO₄·2H₂O, 0,8 g/l de Zn(CH₃COO)₂, 5 g/l de citrato de Fe(III) y 0,84 g/l de EDTA, pH 8,0. Se bombeó medio de alimentación (500 g/l de glucosa y 5 g/l de MgSO₄) al mini biorreactor de 250 ml (Applikon Biotechnology) a una velocidad inicial de 0,6 ml/h y se

aumentó de manera aproximadamente exponencial a 1,8 ml/h en 12 h. Se mantuvo a 1,5 ml/h durante otras 24 h. Las células fueron inducidas por IPTG 0,03 mM cuando la DO alcanzó aproximadamente 40. Después de la inducción, se añadieron 30 ml de miristato de isopropilo al biorreactor para extraer iononas.

5 EJEMPLOS

Producción de carotenos mediante "plug-n-play"

Ejemplo 1. Optimización de la producción de fitoeno

10 [0057] La plataforma "plug-n-play", como se describe en este documento, produce carotenos y apocarotenoides a partir de materias primas económicas (figura 1). Es un gran desafío mantener un flujo metabólico alto a lo largo de una vía recombinante que sobreexpresa simultáneamente 13 enzimas en células de *E. coli* para producir carotenos (figura 2). La ultravioleta B (UVB, 280-310 nm) es el daño más severo en la piel inducido por la luz solar. El caroteno incoloro, el fitoeno, tiene la máxima absorbancia de rayos UV a 280 nm (figura 3), lo que lo convierte en un ingrediente ideal para el agente de protección UV tópico. El fitoeno es el primer intermediario clave que se puede convertir, además, en varios carotenoides C40. Para producir fitoeno, la vía biosintética de la acetil-CoA se dividió en tres módulos de expresión (figura 2, módulo 1, vía ascendente del mevalonato que incluye *hmgS-atoB-hmgR*; módulo 2, vía descendente del mevalonato que incluye *mevK, pmk, pmd e idi*; módulo 3, vía biosintética del fitoeno que incluye *crtEB* e *ispA*), y se optimizó sistemáticamente mediante el método EDASPO. Brevemente, los 3 módulos de expresión fueron controlados por tres variantes diferentes del promotor T7 con diferente fuerza, y luego el rendimiento del fitoeno se correlacionó con la fuerza del promotor de cada módulo para ubicar el rango transcripcional óptimo para cada módulo de expresión (diagrama ternario, figura 4). Como resultado, se identificó el rango óptimo para cada módulo de expresión y se obtuvo una cepa optimizada (cepa 221), que produjo ~45 mg/l de fitoeno en un matraz de agitación, o 38.000 ppm (figura 4).

Ejemplo 2. Optimización de la producción de licopeno

30 [0058] El licopeno es otro carotenoide valioso que tiene un potente efecto antioxidante. La vía biosintética es extremadamente larga y difícil de optimizar en la cepa de la producción microbiana heteróloga. Aquí, la vía se dividió en tres módulos diferentes (figura 2, módulo 1, vía ascendente del mevalonato que incluye *hmgS-atoB-hmgR*; módulo 2, vía descendente del mevalonato que incluye *mevK, pmk, pmd e idi*; módulo 3, vía biosintética del licopeno que incluye *crtEBI* e *ispA*), y sobreproducción de licopeno mediante el método EDASPO. Brevemente, los 3 módulos de expresión fueron controlados por tres variantes diferentes del promotor T7 con diferente fuerza, y luego el rendimiento del licopeno se correlacionó con la fuerza del promotor de cada módulo de expresión para ubicar el rango transcripcional óptimo para cada módulo de expresión (diagrama ternario, figura 5). Como resultado, se identificó el rango óptimo para cada módulo de expresión y una cepa optimizada (cepa 121), que produjo ~107 mg/l de licopeno en un matraz de agitación, o 26.000 ppm (figura 5). Esta cepa productora de licopeno sirvió como cepa de plataforma parental para la producción adicional de carotenoides y apocarotenoides posteriores.

Ejemplo 3. Optimización de la producción de caroteno

45 [0059] Se puede introducir un cuarto módulo de expresión biosintético basado en la cepa parental sobreproductora de licopeno (figura 2). Dependiendo de los niveles de expresión de *crtY* y *LCYe*, se pueden producir α , β , δ , γ y ϵ -caroteno (figura 2). Sin embargo, se sabe que el ϵ -caroteno se acumula en niveles muy bajos en la naturaleza. Hasta la fecha, solo se sabe que la *LCYe* de *Lactuca sativa* (*LsLcYe*) forma preferentemente el anillo ϵ bicíclico a partir del licopeno. Cuando se sobreexpresó la enzima *LsLcYe* de tipo salvaje en la cepa de licopeno (cepa 121), se produjo una mezcla de δ -caroteno (caroteno con un anillo ϵ en un extremo) y ϵ -caroteno (caroteno con dos anillos ϵ en ambos extremos), con más del 70 % de licopeno sin ciclar (0,1 mM, figura 6). La producción de ϵ -caroteno se optimizó inicialmente ajustando los niveles de transcripción y se obtuvo la mayor cantidad de ϵ -caroteno con una inducción moderada de IPTG (0,03 mM). Sin embargo, el título más alto de ϵ -caroteno fue simplemente de 18 mg/l (2500 ppm), lo que corresponde a menos del 30 % del total de carotenoides (figura 6), lo que sugiere que la actividad de la enzima *LsLcYe* era insuficiente.

55 [0060] La predicción estructural de Phobius mostró una probable región de interacción con la membrana (aminoácidos 104^o-128^o) en la enzima *LsLcYe* y una región de péptido señal débil (aminoácidos 1^o-30^o). Anteriormente se había informado de que las modificaciones de los residuos N-terminales implicados en las interacciones de membrana y las regiones codificantes de péptidos señal mejoran la solubilidad y la actividad de la proteína recombinante. Por lo tanto, se examinó el truncamiento de las secuencias de extremo N-terminal involucradas en el anclaje a la membrana para determinar si aumentaría la eficiencia catalítica de *LsLcYe*. Se construyó una serie de *LsLcYe* truncadas en el extremo N-terminal retirando sistemáticamente 50 residuos a la vez utilizando el método de ensamblaje *in vitro* de superposición cruzada truncada. El nivel de expresión enzimático aumentó ~40 % cuando se eliminaron los primeros 50 aminoácidos (figuras 7A y B), con un aumento concomitante de más del doble en la producción de ϵ -caroteno (> 40 mg/l, 5500 ppm y 80 % de productos finales) (figura 6, cepa 121+L50). Sorprendentemente, la eliminación de los primeros 100 residuos (figura 6, cepa

121+L100) condujo a un aumento en la concentración de proteína en ~140 % (figuras 7A y B). Sin embargo, la actividad ciclasa se perdió por completo. Para comprender mejor cómo el truncamiento afectó a la expresión de LsLCYe, se compararon el nivel de transcripción y la estructura secundaria de ARNm de LsLCYe truncada y su forma nativa. Los resultados indicaron que el aumento de las expresiones de LsLCYe truncada no parecía deberse a aumentos significativos en las expresiones de ARNm (figura 7C) ni a modificaciones en las estructuras secundarias de ARNm.

[0061] Para demostrar la utilidad más amplia de este método modular, se produjeron otros apocarotenoides reemplazando la enzima LCYe con la expresión de licopeno beta-ciclasa (o *crtY*) de *Pantoea ananatis*. A diferencia de LsLCYe, la licopeno beta-ciclasa nativa fue altamente activa y convirtió más del 70 % del licopeno en β -caroteno (65 mg/l), con una cantidad residual de licopeno (24 mg/l) (cepa *crtY* en la figura 15).

Producción de apocarotenoides mediante "plug-n-play"

Ejemplo 4. Optimización de la producción de α -ionona

[0062] Mediante un método modular, se pueden añadir oxigenasa(s) de escisión de carotenoides al cuarto módulo de expresión para producir varios apocarotenoides (figura 8). LsLCYe con 50 aminoácidos en el extremo N-terminal truncados (Δ N50-LsLCYe) se exploró más a fondo para la producción de α -ionona. Se ha demostrado previamente que CCD1 de *Osmanthus fragrans* (OfCCD1) puede escindir el caroteno en la posición C9-C10 para producir tanto α -ionona como β -ionona. Por lo tanto, la enzima OfCCD1 se sobreexpresó en cepas de ϵ -caroteno (121-LL e 121-L50 en la figura 6). Sin embargo, incluso con una mayor disponibilidad de ϵ -caroteno en la cepa 121-L50-O, la cantidad de α -ionona detectada fue inferior a 500 μ g/l (figura 9A, inserto). Como se indicó previamente, el licopeno y el ϵ -caroteno fueron los productos intermedios principales acumulados en las cepas sobreexpresadas de LsLCYe y Δ N50-LsLCYe, respectivamente (figura 9B). El análisis de SDS-PAGE mostró que apenas se observó proteína OfCCD1 24 h después de la inducción (figura 7A y D), a pesar de que el ARNm se detectó bien (figura 7E). Los resultados indicaron que la expresión de OfCCD1 puede estar limitada por una traducción insuficiente, lo que coincide con estudios previos sobre otra sobreexpresión de CCD1.

[0063] Los estudios sugirieron que la fusión con glutatión S-transferasa (GST) aumentaría significativamente la expresión y la solubilidad de CCD1 en *E. coli*. Por lo tanto, se examinaron los socios de fusión para detectar mejoras en la expresión funcional de OfCCD1. Se probaron tres socios de fusión N-terminales de uso común: la pequeña proteína modificadora similar a la ubiquitina (SUMO, por sus siglas en inglés), la proteína de unión a maltosa (MBP, por sus siglas en inglés) y la tiorredoxina (TrxA). OfCCD1, cuando se fusionó con los tres socios de fusión, aumentó significativamente los títulos de α -ionona (figura 9A). Entre ellos, la cepa con OfCCD1 fusionada con TrxA (o ToFCCD1) fue capaz de producir 29,7 mg/l de α -ionona con baja inducción (IPTG 0,03 mM), lo que supone una mejora de más de 50 veces (figura 9A). Para estudiar el mecanismo subyacente de los socios de fusión, se investigó más a fondo la expresión de la proteína mediante gel desnaturante de SDS-PAGE. Sin socio de fusión, OfCCD1 apenas era detectable (figuras 7A y D). En contraste, las enzimas OfCCD1 fusionadas con SUMO, MBP y TrxA se expresaron bien. Las intensidades relativas de las bandas de proteínas de OfCCD1 fusionada con SUMO, MBP y TrxA estaban bien correlacionadas con su correspondiente producción de α -ionona en la figura 9A. Por ejemplo, la cepa que expresa ToFCCD1 tuvo la mejor expresión y produjo la mayor cantidad de α -ionona. Se investigaron más a fondo los efectos de los socios de fusión sobre la solubilidad de OfCCD1. Todas las CCD1 fusionadas tienen fracciones solubles claras (figura 10); sin embargo, no hubo una correlación clara entre la producción de α -ionona y la solubilidad de OfCCD1 fusionada con SUMO, MBP y TrxA. Como la transcripción y la estructura secundaria del ARNm permanecieron relativamente similares, es probable que el aumento de la expresión de OfCCD1 se deba a una mejora en la eficiencia de la traducción o el aumento en la estabilidad de la proteína. De manera interesante, incluso con la cepa productora de ionona más alta (figura 9, cepa 121-L50-TrxA-O con IPTG 0,03 mM), tanto el ϵ -caroteno como el licopeno (~30 mg/l de carotenoides totales) todavía se acumulan a niveles similares a los de la α -ionona (figura 9B), lo que sugiere que el rendimiento de α -ionona podría mejorarse aun más. Por lo tanto, se logró una mejora progresiva en la producción de α -ionona de 500 μ g/l a 29 mg/l.

