

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 912 603**

21 Número de solicitud: 202031186

51 Int. Cl.:

C12N 1/19 (2006.01)

C12R 1/865 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

26.11.2020

43 Fecha de publicación de la solicitud:

26.05.2022

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)**

**C/ Serrano, nº 117
28006 Madrid (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**GUILLAMÓN NAVARRO, José Manuel;
MUÑIZ CALVO, Sara y
BISQUERT ALCARAZ, Ricardo**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **SACCHAROMYCES CEREVISIAE RECOMBINANTE PARA LA PRODUCCIÓN DE
HIDROXITIROSOL**

57 Resumen:

Saccharomyces cerevisiae recombinante para la producción de hidroxitirosol

La presente invención se refiere a una levadura vínica, particularmente *Saccharomyces cerevisiae*, modificada genéticamente mediante integración múltiple en el genoma del complejo enzimático hidroxilasa HpaBC de *Escherichia coli* y la enzima ARO4 de *Saccharomyces cerevisiae* con una mutación puntual, particularmente la sustitución de K (lisina) por L (leucina) en la posición 229 en la secuencia de aminoácidos de ARO4 (ARO4 K229L) y su uso para producir hidroxitirosol a partir de glucosa. Además, la presente invención también se refiere a un método para producir hidroxitirosol (HT) mediante el cultivo de dicha cepa.

ES 2 912 603 A1

DESCRIPCIÓN

Saccharomyces cerevisiae recombinante para la producción de hidroxitirosol

5 La presente invención se refiere a una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* modificada genéticamente mediante integración múltiple del complejo enzimático hidroxilasa HpaBC de *Escherichia coli* y la enzima modificada ARO4 K229L, con capacidad de producir hidroxitirosol (HT) a partir de glucosa. Por lo tanto, la presente invención se engloba dentro del campo de la biotecnología, en particular, en el uso de
10 microorganismos recombinantes en procesos industriales.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

El hidroxitirosol (HT) es considerado como uno de los más potentes antioxidantes en la naturaleza. Se encuentra mayoritariamente en las aceitunas y en el aceite de oliva. En
15 la última década, numerosos estudios muestran los beneficios saludables de los antioxidantes en general, pero del HT en particular. Las propiedades beneficiosas atribuidas al aceite de oliva se derivan principalmente de la presencia de este compuesto. El HT puede ser utilizado como nutracéutico debido a sus propiedades anticancerígenas, cardioprotectoras, antiinflamatorias y neuroprotectoras.
20

La mayoría del HT disponible actualmente en el mercado procede de extractos de hoja del olivo o de residuos de la industria olivarera (alpechín). Sin embargo, el HT extraído forma parte de una fracción poco purificada. Por el contrario, el HT puro alcanza precios
25 muy altos de mercado (alrededor de 12.000 €/g; Sigma Aldrich). El alto precio se atribuye a la baja concentración en sus fuentes naturales (aceituna y otros vegetales), a los bajos rendimientos de extracción y a la dificultad de sintetizar HT químicamente. Además, la mayoría de los efectos beneficiosos en la salud se han obtenido en condiciones que utilizaban el compuesto muy puro. Por todo ello, se ha incrementado el
30 interés en producir este compuesto mediante aproximaciones biotecnológicas mediante el uso de microorganismos modificados genéticamente para obtener rendimientos que puedan ser viables para su producción industrial.

En el estado de la técnica, la mayoría de las estrategias realizadas para la sobreproducción de HT han utilizado a *Escherichia coli* como factoría celular. En el
35 documento US2010/0047887A1 se describe cepas de *E. coli* modificadas

genéticamente capaces de dirigir la producción de hidroxitirosol a partir de tirosol mediante la sobreexpresión de los genes *hpaB* y *hpaC* de *E. coli*.

5 En el documento *Wei Chen, et al., 2019, Nature Communications, Vol. 10, Art. 960* se describen estrategias de ingeniería metabólica para el incremento de la producción de hidroxitirosol a partir de tirosol en *E. coli*, en particular se describe la comparación de la producción de hidroxitirosol entre cepas recombinantes con mutaciones en el complejo enzimático *HpaBC* y cepas recombinantes con el complejo enzimático silvestre.

10 En este momento, las estrategias biotecnológicas desarrolladas para incrementar la producción de hidroxitirosol se llevan a cabo mediante el uso de tirosol o tirosina como fuentes de carbono, conllevando un incremento de los gastos de la producción industrial. Por ello, se hace necesario desarrollar nuevas estrategias biotecnológicas en la industria alimentaria para incrementar la producción de hidroxitirosol preferiblemente a partir de
15 fuentes de carbono simples, como por ejemplo a partir de glucosa. Además, la mayoría de las estrategias realizadas para la producción de HT utilizan *Escherichia coli* como factoría celular y sería recomendable desarrollar estrategias con otros microorganismos, preferiblemente usados en industria alimentaria.