[0064] Para mejorar aun más el rendimiento de α -ionona, se utilizó modelado de homología para predecir la estructura 3D de OfCCD1 (figura 11). Hay dos hélices de interacción de membrana basadas en el modelo OfCCD1. La primera hélice se encuentra en el extremo N-terminal de la proteína, y la segunda hélice se encuentra dentro de la secuencia (F148-I167). El alineamiento de la secuencia indicó que las principales discrepancias ocurrieron en leucina-151, metionina-152, asparagina-154 e isoleucina-167 (figura 18). Al mutar simultáneamente leucina-151 a fenilalanina, metionina-152 a treonina y asparagina-154 a tirosina, el título de α -ionona mejoró aun más a ~35 mg/l (figura 12A). El análisis de la expresión de proteínas mostró que estas mutaciones han mejorado aun más la expresión de OfCCD1 fusionada con *trxA* (figuras 12 C y D). Los resultados resaltaron que la ingeniería de la enzima CCD es fundamental para mejorar la producción de ionona.

[0065] A continuación, se probó el rendimiento en la fermentación por lotes alimentados usando la mejor cepa productora de α -ionona (cepa 121-L50-TrxA-O). Como la α -ionona es volátil, se utilizó miristato de isopropilo para atrapar el compuesto durante la fermentación. Como se muestra en la figura 13, se produjeron aproximadamente

480 mg/l de α -ionona en 48 h. En resumen, se logró un aumento de -1000 veces en la producción de α -ionona desde los 500 μ g/l iniciales hasta los 480 mg/l. Por lo tanto, el título de α -ionona logrado en este estudio es aproximadamente 1428 veces mayor que el mencionado previamente.

5 [0066] Además, la α -ionona producida se sometió a una verificación de quiralidad y se descubrió que era 100 % de enantiómero R de α -ionona (figura 14), idéntica a la α -ionona natural. Por el contrario, la ionona sintetizada químicamente es una mezcla de 50 % de enantiómero R y 50 % de enantiómero S. De manera más importante, los diferentes enantiómeros de ionona tienen diferentes olores y diferentes actividades potenciales. El resultado
10 mostró claramente la ventaja de la biosíntesis a través de la plataforma "plug-n-play" sobre síntesis química.

Ejemplo 5. Optimización de la producción de β -ionona

[0067] Para demostrar la utilidad más amplia de este método modular, se produjeron otros apocarotenoides coexpresando la dioxigenasa de escisión de carotenoides con licopeno beta-ciclasa (o *crtY*) de *Pantoea ananatis*. La producción de β -ionona con la cepa que expresa *OfCCD1* de tipo salvaje (cepa Of) fue de 140 μ g/l, que corresponde a apenas menos del 1 % de rendimiento de conversión a partir de β -caroteno (figura 15). Como la *OfCCD1* fusionada con TrxA N-terminal (*TOfCCD1*) mejoró la α -ionona (figura 9), se probó la posibilidad de que pueda mejorar de manera similar la producción de β -ionona. Lamentablemente, la expresión de *TOfCCD1* no dio como resultado un aumento significativo en la producción de β -ionona (figura 15A). En cambio, se detectó otro pico importante a los 9,46 min en el cromatograma de GC (figuras 16 y 17). Se predijo que este pico sería psi-ionona con la biblioteca de espectro de masas del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (*National Institute of Standards and Technology*, NIST) y se validó aun más con un estándar auténtico de psi-ionona. La expresión de *TOfCCD1* dio como resultado un aumento de 37 veces en la producción de psi-ionona de ~0,4 a ~14,6 mg/l. Cabe destacar que la cepa de producción de α -ionona también produjo psi-ionona, aunque era un producto menor (figuras 9A y 12A). Por lo tanto, parecía que el licopeno también fue escindido por *TOfCCD1* y produjo iononas (figura 8), lo que coincide con la observación de que ciertos tipos de *CCD1* podrían convertir el licopeno en psi-ionona o 6-metil-5-hepten-2-ona (MHO). Además, se observó que no se acumulaba β -caroteno sino una gran cantidad de licopeno en la cepa que expresa *TOfCCD1* (cepa *TOf*, figura 15B). Una posible razón podría ser que el licopeno fue convertido preferentemente por *TOfCCD1* en vez de ciclizado por la licopeno beta-ciclasa en fase exponencial.

[0068] Como se produjo una gran cantidad de licopeno y psi-ionona derivada de licopeno en la cepa *TOf*, se planteó la hipótesis de que aumentar la dosis génica de *crtY* (cepa *TOf+Y*) puede tener dos beneficios potenciales. En primer lugar, puede aumentar los flujos de carbono del licopeno al β -caroteno y, por lo tanto, aumentar la producción de β -ionona. En segundo lugar, la producción de psi-ionona puede verse reducida por la disminución de la disponibilidad de licopeno intracelular. Para probar la hipótesis, primero se insertó *crtY* en el primer módulo de expresión de nuestro sistema, *atoB-hmgS-hmgR*, lo que dio como resultado un nuevo operón, *crtY-atoB-hmgS-hmgR* (ilustrado en la figura 15). Como los plásmidos usados en el estudio tienen aproximadamente 10 copias por célula, la inserción aumentó el número de copias de *crtY* de 10 a 20 copias por célula. Curiosamente, la dosificación genética de *crtY* dio como resultado eficazmente una mayor conversión de licopeno en β -caroteno, por lo tanto, de una cantidad indetectable de β -caroteno (*TOf*, figura 15) a un rendimiento significativo de 42,4 mg/l (cepa *TOf+Y*, figura 15). En consecuencia, el título de β -ionona aumentó significativamente de 0,3 a 20,9 mg/l, y el de psi-ionona disminuyó de 14,6 a 4,4 mg/l (figura 15), lo que indica un mayor flujo de carbono desviado hacia la producción de β -ionona a través de β -caroteno.

[0069] Aunque la suplementación con *crtY* mejoró notablemente la producción de β -ionona, todavía se produjeron 4,4 mg/l de psi-ionona. Para maximizar la producción de β -ionona y minimizar la formación de subproductos/productos intermedios, se cribó *CCD* con mayor selectividad por β -caroteno. Se probaron otras tres enzimas *CCD1*, de *Arabidopsis thaliana* (*AtCCD1*), *Vitis vinifera* (*VvCCD1*) y *Petunia hybrid* (*PhCCD1*) (figura 18). Todas las enzimas *CCD1* usadas en este estudio se muestran en la tabla 4. Con la expresión de *AtCCD1*, *VvCCD1* y *PhCCD1* de tipo salvaje, se produjo β -ionona en 0,1, 13,0 y 27,0 mg/l, respectivamente, acompañada de 0,2, 14,8 y 4,8 mg/l de psi-ionona, respectivamente (figura 19A). Los datos sugirieron que *VvCCD1* y *PhCCD1* de tipo salvaje tenían mayores actividades en *E. coli* que *AtCCD1* y *OfCCD1*. Además, *PhCCD1* también tuvo una mayor selectividad por el β -caroteno que *VvCCD1* y *TOfCCD1*. Sin embargo, todavía había 13,3 mg/L de β -caroteno y 13,8 mg/l de licopeno acumulados en la cepa que expresa *PhCCD1* (figura 19B). A continuación, se investigó la fusión de TrxA con *PhCCD1* y la suplementación con una copia adicional de *crtY*. Con la suplementación adicional de *crtY* (cepa *Ph+Y*), el título de β -ionona aumentó de 27 a 32,4 mg/l y el título de psi-ionona disminuyó de 4,8 a 1,6 mg/l. Al mismo tiempo, la producción de β -caroteno aumentó de 13,3 (cepa *Ph*) a 24,3 (cepa *Ph+Y*) mg/l y la producción de licopeno disminuyó de 13,8 a 1,5 mg/l. Sin embargo, la fusión de TrxA (cepa *TPh*) simplemente dio como resultado un aumento moderado en la producción de β -ionona de 27 a 30,4 mg/l y una ligera disminución en la producción de psi-ionona de 4,8 a 3,2 mg/l. Además, no hubo ningún beneficio sinérgico con la combinación de suplementación con *crtY* y fusión con TrxA (cepa *TPh+Y*, figura 19). En conjunto, los resultados sugirieron que, a diferencia de *OfCCD1*, la actividad nativa de *PhCCD1* fue suficientemente eficiente para convertir β -caroteno en β -ionona. En resumen, se mejoró la producción de β -ionona 140 μ g/l iniciales a 32,4 mg/l, un aumento de aproximadamente 230 veces en tubos y matraces durante un periodo de 24 h. Además, en la fermentación por lotes alimentados, se produjeron -500 mg/l de β -ionona con

la cepa Ph+Y (figura 19C), que fue un aumento de aproximadamente 3700 veces con respecto al de la cepa inicial.

La tabla 4 resume las enzimas CCD1 en este estudio.

Entrada	Enzimas	Organismos
O65572	AtCCD1	<i>Arabidopsis thaliana</i> (berro de oreja de ratón)
U3M7F6	VvCCD1	<i>Vitis vinifera</i> (uva)
D4QE74	OfCCD1	<i>Osmanthus fragrans</i>
Q6E4P3	PhCCD1	<i>Petunia hybrida</i> (petunia)

5

[0070] La fase orgánica del biorreactor era de color amarillo. Para identificar el/los compuesto(s) amarillo(s), se llevó a cabo una cromatografía líquida de ultra rendimiento junto con un análisis de espectrometría de masas de tiempo de vuelo. Se identificaron algunos dialdehídos (C17 y C19) y alcoholes (figura 20). Estos son los subproductos debido a la escisión no específica de PhCCD1. Para solucionar el problema, se llevó a cabo un cribado de una CCD más específica. Dado que CCD4 ha demostrado una mejora notable en la especificidad del sustrato y del producto, hemos cribado varias enzimas CCD4 enumeradas en la tabla 5, y hemos descubierto que PpCCD4 es más activa contra el β -caroteno y CmCCD4 es más activa contra el ϵ -caroteno (figura 21).

10

La tabla 5 resume las enzimas CCD2 y CCD4 en este estudio.

Enzimas CCD	Organismos
CaCCD2	<i>Crocus angustifolius</i>
CsCCD2	<i>Crocus sativus</i>
AtCCD4	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BoCCD4b	<i>Bixa orellana</i>
CmCCD4	<i>Chrysanthemum morifolium</i>
CsCCD4a	<i>Crocus sativus</i>
MaCCD4	<i>Musa acuminata grupo AAA</i>
MdCCD4	<i>Malus domestica</i>
OfCCD4	<i>Osmantus fragrans</i>
PpCCD4	<i>Prunus persica</i>
RdCCD4	<i>Rosa damascena V</i>
vCCD4a	<i>Vitis vinifera</i>

15

Ejemplo 6. Optimización de la producción de retinoides

[0071] Los retinoides se biosintetizan escindiendo β -caroteno en la posición C15-C15'. Para ilustrar mejor la utilidad del sistema "plug-n-play" para producir otros apocarotenoides, el gen CCD1 se reemplazó por dos genes *blh* (enzima BCDO, figura 8), de la *bacteria marina no cultivada HF 10_19P19 (blh1)* y de la *bacteria marina no cultivada 66A03 (blh2)*. Sin ninguna optimización de la vía ascendente, el sistema "plug-n-play" produjo 18,5 mg/l de retinol y 5,1 mg/l de retinal en la cepa *blh1* y 3,0 mg/l de retinol y 1,1 mg/l de retinal en la cepa *blh2* (figura 22A). En la cepa *blh1*, se acumuló licopeno (28,2 mg/l), pero no se detectó β -caroteno (figura 22B). Por lo tanto, se planteó la hipótesis de que la producción de retinoide estaba limitada por licopeno beta-ciclasa en lugar de por BCDO en la cepa *blh1*. Como se esperaba, la coexpresión del gen *crtY (blh1+Y)* aumentó la producción de retinoides (de 23,6 a 33,2 mg/l). En cuanto a la cepa *blh2*, la producción de retinoides probablemente estuvo limitada por la actividad de BCDO en vez de licopeno beta-ciclasa, ya que el aumento en la dosis del gen *crtY* no logró mejorar la producción de retinoides a pesar de que > 90 % del licopeno se convirtió en β -caroteno (figura 22). Cabe mencionar que, en las cepas productoras de retinoides, el gen *ybbO*, predicho como oxidoreductasa en *E. coli* y validado experimentalmente con alta actividad de deshidrogenasa de retinol (el ID de acceso de Genbank es ECD_00444, figura 8), no se sobreexpresó, pero más del 80 % del retinal se convirtió en retinol. Si bien se desconocía el mecanismo subyacente, podría deberse a la expresión intracelular relativamente alta de la enzima *ybbO* u otras proteínas endógenas desconocidas con actividad retinol deshidrogenasa. Los resultados de retinoides e iononas sugirieron que este sistema "plug-n-play" es versátil y será útil para la producción de muchos apocarotenoides que comparten una vía ascendente (figura 22C).