20 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una levadura vínica, particularmente *Saccharomyces cerevisiae*, modificada genéticamente mediante integración múltiple en el genoma del complejo enzimático hidroxilasa *HpaBC* de *Escherichia coli* y la enzima ARO4 de
25 *Saccharomyces cerevisiae* con una mutación puntual, particularmente la sustitución de K (lisina) por L (leucina) en la posición 229 en la secuencia de aminoácidos de ARO4 (ARO4 K229L), con capacidad de producir hidroxitirosol (HT) a partir de glucosa, disminuyendo los gastos de la producción industrial de HT.

30 Además, *Saccharomyces cerevisiae* se clasifica como un microorganismo GRAS, *Generally Recognized As Safe* por la FDA, y presenta propiedades antimicrobianas frente a bacterias y antioxidante, permitiendo su uso como factoría celular en la industria alimentaria y actuar como sustituto o reductor del elevado contenido de sulfuroso en vinos (relacionado cada vez más con alergias o sensibilidad por parte del consumidor).

35

Inicialmente, los inventores desarrollaron cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

recombinantes mediante integración múltiple en el genoma del complejo hidroxilasa HpaBC de *Escherichia coli*, consistente en dos genes HpaB y HpaC responsables de la actividad 4-hidroxifenilacetato monooxigenasa que transforman el tirosol en HT (cepa *Saccharomyces cerevisiae HpaBC*). Además, introdujeron modificaciones en las
5 enzimas involucradas en la ruta de la síntesis de aminoácidos aromáticos (triptófano, fenilalanina y tirosina). Dichas modificaciones fueron, tanto en la sobreexpresión de los genes de *Saccharomyces cerevisiae* silvestre; *ARO3*, *ARO4*, *ARO7* y *ARO10*, así como la desregulación de la represión catabólica en el metabolismo de los aminoácidos aromáticos mediante mutaciones puntuales de genes de dicho metabolismo,
10 particularmente la sustitución de K (lisina) por L (leucina) en la posición 222 de *ARO3* [HpaBC + *ARO3 K222L*], la sustitución de K (lisina) por L (leucina) en la posición 229 de *ARO4* [HpaBC + *ARO4 K229L*] y la sustitución de G (glicina) por S (serina) en la posición 141 de *ARO7* [HpaBC + *ARO7 G141S*].

15 Todas las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* recombinantes mostraron un aumento de la producción de hidroxitirosol en comparación con la cepa control, sin embargo, la cepa de *Saccharomyces cerevisiae HpaBC + ARO4 K229L* mostró un incremento significativo en la producción de hidroxitirosol, llegando hasta una concentración de HT de aproximadamente 6 mg·L⁻¹ (Figura 1 y Tabla 3).

20 Posteriormente, los inventores determinaron la producción de hidroxitirosol a partir de glucosa de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante *HpaBC + ARO4K229L* en otras condiciones de cultivo (y en comparación con la cepa de *Saccharomyces cerevisiae HpaBC*), obteniendo un aumento de más de 26 veces la producción de hidroxitirosol con respecto a la producción de la cepa control, *Saccharomyces cerevisiae HpaBC*, superando los 8,5 mg·L⁻¹ (Figura 4 y Tabla 7).

Finalmente, los inventores optimizaron tanto las condiciones de glucosa como el tiempo de producción para la obtención de hidroxitirosol. La cepa de *Saccharomyces cerevisiae*
30 con el plásmido que comprende *HpaBC + ARO4K229L* llegó a superar los 350 mg·L⁻¹ (Figura 5). Además, la cepa *Saccharomyces cerevisiae* recombinante con el complejo *HpaBC + ARO4K229L* integrado, en condiciones óptimas de cultivo, llegó a superar los 18 mg·L⁻¹ (Figura 6).

35 Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a una cepa de

Saccharomyces cerevisiae recombinante, de aquí en adelante la “cepa de la invención”, que comprende las siguientes secuencias de nucleótidos:

- (i) las secuencias de nucleótidos que codifican el complejo enzimático hidroxilasa HpaBC de *Escherichia coli* o un fragmento de las mismas, y
- 5 (ii) la secuencia de nucleótidos que codifica para la enzima ARO4 de *Saccharomyces cerevisiae* que comprende la sustitución de K (lisina) por L (leucina) en la posición 229 (ARO4 K229L) o un fragmento de la misma;

en donde la secuencia de nucleótidos (ii) está sobreexpresada con respecto a una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* no recombinante o *wild type*.

10

En la presente invención el término “cepa de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante” se refiere a aquella cepa de una levadura vínica, particularmente de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, que ha sido modificada genéticamente, distinguiéndose así de la cepa “madre”, “parental” o *wild type*. En el contexto de la presente invención, los

15 términos “*Saccharomyces cerevisiae* recombinante” y “*Saccharomyces cerevisiae* transgénica” son términos equivalentes y significan lo mismo.

La cepa de la invención es sobreproductora de hidroxitirosol a partir de glucosa gracias a que presenta insertado en su genoma varias secuencias de nucleótidos, de aquí en

20 adelante “secuencias de la invención”, que codifican para las siguientes enzimas o proteínas:

- (i) el complejo enzimático hidroxilasa HpaBC, consistente en dos genes *HpaB* (secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 1 que codifica una proteína con secuencia
- 25 aminoacídica SEQ ID NO: 2) y *HpaC* (secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 3 que codifica una proteína con secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 4) responsables de la actividad 4-hidroxifenilacetato monooxigenasa que transforman el tirosol en HT. En una realización particular, el complejo enzimático hidroxilasa HpaBC es el complejo enzimático hidroxilasa HpaBC de *Escherichia coli*.

30

En otra realización particular el complejo enzimático hidroxilasa HpaBC de *Escherichia coli* comprende las secuencias de nucleótidos correspondientes a los genes *HpaB* y *HpaC*, de aquí en adelante el “complejo enzimático hidroxilasa HpaBC” que presentan, al menos, un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% de identidad de secuencia con la

35 SEQ ID NO: 1 y la SEQ ID NO: 3, respectivamente. En otra realización particular, el

complejo enzimático hidroxilasa HpaBC de *Escherichia coli* comprende, o consiste en, las secuencias de nucleótidos que presentan un 100% de identidad de secuencia con las secuencias SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 3.

5 En otra realización particular, la secuencia de aminoácidos que codifica el complejo enzimático hidroxilasa HpaBC de *Escherichia coli* comprende las secuencias de aminoácidos que presentan, al menos, un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO:4. En otra realización particular, la secuencia de aminoácidos que codifica el complejo enzimático hidroxilasa
10 HpaBC de *Escherichia coli* comprende, o consiste en, las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4.

En la presente invención, todas las secuencias de nucleótidos o de aminoácidos que presentan una identidad de secuencia de, al menos, un 70% con las secuencias SEQ
15 ID NO: 1 y SEQ ID NO: 3 o con las secuencias SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4, respectivamente, se consideran variantes funcionalmente equivalentes del complejo enzimático hidroxilasa HpaBC de *Escherichia coli*, es decir, aunque comprendan distinta secuencia de nucleótidos o de aminoácidos, son capaces de catalizar la actividad 4-hidroxifenilacetato monooxigenasa que transforma el tirosol en HT. Es práctica de rutina
20 para un experto en la materia los ensayos para determinar si diferentes secuencias se consideran funcionalmente equivalentes.

(ii) la enzima sintasa 3-desoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato (DAHP) codificada por el gen *ARO4* que cataliza el primer paso en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos y
25 que además comprende la sustitución de K (lisina) por L (leucina) en la posición 229 en su secuencia proteica, de aquí en adelante "ARO4 K229L". En una realización particular, el gen ARO4 K229L es el gen ARO4 K229L de *Saccharomyces cerevisiae*.

En otra realización particular, la secuencia del gen ARO4 K229L comprende una
30 secuencia de nucleótidos que presenta, al menos, un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 6. En otra realización particular, el gen ARO4 K229L comprende, o consiste en, una secuencia de nucleótidos que presenta un 100% de identidad de secuencia con la secuencia SEQ ID NO: 6.

35 En otra realización particular, la secuencia de aminoácidos codificada por el gen ARO4

K229L de *Saccharomyces cerevisiae* comprende una secuencia de aminoácidos que presenta, al menos, un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 7. En otra realización particular, la secuencia de aminoácidos que codifica el gen ARO4 K229L de *Saccharomyces cerevisiae* comprende, o consiste en,
5 la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7.

En la presente invención, todas las secuencias de nucleótidos o de aminoácidos que presentan una identidad de secuencia de, al menos, un 70% con la secuencia SEQ ID NO: 6 o con la secuencia SEQ ID NO: 7, respectivamente, se consideran variantes
10 funcionalmente equivalentes del gen ARO4 K229L de *Saccharomyces cerevisiae*, es decir, aunque comprendan distinta secuencia de nucleótidos o de aminoácidos, tienen actividad sintasa 3-desoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato (DAHP) para catalizar el primer paso en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos. Es práctica de rutina para un experto en la materia los ensayos para determinar si diferentes secuencias se
15 consideran funcionalmente equivalentes.