35

Explicación

[0072] La ingeniería metabólica modular se ha aplicado con éxito para mejorar racionalmente la producción de moléculas pequeñas por parte de las fábricas de células microbianas. Es un método potente para reducir el

40

espacio de optimización de parámetros y permitir la optimización secuencial de subconjuntos de módulos de expresión antes de unirse con la vía completa. Generalmente, a medida que aumenta el número de módulos de expresión, la precisión de la optimización de la vía mejorará, pero la combinación completa también aumentará exponencialmente. Por lo tanto, se debe decidir un número de módulo de expresión equilibrado. Como se describe en este caso, la vía multigénica que contiene 13 genes se dividió en 4 módulos de expresión diferentes: vía ascendente del mevalonato (módulo de expresión 1), vía descendente del mevalonato (módulo de expresión 2), vía biosintética del licopeno (módulo de expresión 3) y vía biosintética de apocarotenoides (módulo de expresión 4). Al optimizar los tres primeros módulos de expresión metabólica con el método EDASPO, se obtuvo una cepa parental estable que acumuló un alto contenido de licopeno (cepa 121 en la figura 6). Posteriormente, se introdujo el cuarto módulo de expresión que transportaba licopeno ciclasa y CCD para producir varios apocarotenoides. Tener el módulo de expresión de apocarotenoides independiente del resto de módulos de expresión ofrece tres ventajas principales sobre los métodos no modulares. En primer lugar, minimiza los posibles efectos negativos sobre el sistema ascendente (la vía del mevalonato y vía biosintética del licopeno). En segundo lugar, simplifica significativamente la carga de trabajo de modificaciones de cepas. A medida que el sistema ascendente se optimizó y siguió siendo eficiente, los esfuerzos de ingeniería podrían centrarse en el módulo de expresión de biosíntesis de apocarotenoides descendente. Finalmente, convierte al sistema en un chasis "plug-n-play" para la producción de apocarotenoides valiosos. Como tal, "bloquear" ("plugging") la licopeno ciclasa (*LCYe* o *crtY*) y CCD1 produce α o β -ionona y "bloquear" *crtY* y *blh* produce retinol. De manera más importante, se obtuvieron títulos similares de apocarotenoides en matraces (figuras 9, 15, 19 y 22), lo que indica la solidez de este sistema modular.

[0073] En conjunto, estos resultados demuestran que modular la expresión de proteínas clave es esencial para la biosíntesis heteróloga de apocarotenoides en *E. coli*. En términos generales, esto resalta los beneficios de combinar la ingeniería de proteínas y el diseño de vías modulares para la sobreproducción de sustancias químicas valiosas.

[0074] Los recientes cambios en la regulación del etiquetado de ingredientes naturales han dado como resultado el aumento en la demanda de sabores y fragancias naturales. En consecuencia, existe un interés creciente en modificar microbios para producir los ingredientes a partir de recursos renovables. Sin embargo, las complejas características metabólicas de la vía de los apocarotenoides han obstaculizado el desarrollo de procesos microbianos altamente eficientes. Ventajosamente, la presente divulgación proporciona estrategias de ingeniería metabólica modular y de ingeniería enzimática que se aplicaron sistemáticamente para minimizar eficazmente la carga metabólica impuesta por la sobreexpresión de 13 enzimas para superar el desafío de enzimas críticas de baja actividad. Esta estrategia ha permitido el desarrollo de una cepa robusta de *E. coli* capaz de producir rendimientos sin precedentes de α -ionona y β -ionona, lo que demuestra el gran potencial del uso de microbios en la producción de sabores y fragancias naturales.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método para producir un apocarotenoide que comprende el paso de expresar en una célula de *Escherichia coli* (*E. coli*) un módulo de expresión que comprende un vector de expresión que tiene una región codificante que codifica enzimas generadoras de apocarotenoides optimizadas, donde la región codificante está unida operativamente a un promotor,
- 10 donde el apocarotenoide es α -ionona,
donde dichas enzimas generadoras de apocarotenoides optimizadas son *LcyE* y *CCD1* que forman un operón que tiene la estructura: *LcyE-CCD1*,
donde dicha *LcyE* es *LcyE* de *Lactuca sativa* (LsLcyE) y está truncada en el extremo N-terminal; y
donde la *LcyE* comprende un truncamiento N-terminal de 50 aminoácidos (Δ N50-LsLcyE).
- 15 2. Método según la reivindicación 1, donde dicha CCD1 se expresa como:
- i) una proteína de fusión seleccionada de entre *TrxA-CCD1*, *SUMO-CCD1* o *MBP-CCD1*;
ii) una proteína de fusión *TrxA-CCD1* seleccionada de entre *TrxA-CCD1* de *Osmanthus fragrans* o *TrxA-CCD1* de *Petunia hybrid*; o
20 iii) una proteína de fusión *TrxA-CCD1* de *Osmanthus fragrans*, donde la CCD1 es *Osmanthus fragrans* (OfCCD1) y comprende una o varias de las siguientes mutaciones: N154Y, M152T, L151F.
3. Método según la reivindicación 1 o 2, que comprende analizar un nivel de expresión de α -ionona en una cantidad de 10-1000 mg/l en un periodo de 24 horas.
- 25 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende, además, expresar en dicha célula de *E. coli*: un primer módulo de expresión que comprende un vector de expresión que tiene una primera región codificante que codifica uno o más primeros productos génicos optimizados seleccionados de entre *atoB*, *hmgS* y *thmgR*, donde la primera región codificante está unida operativamente a un promotor; un segundo módulo de expresión que comprende un vector de expresión que tiene una segunda región codificante que codifica uno o más segundos productos génicos optimizados seleccionados de entre *mevK*, *pmk*, *pmd* o *idi*, donde la segunda región codificante está unida operativamente a un promotor; un tercer módulo de expresión que comprende un vector de expresión que tiene una tercera región codificante que codifica uno o más terceros productos génicos optimizados seleccionados de entre *ispA*, *crtE*, *crtB* o *crtl*, donde la tercera región codificante está unida operativamente a un promotor.
- 30 5. Método según la reivindicación 4, donde dicho uno o más primeros productos génicos forman un operón que tiene la estructura: *atoB-hmgS-thmgR*; o donde dicho uno o más segundos productos génicos forman un operón que tiene la estructura: *mevK-pmk-pmd-idi*; y donde dicho uno o más terceros productos génicos forman un operón que tiene la estructura: *crtE-crtB-crtl-ispA*.
- 35 6. Método según las reivindicaciones 4 o 5, donde la célula de *E. coli* se selecciona de entre BL21 DE3 o MG1655 DE3, y donde el promotor se selecciona de entre uno o más promotores de ARN polimerasa o un promotor inducible.
- 40 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la optimización del apocarotenoide que genera enzimas y productos génicos optimizados se logra mediante optimización de codones o mutagénesis dirigida al sitio.
- 45 8. Célula de *E. coli* que comprende un módulo de expresión que comprende un vector de expresión que tiene una región codificante que codifica enzimas generadoras de apocarotenoides optimizadas, donde la región codificante está unida operativamente a un promotor, donde los productos génicos optimizados son Δ N50-LsLcyE y *TrxA-CCD1* de *Osmanthus fragrans*.
- 50 9. Célula de *E. coli* según la reivindicación 8, donde la CCD1 de *Osmanthus fragrans* comprende una o más de las siguientes mutaciones: N154Y, M152T, L151F; y donde la célula de *E. coli* se selecciona de entre BL21 DE3 o MG1655 DE3.
- 55 10. Célula de *E. coli* según la reivindicación 8 o 9, que comprende, además:
- 60 un primer módulo de expresión que comprende un vector de expresión que tiene una primera región codificante que codifica uno o más primeros productos génicos optimizados seleccionados de entre *atoB*, *hmgS* y *thmgR*, donde la primera región codificante está unida operativamente a un promotor;
un segundo módulo de expresión que comprende un vector de expresión que tiene una segunda región codificante que codifica uno o más segundos productos génicos optimizados seleccionados de entre *mevK*,
65 *pmk*, *pmd* o *idi*, donde la segunda región codificante está unida operativamente a un promotor;

un tercer módulo de expresión que comprende un vector de expresión que tiene una tercera región codificante que codifica uno o más terceros productos génicos optimizados seleccionados de entre *ispA*, *crtE*, *crtB* o *crtI*, donde la tercera región codificante está unida operativamente a un promotor.

5 11. Sistema para producir un apocarotenoide que comprende un módulo de expresión que comprende un vector de expresión que tiene una región codificante que codifica enzimas generadoras de apocarotenoides optimizadas, donde la región codificante está unida operativamente a un promotor, donde dichas enzimas generadoras de apocarotenoides optimizadas son $\Delta N50$ -*LsLcyE* y *TrxA-CCD1* de *Osmanthus fragrans* para la producción de α -ionona.

10

12. Sistema según la reivindicación 11, que comprende, además:

un primer módulo de expresión que comprende un vector de expresión que tiene una primera región codificante que codifica uno o más primeros productos génicos optimizados seleccionados de entre *atoB*, *hmgS* y *thmgR*, donde la primera región codificante está unida operativamente a un promotor;

15

un segundo módulo de expresión que comprende un vector de expresión que tiene una segunda región codificante que codifica uno o más segundos productos génicos optimizados seleccionados de entre *mevK*, *pmk*, *pmd* o *idi*, donde la segunda región codificante está unida operativamente a un promotor;

20

un tercer módulo de expresión que comprende un vector de expresión que tiene una tercera región codificante que codifica uno o más terceros productos génicos optimizados seleccionados de entre *ispA*, *crtE*, *crtB* o *crtI*, donde la tercera región codificante está unida operativamente a un promotor.

25

13. Kit, cuando se usa en el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para la producción de un apocarotenoide, que comprende:

25

un primer vector que codifica uno o más primeros productos génicos optimizados seleccionados de entre *atoB*, *hmgS* y *thmgR* unidos operativamente a un promotor;

un segundo vector que codifica uno o más segundos productos génicos optimizados seleccionados de entre *mevK*, *pmk*, *pmd* o *idi* unidos operativamente a un promotor;

30

un tercer vector que codifica uno o más terceros productos génicos optimizados seleccionados de entre *ispA*, *crtE*, *crtB* o *crtI* unidos operativamente a un promotor; y

un cuarto vector que codifica productos génicos optimizados $\Delta N50$ -*LsLcyE* y *TrxA-CCD1* de *Osmanthus fragrans* unidos operativamente a un promotor para la producción de α -ionona.