En la presente invención, el término "variante" significa un polipéptido o proteína (o en su caso un polinucleótido) que tiene la misma actividad que un polipéptido o proteína (o polinucleótido) de referencia, pero que comprende una alteración en su secuencia, es
20 decir, una sustitución, inserción y/o deleción, en una o más (p.ej., varias) posiciones. A modo de ejemplo, una sustitución significa el reemplazo del aminoácido (o de un nucleótido) que ocupa una posición con un aminoácido (o de un nucleótido) diferente; una deleción significa la deleción del aminoácido (o de un nucleótido) que ocupa una posición; y una inserción significa agregar un aminoácido (o de un nucleótido) adyacente
25 e inmediatamente después del aminoácido (o de un nucleótido) que ocupa una posición. Los cambios en los polinucleótidos incluyen, sin limitar a, sustituciones, inserciones y/o deleción entre uno o más nucleótidos, representados por sus bases nitrogenadas tales como adenina (A), guanina (G), citosina (C), timina (T) y uracilo (U). Los cambios en los aminoácidos pueden ser de una naturaleza menor, es decir, sustituciones o inserciones
30 de aminoácidos conservadoras que no afectan significativamente al plegamiento y/o la actividad del polipéptido/de la proteína; pequeñas deleciones, típicamente de 1-30 aminoácidos; pequeñas extensiones amino o carboxilo-terminales, tales como un residuo de metionina amino-terminal; un péptido enlazador pequeño de hasta 20-25 residuos; o una pequeña extensión que facilita la purificación cambiando la carga neta
35 u otra función, como una cola de polihistidina, un epítipo antigénico o un dominio de

unión. Los ejemplos de sustituciones conservadoras están dentro de los grupos de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrófobos (leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina),
5 y aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina, treonina y metionina). Las sustituciones de aminoácidos que generalmente no alteran la actividad específica son conocidas en la técnica. Las sustituciones comunes son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu y Asp/Gly.

10

En el contexto de la presente invención también se contemplan fragmentos de las secuencias de nucleótidos o fragmentos de las proteínas codificadas por dichas secuencias de nucleótidos, siempre y cuando dichos fragmentos puedan desempeñar la función de la proteína completa. Así, el término "fragmento" se refiere a una proteína
15 o polipéptido (o polinucleótido) con uno o más aminoácidos (o nucleótidos) ausentes de los extremos de su secuencia, como por ejemplo el terminal amino y/o carboxilo de la proteína o el polipéptido o en los extremos 3' o 5' de la secuencia de nucleótidos; donde el fragmento tiene la actividad de la proteína completa. Ensayos para averiguar si un fragmento de una proteína/polinucleótido tiene la misma actividad/función que la
20 proteína/polinucleótido completa han sido descritos en párrafos anteriores para el caso de las variantes de las proteínas/polinucleótidos.

En la presente invención, se entiende por "identidad" o "identidad de secuencia" al grado de similitud entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos obtenido mediante el
25 alineamiento óptimo de las dos secuencias. Dependiendo del número de residuos comunes entre las secuencias alineadas, se obtendrá un grado de identidad expresado en tanto por ciento. El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante algoritmos estándar de alineamiento de secuencias conocidos en el estado de la técnica, como por ejemplo
30 BLAST. Los programas BLAST, por ejemplo, BLASTN, BLASTX, and TBLASTX, BLASTP and TBLASTN, son de dominio público en la página web de *The National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

Una característica de la cepa de la invención es que la secuencia de nucleótidos (ii) está sobreexpresada con respecto a una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* no recombinante o *wild type*.

5 Como entiende un experto en la materia los codones de las secuencias de nucleótidos de la invención pueden estar optimizados para su expresión en *Saccharomyces cerevisiae*, es decir, la secuencia de nucleótidos ha sido alterada con respecto a la secuencia de nucleótidos original de forma que uno o más codones de la secuencia de nucleótidos han sido cambiados a un codón diferente que codifica el mismo aminoácido,
 10 pero que es utilizado con más frecuencia por la célula huésped (en la presente invención, una *Saccharomyces cerevisiae*) que el codón original. La degeneración del código genético hace que todos los aminoácidos excepto metionina y triptófano estén codificados por más de un condón. Por ejemplo, arginina, leucina y serina están codificados por 6 codones diferentes, pero muchos organismos usan ciertos codones
 15 con más frecuencia que otros. Particularmente como la secuencia (i) de la invención es heteróloga a la célula huésped (pertenece a *E. coli*), cabe la posibilidad de optimizar la secuencia de nucleótidos para su expresión en *Saccharomyces cerevisiae*.

Las secuencias de nucleótidos (i) y (ii) de la cepa de la invención pueden formar de parte
 20 de una o más construcciones genéticas que serán introducidas en *Saccharomyces cerevisiae* para obtener la cepa de la invención. Por lo tanto, la presente invención también se relaciona con una construcción génica que comprende, al menos, una secuencia entre las secuencias de nucleótidos (i) y (ii) de la cepa de la invención. La construcción génica puede comprender, además, los elementos necesarios para la
 25 expresión de las secuencias de nucleótidos (i) y (ii) de la cepa de la invención. Dichos elementos incluyen, sin limitar a, promotores, terminadores de la transcripción, marcadores de selección, orígenes de replicación, potenciadores de la expresión (*enhancers*) y sitios de unión a ribosomas (RBS).

30 Además, como entiende un experto en la materia, las secuencias de nucleótidos (i) y (ii) de la cepa de la invención pueden estar unidas operativamente con un promotor que puede actuar en la *Saccharomyces cerevisiae* hospedadora. La selección del promotor puede permitir la expresión de un producto génico deseado en una diversidad de condiciones. Los promotores pueden seleccionarse para una función óptima, de manera
 35 que se inserte la construcción del vector. Los promotores pueden seleccionarse también

basándose en sus características reguladoras. Los ejemplos de dichas características incluyen mejora de la actividad de transcripción e inducibilidad.

5 El promotor puede ser un promotor inducible. Por ejemplo, el promotor puede inducirse de acuerdo con la temperatura, el pH, una hormona, un metabolito (por ejemplo, lactosa, manitol, un aminoácido), la luz (por ejemplo, longitud de onda específica), un metal pesado o un antibiótico.

10 Los marcadores de selección son ampliamente conocidos en el estado de la técnica. Estos marcadores de selección, o genes de selección, pueden ser genes de resistencia a antibióticos, genes reporteros, como el gen que codifica la beta-galactosidasa del operón lactosa, etc. Entre los genes que confieren resistencia a antibióticos se incluyen, sin limitar a, ampicilina, tetraciclina, kanamicina, higromicina, gentamicina, etc. Los marcadores permiten la selección de las células transformadas satisfactoriamente que
15 crecen en un medio que contiene el antibiótico correspondiente porque llevan el gen de resistencia apropiado.

La introducción de las secuencias de nucleótidos (i) y (ii) de la cepa de la invención o de la construcción/es génica/s que comprenden dichas secuencias de nucleótidos
20 puede realizarse mediante el empleo de un vector, por ejemplo, un vector de expresión.

En la presente descripción, el término “vector” se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede usarse para transportar o transferir una secuencia de nucleótidos al interior de una célula. Un vector puede contener diferentes elementos funcionales que
25 incluyen, pero no se limitan a, elementos de control de la transcripción, como promotores u operadores, regiones o potenciadores de la unión a factores de transcripción, y elementos de control para iniciar y terminar la transcripción. Los vectores incluyen, pero no se limitan a: plásmidos, cósmidos, virus, fagos, casetes de expresión recombinantes y transposones. Algunos vectores son capaces de replicarse o dividirse autónomamente
30 tras ser introducidos en la célula huésped, como los vectores bacterianos con un origen de replicación bacteriano. Otros vectores pueden integrarse en el genoma de la célula huésped y replicarse así junto con el genoma celular.

La obtención de dicho vector puede realizarse por métodos convencionales conocidos
35 por los técnicos en la materia, al igual que para la transformación de *Saccharomyces*

cerevisiae se pueden utilizar diferentes métodos ampliamente conocidos – transformación química, liposomas, transfección, electroporación, bombardeo de partículas, balas génicas (“*gene gun*”), microinyección, etc. – descritos en diversos manuales ampliamente conocidos por el experto en la materia.

5

En otro aspecto, la presente invención se relaciona con una composición, de aquí en adelante “composición de la invención”, que comprende la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* de la invención, incluyendo solas o en combinación todas las realizaciones particulares descritas en párrafos anteriores. Adicionalmente, la composición de la invención puede comprender otras especies del género *Saccharomyces*, además de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* de la invención, tales como: *S. uvarum*, *S. bayanus*, *S. pastorianus*, *S. eubayanus*, *S. paradoxus*, *S. mikatae*, *S. jurei*, *S. kudriavzevii* y *S. arboricola*. Además, la composición de la invención puede comprender otras especies de levaduras no convencionales utilizadas como factorías celulares, tales como *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Torulaspota delbrueckii*, *Lachanceae thermotolerans*, *Ogataea polymorpha*, *Yarrowia lipolytica*, *Hansenula polymorpha*, *Arxula adenivorans*, *Candida boidinii*, *Pichia methanolica*, *Xanthophyllomyces dendrorhous* y *Kluyveromyces lactis*. Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención se relaciona con una composición que comprende un consorcio sintético microbiano, también denominada “composición de la invención”, comprendido por la cepa de la invención tal como se ha definido a lo largo de la presente descripción, y al menos un microorganismo que no es *Saccharomyces cerevisiae*.

Tal como se demuestra en los ejemplos de la presente invención, mediante el cultivo de la cepa de la invención es posible producir hidroxitirosol (HT) a partir de glucosa.

Por tanto, otro aspecto de la presente invención es un método para producir hidroxitirosol, de aquí en adelante el “método de la invención” que comprende:

- (a) cultivar al menos la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* de la invención o una población que comprende la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* de la invención en un medio de cultivo que comprende al menos una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno, y
- (b) purificar el hidroxitirosol obtenido durante la etapa (a).