FIG. 1

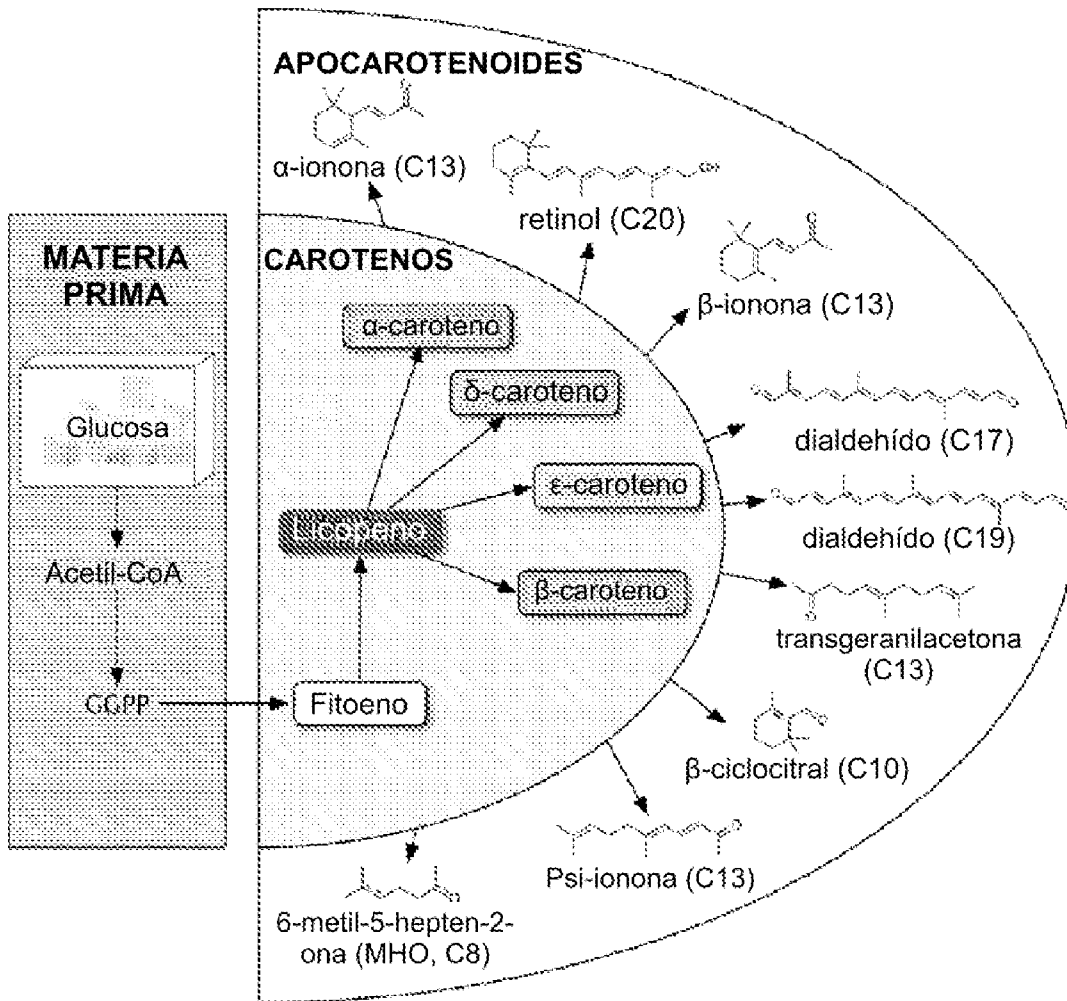


FIG. 2

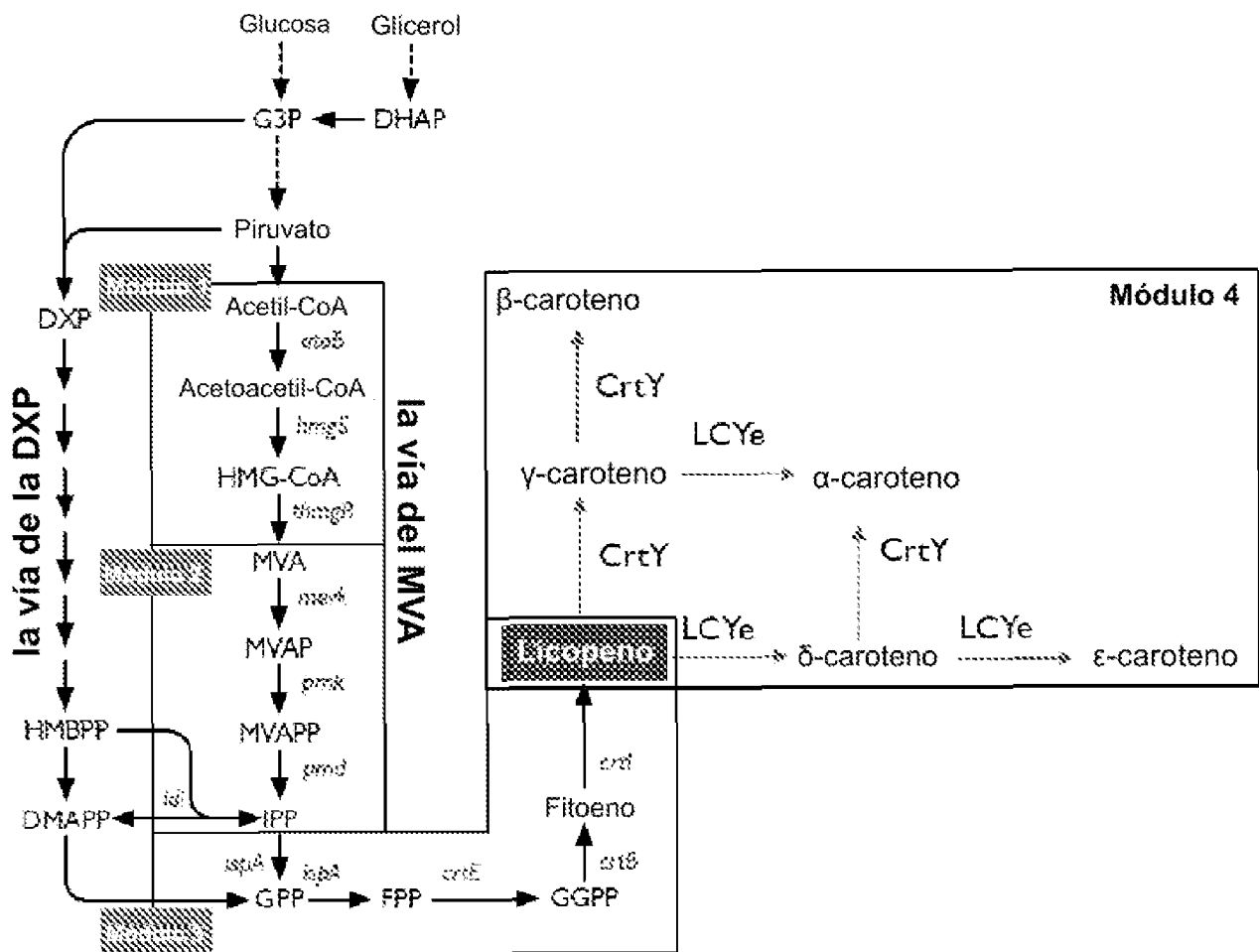


FIG. 3

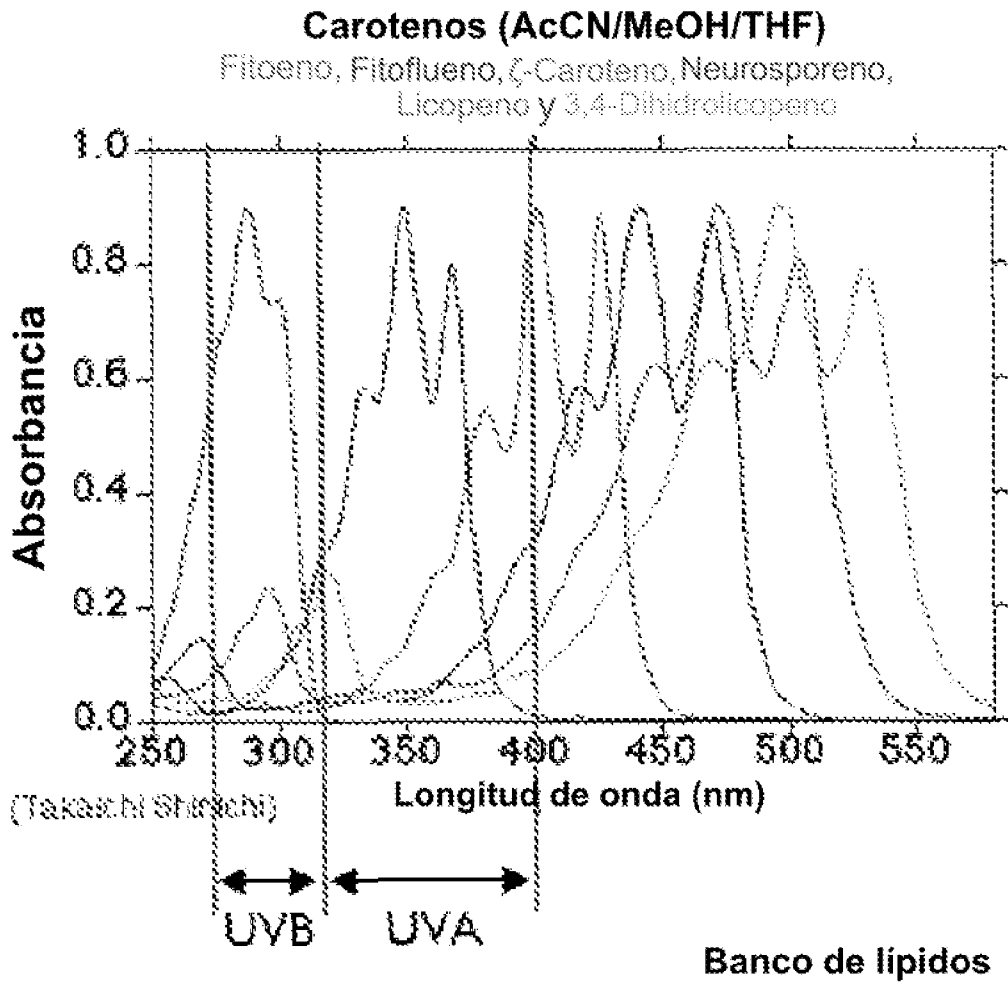


FIG. 4