La cepa de la invención ha sido definida en párrafos anteriores del presente documento,

y se aplica de igual forma a este aspecto de la invención, así como todas sus realizaciones particulares (solas o en combinación).

5 El término "hidroxitirosol" usado en la presente invención, se refiere a una molécula química con formula 3,4-dihidroxifeniletanol que es un polifenol fitoquímico con propiedades antioxidantes.

10 Como entiende el experto en la materia, el crecimiento o cultivo de la cepa o de la población que comprende la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* de la invención se lleva a cabo en un medio de cultivo que comprende los componentes necesarios para que dicho microorganismo prolifere. Así, en el presente documento, el término "medio de cultivo" se refiere a una sustancia, un compuesto, una mezcla, una disolución que comprende la fuente de carbono y nitrógeno necesarias para el crecimiento y metabolismo del microorganismo, en donde dicho medio de cultivo puede ser sólido,
15 semisólido, semilíquido o líquido.

En el presente documento, el término "fuente de nitrógeno" se refiere a moléculas, compuestos químicos, materia orgánica, que comprenden átomos de nitrógeno (N) y que son metabolizadas por los microorganismos para llevar a cabo su crecimiento y desarrollo, en donde dicha fuente de nitrógeno puede tener origen inorgánico u orgánico.
20

En una realización particular del método de la invención la fuente de nitrógeno se selecciona de la lista que consiste en: amonio, urea, los diferentes veintidós aminoácidos proteinogénicos y cualquier combinación entre ellos. En otra realización particular del método de la invención, la fuente de nitrógeno es amonio.
25

En el presente documento, el término "fuente de carbono" se refiere a moléculas, compuestos químicos, materia orgánica, que comprenden átomos de carbono (C) y que son metabolizadas por los microorganismos para llevar a cabo su crecimiento y desarrollo, en donde dicha fuente de carbono puede tener origen inorgánico u orgánico.
30

En una realización particular del método de la invención la fuente de carbono se selecciona de la lista que consiste en: glucosa, fructosa, manosa, galactosa, sacarosa, maltosa y rafinosa. En otra realización particular del método de la invención, la fuente de carbono es glucosa.
35

En una realización particular del método de la invención, el medio de cultivo comprende glucosa en una concentración entre 1 y 400 gramos de glucosa por litro de medio de cultivo.

5

En otra realización más particular del método de la invención, el medio de cultivo comprende glucosa en una concentración entre 50 y 350 gramos de glucosa por litro de medio de cultivo (g/L), y más preferiblemente entre 100 y 300 gramos de glucosa por litro de medio de cultivo, y aún más preferiblemente entre 100 y 250 gramos de glucosa por litro de medio de cultivo.

10

En otra realización aún más particular, el medio de cultivo comprende glucosa en una concentración de 110 g/g, 120 g/g, 130 g/g, 140 g/g, 150 g/g, 160 g/g, 170 g/g, 180 g/g, 190 g/g, 200 g/g, 210 g/g, 220 g/g, 230 g/g o 240 g/g (gramos de glucosa por litro de medio de cultivo), más preferiblemente una concentración de glucosa de 150 g/g o 160 g/g.

15

Además, el medio de cultivo del método de la invención puede comprender oligoelementos (sales) y vitaminas.

20

Así mismo, el medio de cultivo utilizado puede ser un medio de cultivo completo utilizado en la industria para el crecimiento de levaduras, como por ejemplo las melazas de caña de azúcar y remolacha, subproducto de la industria azucarera, o el licor de maíz de la industria del almidón.

25

Como entiende un experto en la materia, el cultivo de la cepa o de una población que comprende la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* de la invención tiene que llevarse a cabo en unas condiciones adecuadas para que la levadura pueda crecer y sintetizar HT. Las condiciones adecuadas de pH, temperatura, humedad, etc., necesarias para cultivar una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* son ampliamente conocidas en el estado de la técnica.

30

En general, el crecimiento de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* requiere de una temperatura por encima de aproximadamente 10°C y por debajo de aproximadamente 40°C. Así, en una realización particular del método de la invención, la etapa (a) se lleva

35

a cabo a una temperatura de entre 15°C y 40°C, preferiblemente de entre 25°C y 35°C, más preferiblemente de entre 24°C y 32°C. En otra realización todavía más particular, la etapa (a) del método de la invención se lleva a cabo a una temperatura de 28°C.

5 Además, el crecimiento o cultivo de la cepa o de la población que comprende la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* en la etapa (a) del método de la invención se lleva a cabo en un tiempo o duración entre 70 y 370 horas. En otra realización particular, la etapa (a) del método de la invención se lleva a cabo en un tiempo de entre 120 y 320 horas, más preferiblemente entre 150 y 290 horas. En otra realización más particular, la etapa (a)
10 del método de la invención se lleva a cabo en un tiempo de 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270 o 280 horas.