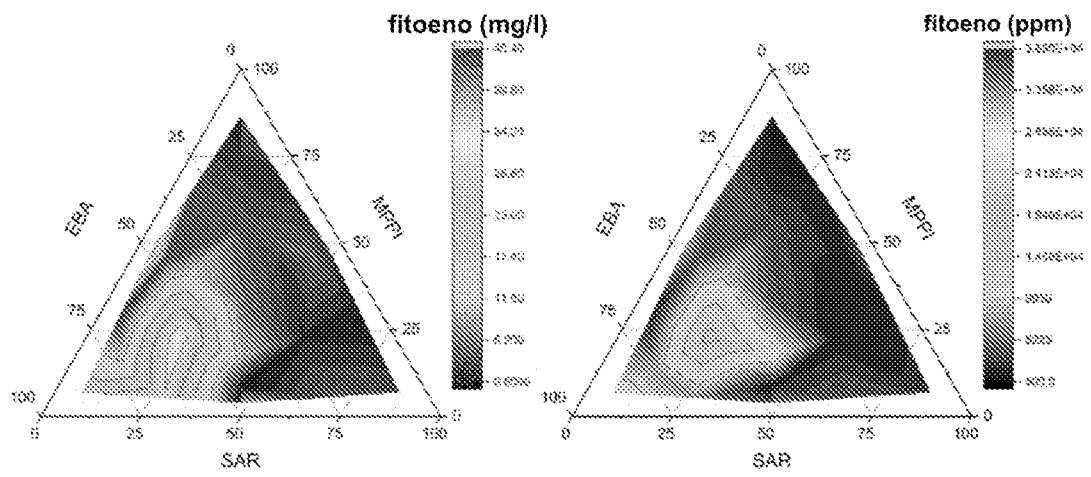


FIG. 5

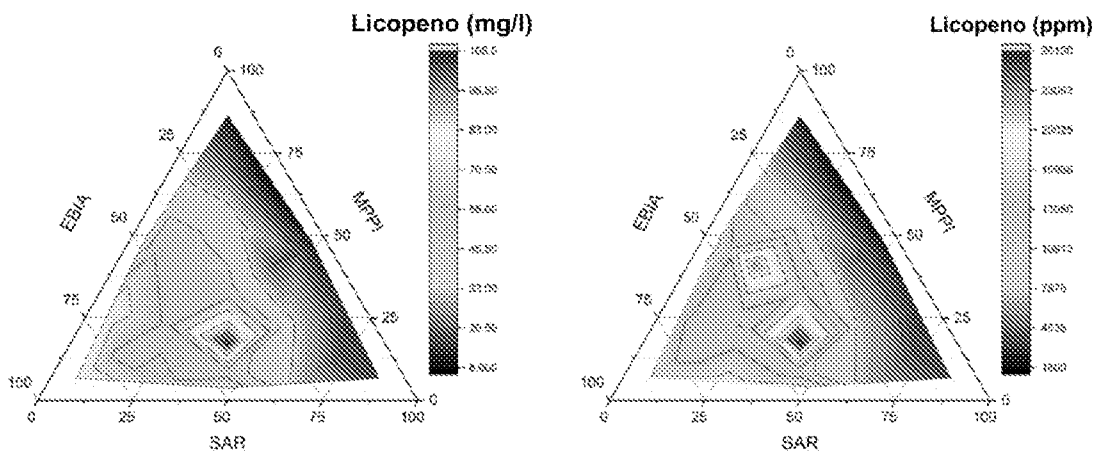


FIG. 6

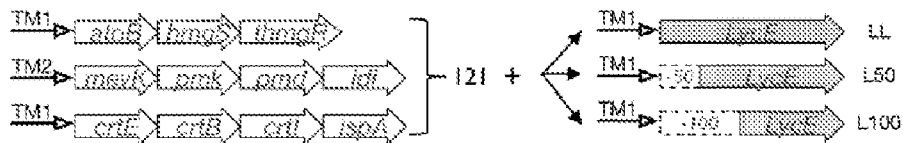
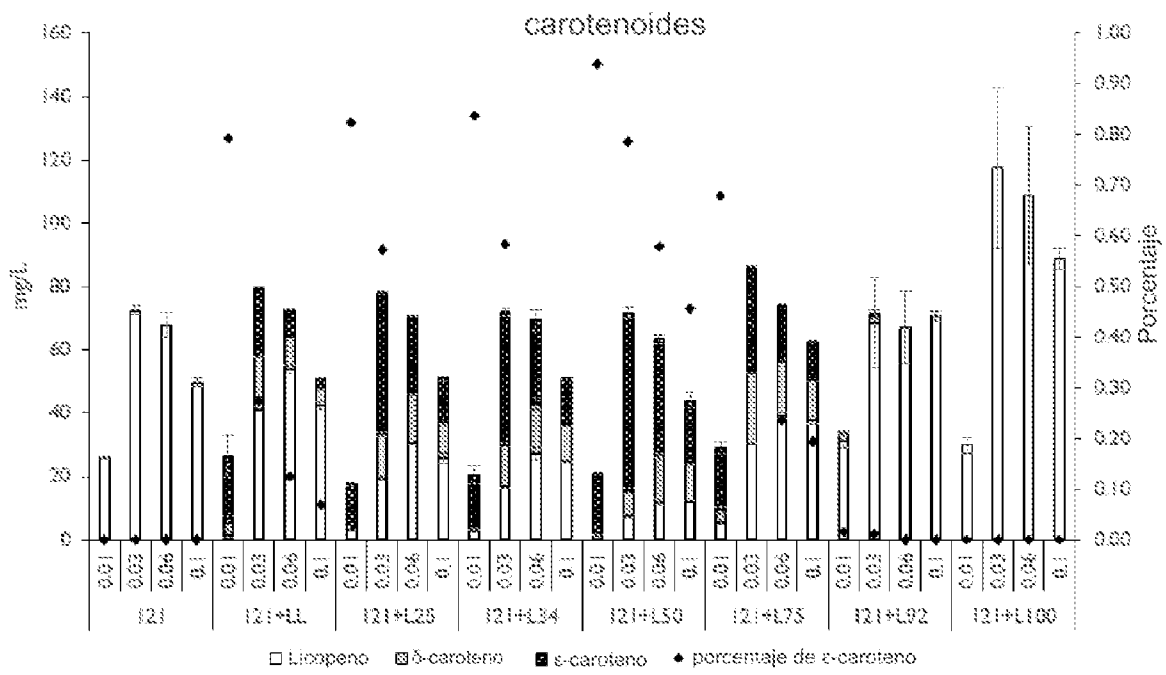