En otra realización más particular del método de la invención, la etapa (a) se lleva a cabo durante 220 horas.

15

Dicho crecimiento se lleva a cabo en condiciones de agitación, preferiblemente agitación orbital constante (100-150rpm), con aireación.

Finalmente, el método de la invención comprende una etapa b) que comprende la
20 purificación del hidroxitirosol. Es práctica de rutina para un experto en la materia determinar los métodos de purificación de hidroxitirosol. Ejemplos de métodos de purificación de hidroxitirosol incluyen, sin limitarse a, decantación, lavados con agua bidestilada, hidrólisis celular mediante tratamientos alcalinos, filtración, precipitación, centrifugación, sedimentación, tratamiento con hipoclorito sódico, tratamiento con
25 agentes surfactantes, tratamiento con hidróxido de potasio, tratamiento con hidróxido de sodio, extracción con solventes orgánicos (p.e. metanol) y calentamiento.

En otra realización particular del método de la invención la purificación del hidroxitirosol de la etapa (b) se lleva a cabo mediante extracción con un solvente orgánico,
30 preferiblemente con metanol, más preferiblemente en una disolución al 50% de metanol.

Además, en otra realización más particular del método de la invención, la purificación del hidroxitirosol de la etapa (b) se lleva a cabo mediante cromatografía líquida de alta
35 eficacia (HPLC).

35

Tal como se demuestra en los ejemplos de la presente invención, la cepa de la invención es capaz de producir hidroxitirosol (HT) a partir de glucosa, disminuyendo los gastos de la producción industrial de HT, permitiendo su uso como factoría celular en la industria alimentaria, particularmente en enología. Dentro de la presente invención, también se
5 contempla la producción de hidroxitirosol a partir de glucosa mediante la composición de la invención.

Por lo tanto, otro aspecto de la presente invención, se refiere al uso de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* de la invención o de la composición de la invención para la
10 producción de hidroxitirosol, de aquí en adelante el "uso de la invención".

La cepa de la invención y la composición de la invención han sido definidos en párrafos anteriores del presente documento, y se aplican de igual forma a este aspecto de la invención, así como todas sus realizaciones particulares (solos o en combinación).

15 A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los
20 siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

25 **Figura 1.** Comparación de la concentración de hidroxitirosol en $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ entre las cepas BY4743 HpaBC con los distintos genes candidatos expresados en vector episomal p423GPD. Como cepa control se usó la BY4743 HpaBC con el vector p423GPD vacío. La mayor producción se obtuvo en el sobreexpresante de ARO4 K229L.

30 **Figura 2.** Esquema de la mutagénesis dirigida por PCR empleada para generar una mutación puntual en la secuencia del gen ARO4 desde el ADN genómico de *S. cerevisiae*.

Figura 3. Esquema de la obtención de los casetes génicos construidos para la
35 sobreproducción de hidroxitirosol mediante su integración en levaduras.

Figura 4. Producción de hidroxitirosol y tirosol a partir de glucosa de las cepas de *S. cerevisiae* HpaBC y la cepa *S. cerevisiae* HpaBC + ARO4 K229L, en un medio mínimo con 160 g·L⁻¹ de glucosa durante 120 horas a 28°C. Para la determinación del hidroxitirosol y el tirosol, las muestras fueron diluidas en un 50% con metanol y filtradas con un filtro de 0,22 µm y HPLC-PDA.

Figura 5. Evaluación de la producción de hidroxitirosol en la cepa BY4743 HpaBC con el plásmido episomal p423GPD ARO4 K229L a distintos tiempos en un medio mínimo con 160 g·L⁻¹ de glucosa durante 295 horas a 28°C.

Figura 6. Producción de hidroxitirosol en la cepa *S. cerevisiae* HpaBC + ARO4 K229L, con crecimiento a 28 °C en un medio mínimo con 20, 80, 160, 200, 250 y 300 g·L⁻¹ de glucosa, medido a distintos tiempos.

EJEMPLOS

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

EJEMPLO 1: SELECCIÓN DE GENES CANDIDATOS PARA LA PRODUCCIÓN DE HIDROXITIRO SOL EN LEVADURA

Los inventores realizaron una selección de genes candidatos sobre una cepa *S. cerevisiae* de laboratorio (BY4743) con los genes *hpaB* (código ENA: CAA86048.1) (SEQ ID NO: 1) y *hpaC* (código ENA: CAA86049.2) (SEQ ID NO: 3) de *E. coli* integrados en los elementos repetitivos Ty1 del genoma. Para comparar la producción de hidroxitirosol al coexpresar los diferentes genes candidatos con el complejo HpaBC, se clonó cada gen candidato por separado (*ARO4 K229L* (SEQ ID NO: 6), *ARO4* (SEQ ID NO: 9), *ARO3* (SEQ ID NO: 10), *ARO3 K222L* (SEQ ID NO: 11), *ARO7* (SEQ ID NO: 12), *ARO7 G141S* (SEQ ID NO: 13) y *ARO10* (SEQ ID NO: 14)) en plásmido p423GPD, se transformó la levadura con crecimiento en medio selectivo (SC - His) y determinación de la concentración de hidroxitirosol a las 72 h. La selección de genes candidatos resultó en la elección de ARO4 con la mutación puntual K229L como mejor propuesta para coexpresar junto con el complejo HpaBC (Figura 1).