FIG. 7

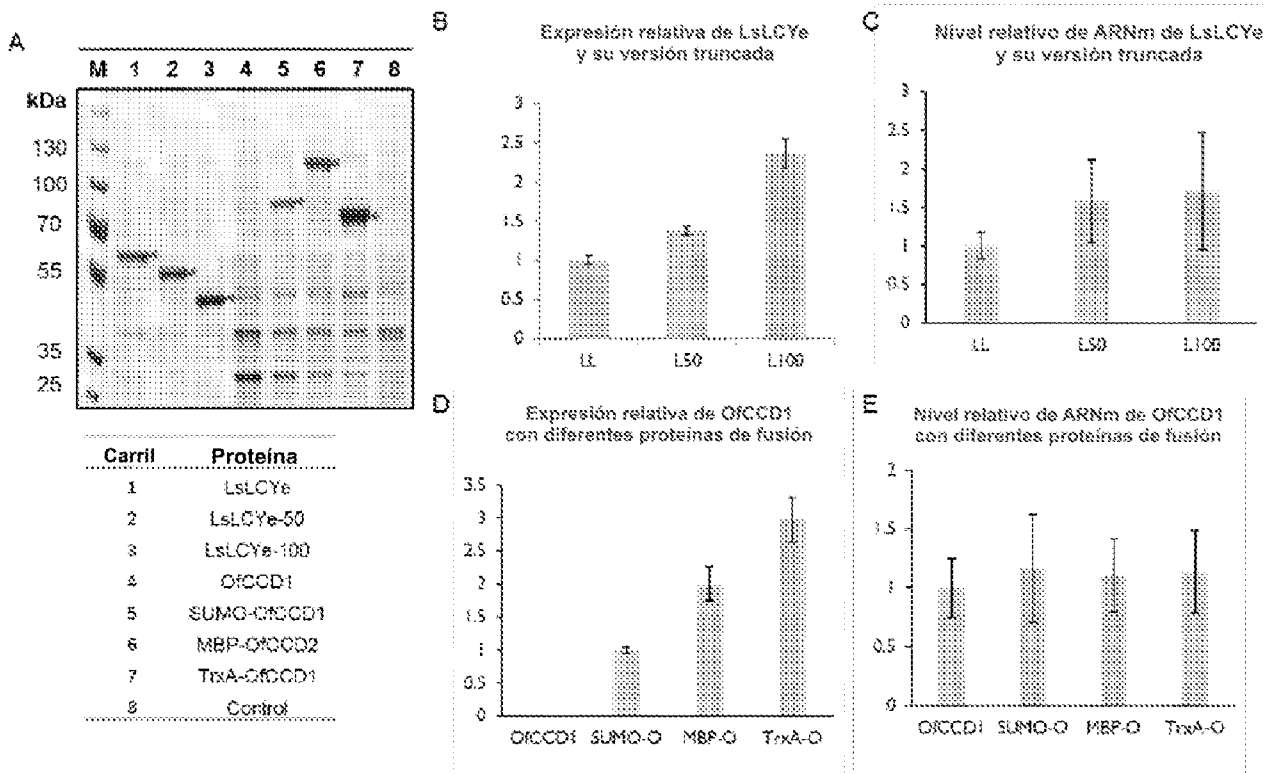


FIG. 8

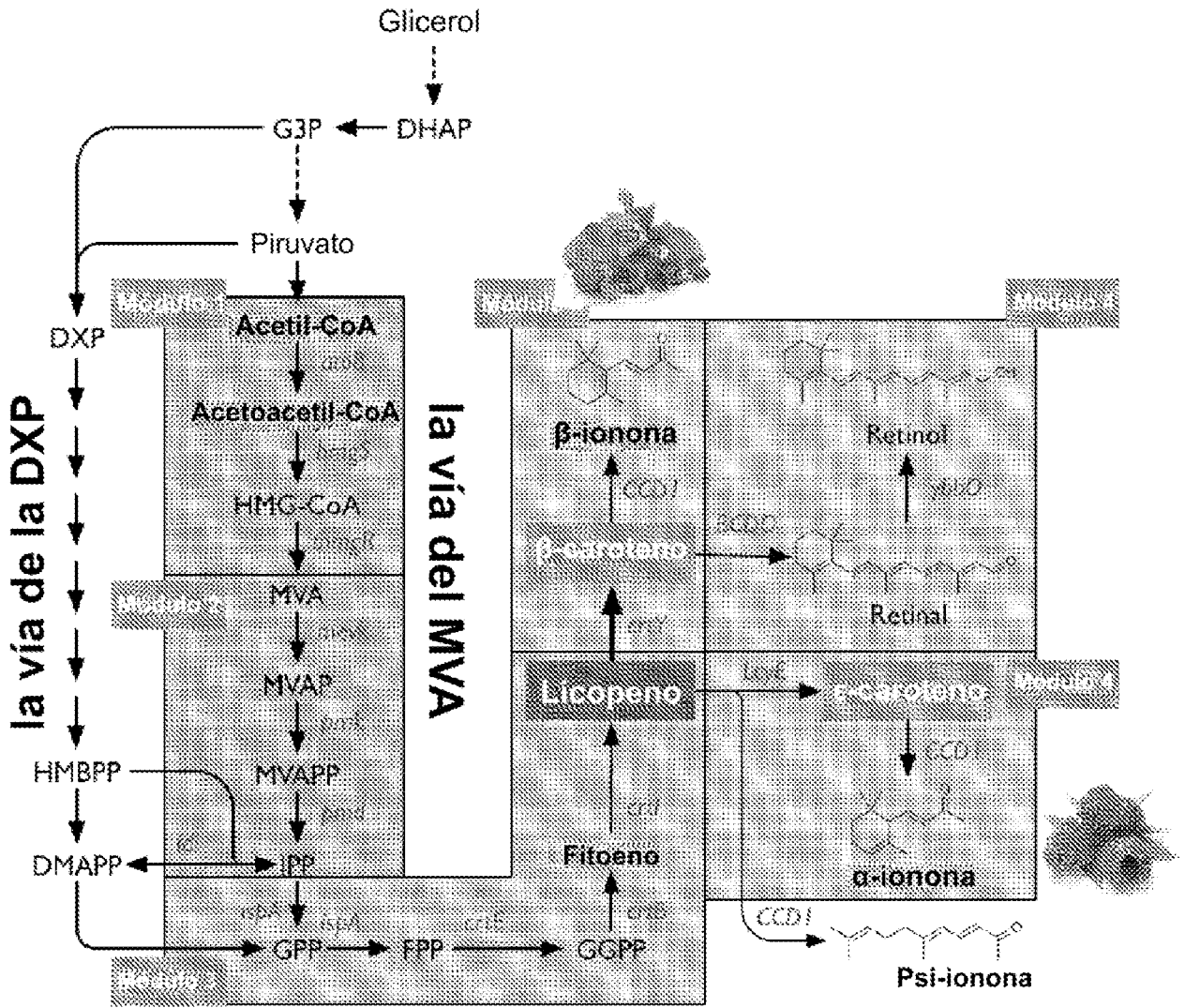


FIG. 9

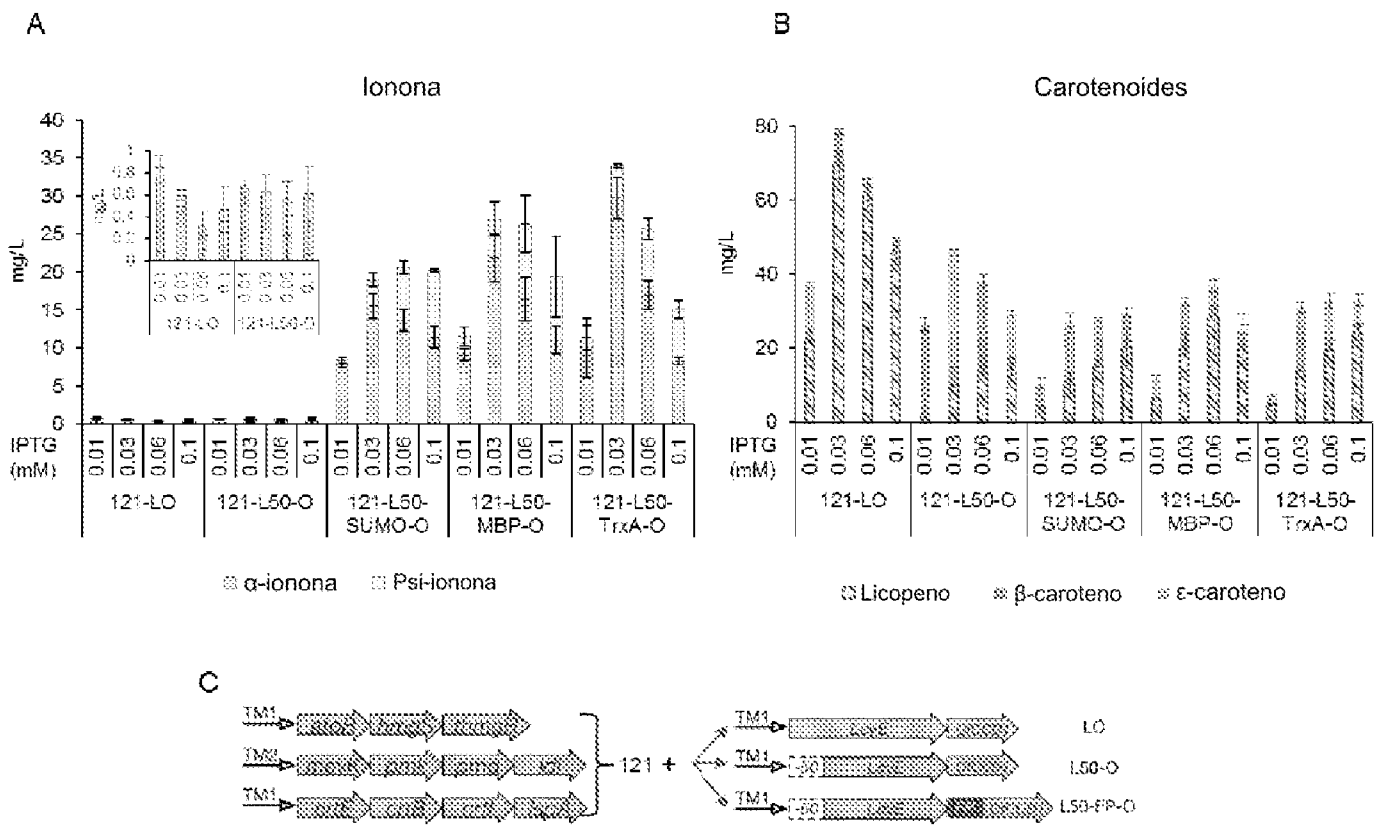


FIG. 10

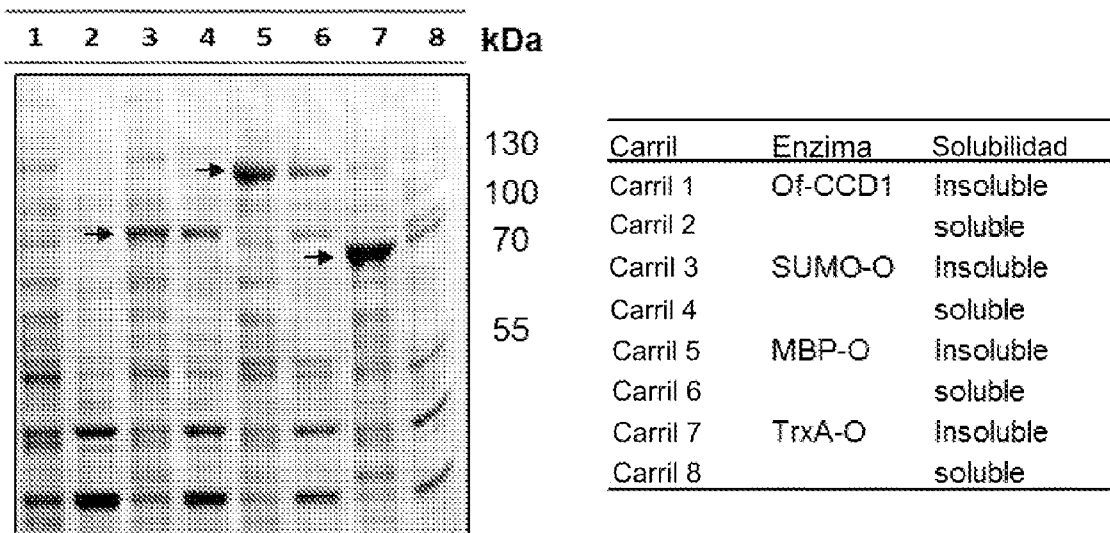


FIG. 11



FIG. 12

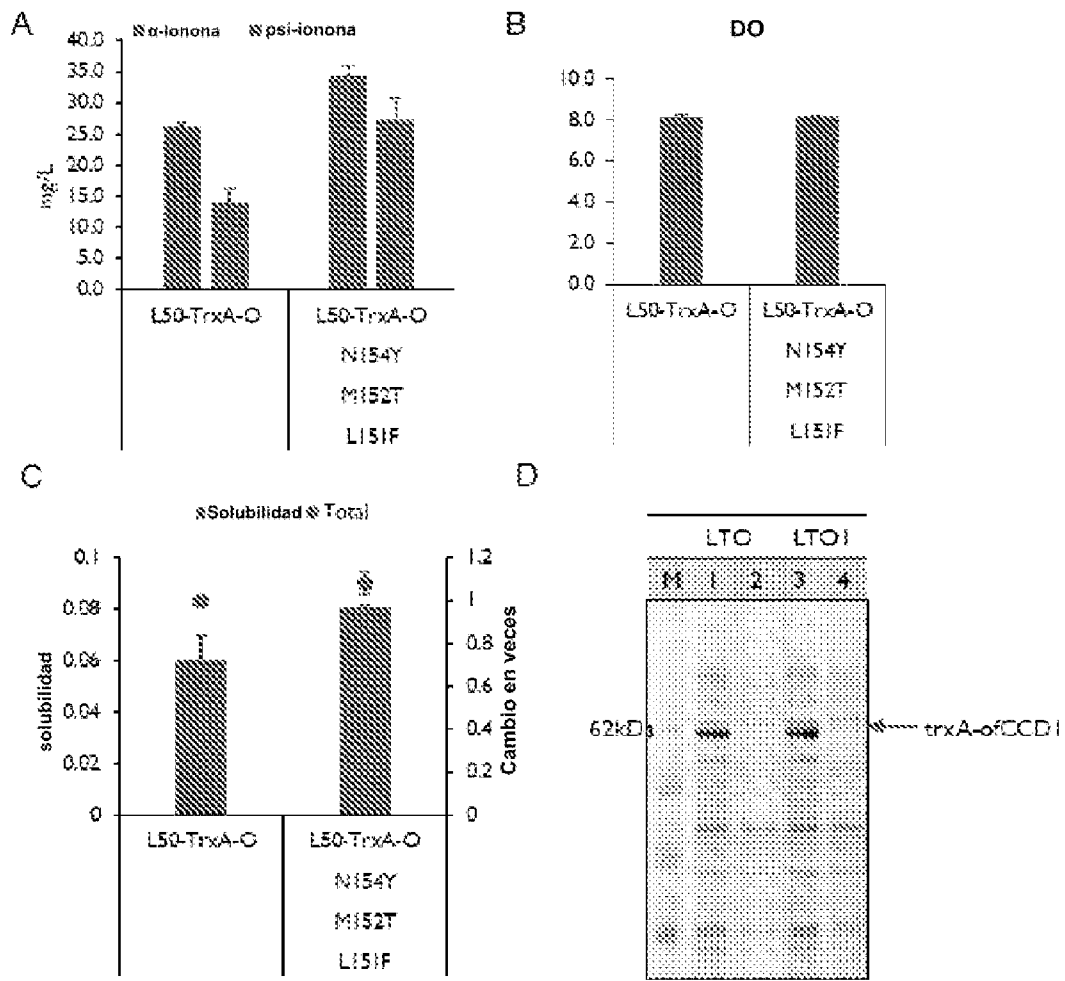


FIG. 13

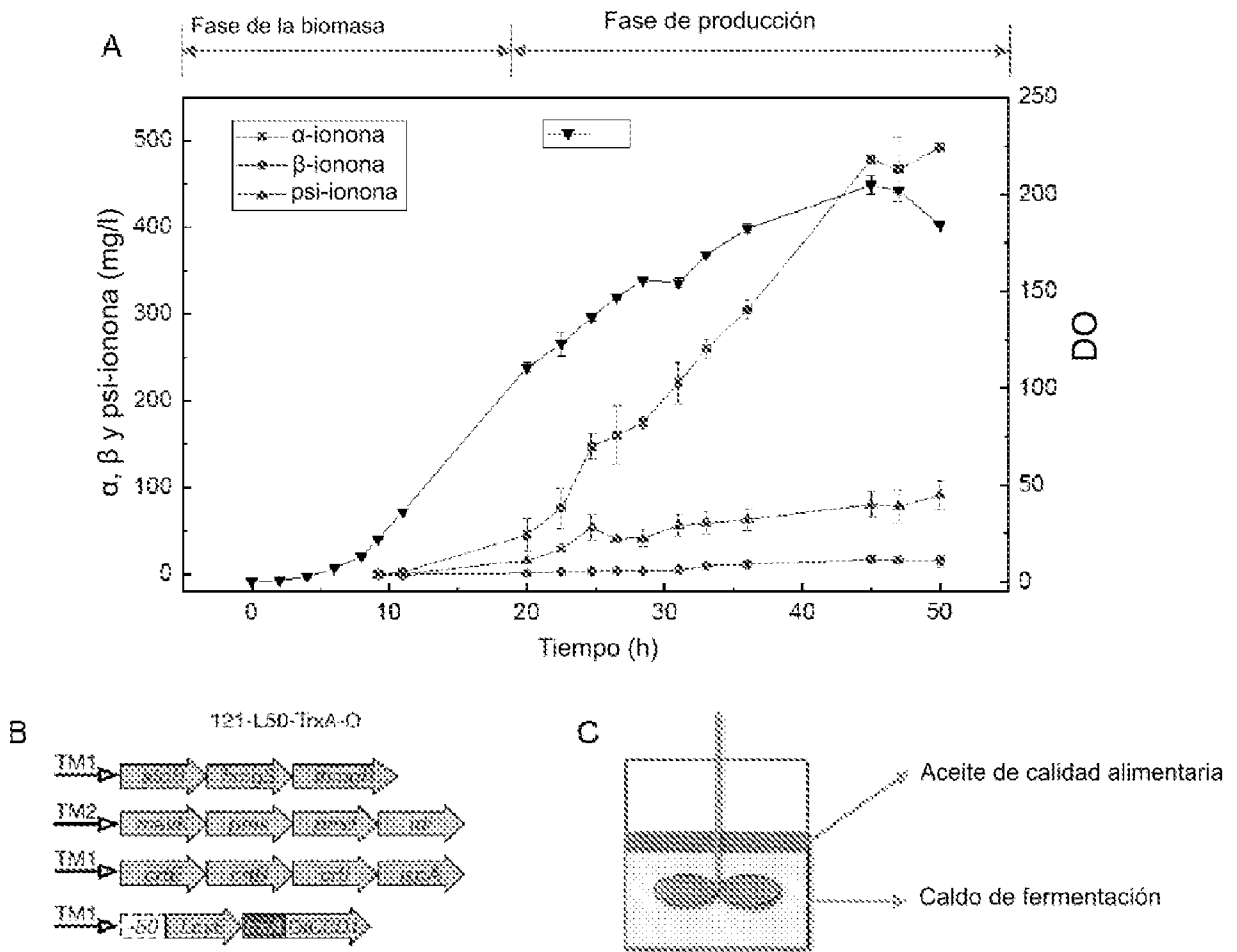


FIG. 14

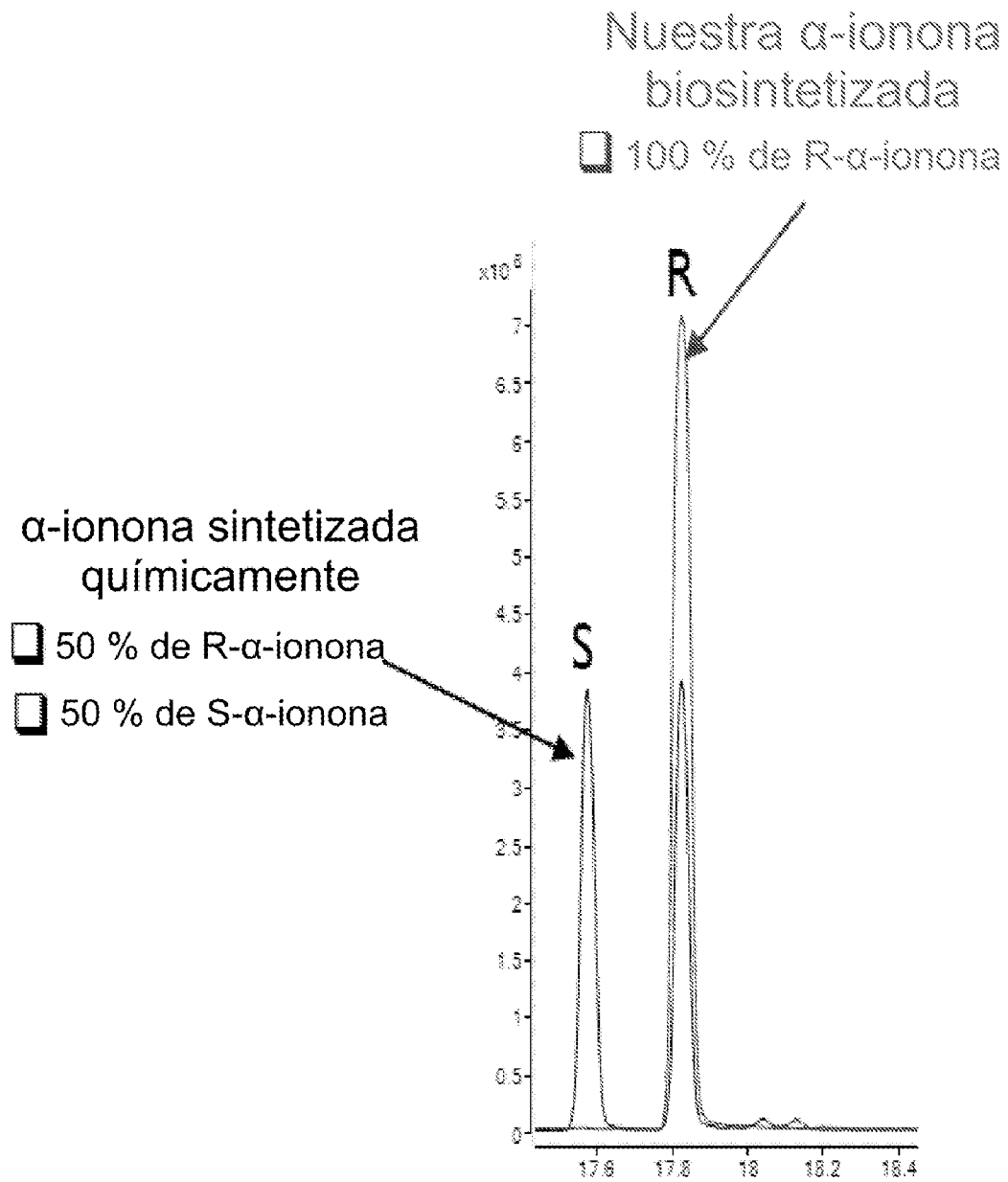


FIG. 15

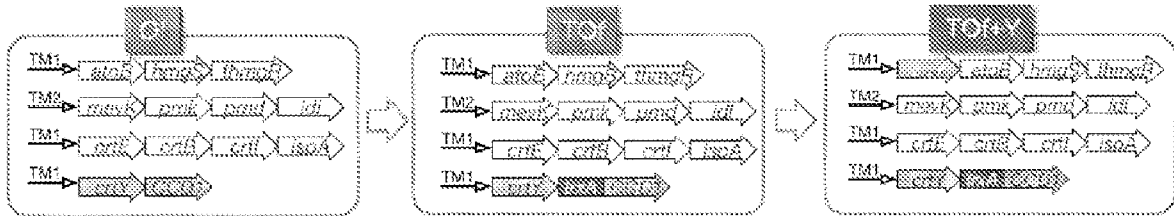
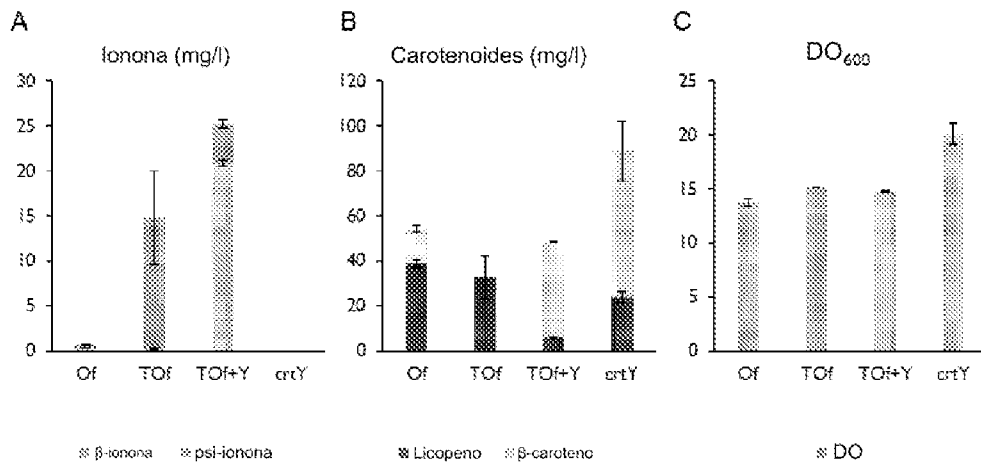


FIG. 16

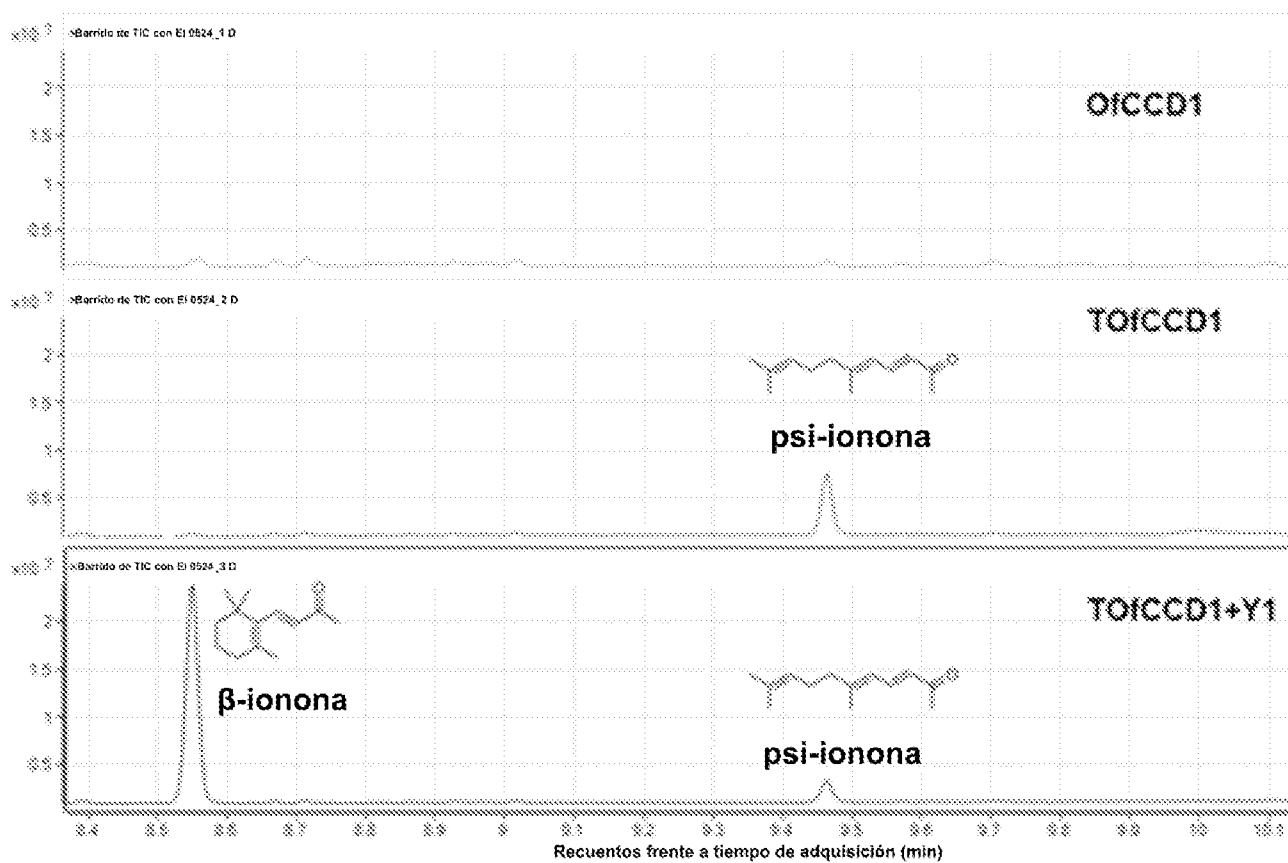


FIG. 17

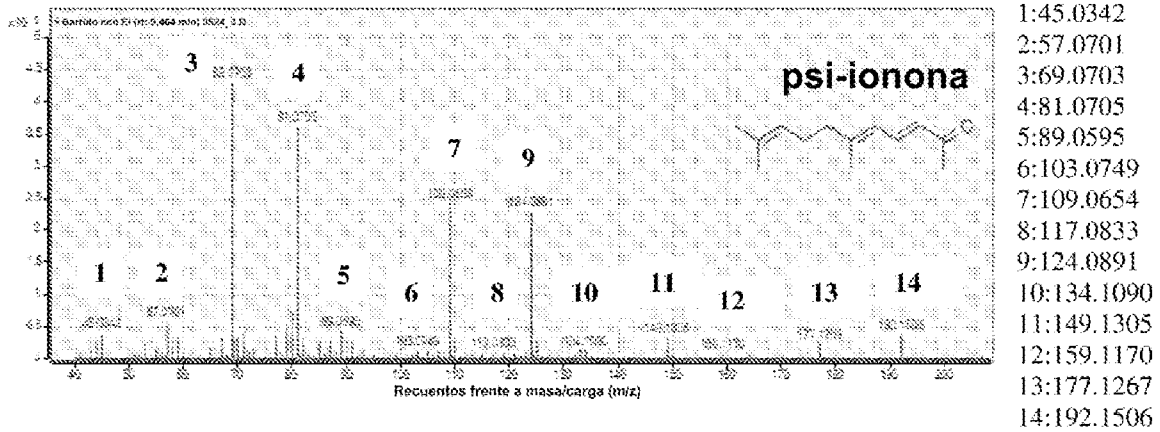
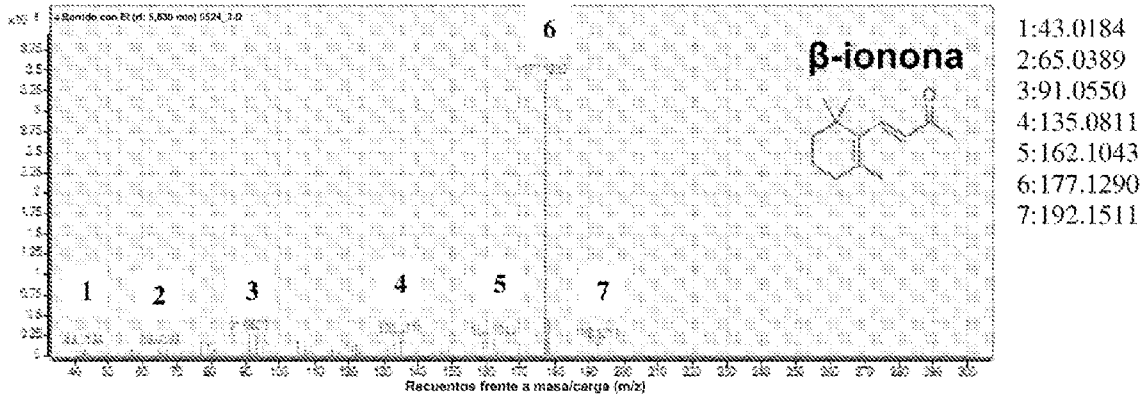
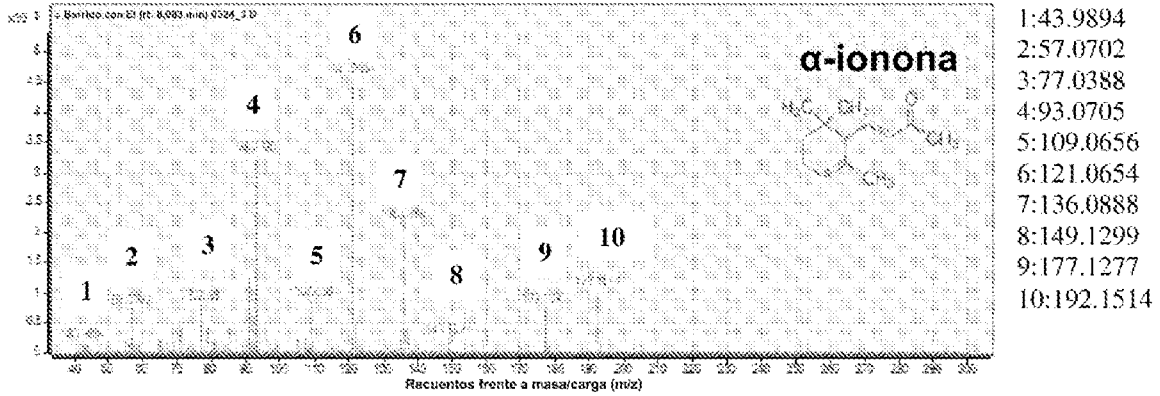


FIG. 18

Q6S572	CCD1_ARATH	1	-----MAEFLSDGQRIIS	54
U3M7F6	U3M7F6_VITVI	1	--MAB---KKEQSGGSAV	55
D4QE74	D4QE74_9LAMI	1	MGMQC---EDAQRTMVA	57
Q6E4P3	Q6E4P3_PETHY	1	MCRKEADDGVERIEAGV	60

Q6S572	CCD1_ARATH	55	IR	114
U3M7F6	U3M7F6_VITVI	56	VR	115
D4QE74	D4QE74_9LAMI	58	V-	118
Q6E4P3	Q6E4P3_PETHY	61	T-	119

Q6S572	CCD1_ARATH	115		174
U3M7F6	U3M7F6_VITVI	116		175
D4QE74	D4QE74_9LAMI	117		176
Q6E4P3	Q6E4P3_PETHY	120		179

Q6S572	CCD1_ARATH	175		234
U3M7F6	U3M7F6_VITVI	176		235
D4QE74	D4QE74_9LAMI	177		236
Q6E4P3	Q6E4P3_PETHY	180		239

Q6S572	CCD1_ARATH	235		294
U3M7F6	U3M7F6_VITVI	236		295
D4QE74	D4QE74_9LAMI	237		296
Q6E4P3	Q6E4P3_PETHY	240		299

Q6S572	CCD1_ARATH	295		354
U3M7F6	U3M7F6_VITVI	296		355
D4QE74	D4QE74_9LAMI	297		356
Q6E4P3	Q6E4P3_PETHY	300		359

Q6S572	CCD1_ARATH	355		414
U3M7F6	U3M7F6_VITVI	356		415
D4QE74	D4QE74_9LAMI	357		418
Q6E4P3	Q6E4P3_PETHY	360		419

Q6S572	CCD1_ARATH	415		473
U3M7F6	U3M7F6_VITVI	416		475
D4QE74	D4QE74_9LAMI	417		476
Q6E4P3	Q6E4P3_PETHY	420		479

Q6S572	CCD1_ARATH	474		531
U3M7F6	U3M7F6_VITVI	476		535
D4QE74	D4QE74_9LAMI	477		536
Q6E4P3	Q6E4P3_PETHY	480		539

Q6S572	CCD1_ARATH	533		538
U3M7F6	U3M7F6_VITVI	536		542
D4QE74	D4QE74_9LAMI	537		543
Q6E4P3	Q6E4P3_PETHY	540		546

FIG. 19

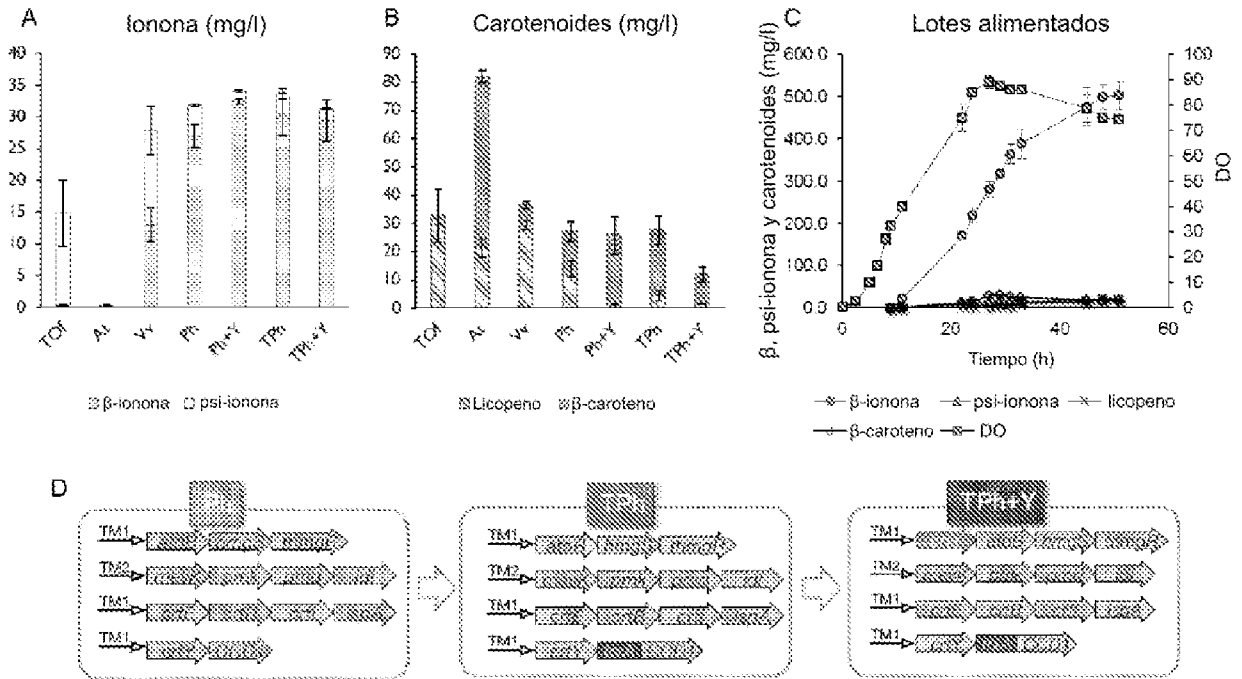


FIG. 20

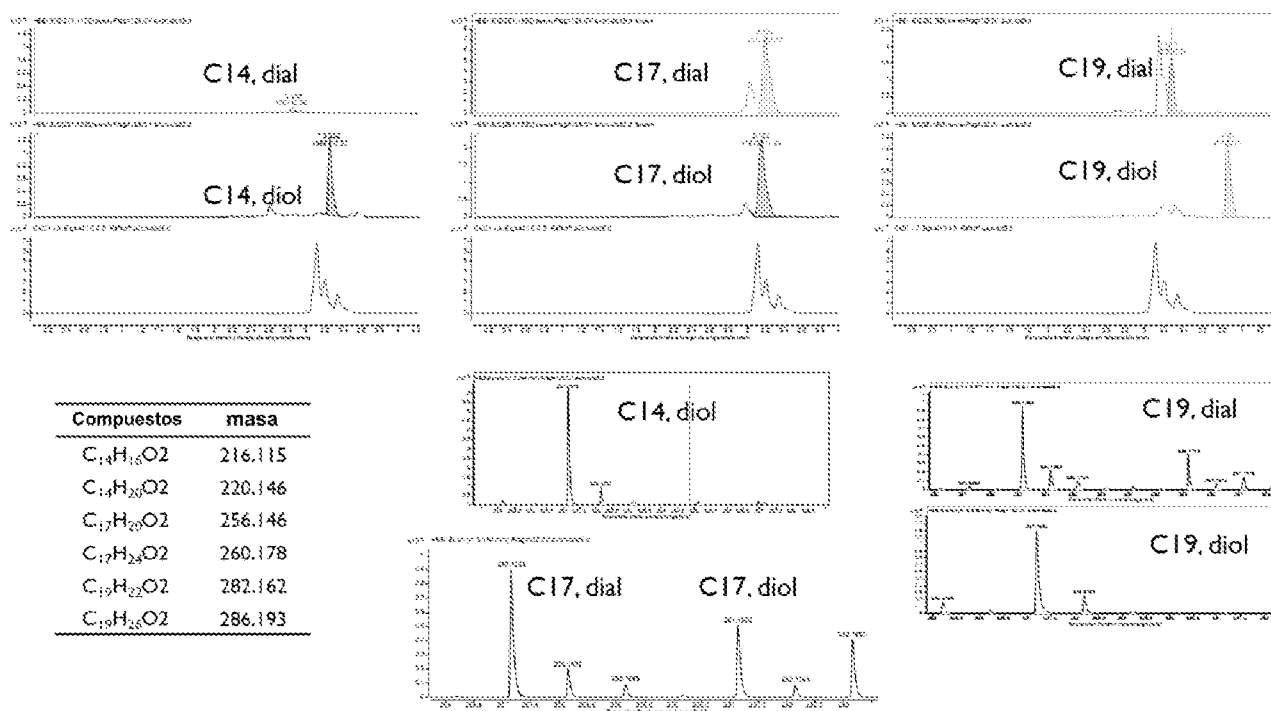


FIG. 22