Materiales y Métodos

1.1. Clonaje de los distintos genes en plásmidos episomales.

5

Para la modificación de un cambio de aminoácido en *ARO3*, *ARO4* y *ARO7* se procedió mediante mutagénesis dirigida por PCR usando la combinación de cebadores *ARO3* F BamHI (SEQ ID NO: 21) / *ARO3* K222L R (SEQ ID NO: 22) / *ARO3* K222L F (SEQ ID NO: 23) / *ARO3* R XhoI (SEQ ID NO: 24), *ARO4* F BamHI (SEQ ID NO: 25) / *ARO4* K229L R (SEQ ID NO: 26) / *ARO4* R XhoI (SEQ ID NO: 27) / *ARO4* K229L F (SEQ ID NO: 28) y *ARO7* F BamHI (SEQ ID NO: 29) / *ARO7* G141S R (SEQ ID NO: 30) / *ARO7* G141S F (SEQ ID NO: 31) / *ARO7* R XhoI (SEQ ID NO: 32), respectivamente, generando los siguientes cambios: sustitución de K (lisina) por L (leucina) en la posición 222 de *ARO3* (*ARO3* K222L o *aro3**) (SEQ ID NO: 19), sustitución de K (lisina) por L (leucina) en la posición 229 de *ARO4* (*ARO4* K229L o *aro4**) (SEQ ID NO: 7) y sustitución de G (glicina) por S (serina) en la posición 141 de *ARO7* (*ARO7* G141S o *aro7**) (SEQ ID NO: 20).

Cada gen se amplificó mediante PCR a partir del DNA genómico de la cepa de *S. cerevisiae* Sc288C, utilizando los cebadores de la tabla 1. Se utilizaron las parejas de cebadores *ARO3* F BamHI (SEQ ID NO: 21) / *ARO3* R XhoI (SEQ ID NO: 24), *ARO4* F BamHI (SEQ ID NO: 25) / *ARO4* R XhoI (SEQ ID NO: 27) y *ARO7* F BamHI (SEQ ID NO: 29) / *ARO7* R XhoI (SEQ ID NO: 32) para amplificar los genes *ARO3*, *ARO4* y *ARO7* tanto en su versión silvestre como en la versión modificada. Estos cebadores incluyen colas que contienen la secuencia de reconocimiento de las enzimas de restricción *BamHI* y *XhoI*, las cuales se utilizaron para el clonaje de cada gen por separado en el plásmido p423GPD (*Mumberg et al., 1995*), originando los plásmidos p423GPD-*aro3*, p423GPD-*aro3**, p423GPD-*aro4*, p423GPD-*aro4**, p423GPD-*aro7*, p423GPD-*aro7** y p423GPD-*aro10*. El gen *ARO10* únicamente se testó su sobreexpresión, por ponerlo bajo el control de un promotor fuerte (GPD), sin utilizar ninguna versión modificada del mismo. La correcta construcción de dichos plásmidos, se confirmó mediante secuenciación Sanger utilizando los cebadores GPDPro-F (SEQ ID NO: 33) y CYC1-R (SEQ ID NO: 34) (Tabla 1).

También se transformó el plásmido p423GPD sin ningún inserto y se usó como control

negativo. Estos plásmidos expresan el gen clonado bajo el control de un promotor constitutivo fuerte, en este caso la secuencia promotora de la gliceraldehído-3-P deshidrogenasa (GPD), lo que asegura una sobreexpresión. Además, estos plásmidos se mantienen en un alto número de copias dentro de la célula mientras se mantenga la presión selectiva en el medio de crecimiento, en este caso la ausencia de histidina en el medio es la presión de selección necesaria para el mantenimiento del plásmido (BY4743 es mutante para este aminoácido).

Para la transformación de *S. cerevisiae* se utilizó el protocolo de transformación de acetato de litio descrito por *Gietz et al., 2004*, en el que las células son incubadas en presencia de acetato de litio, polietilenglicol, DNA "carrier" y los plásmidos p423GPD-aro3, p423GPD-aro3*, p423GPD-aro4, p423GPD-aro4*, p423GPD-aro7, p423GPD-aro7* y p423GPD-aro10 y sometidas a un choque térmico de 42°C durante 20 minutos. Posteriormente, las células se siembran en los diferentes medios de selección y se incuban a 30°C durante 2 o 3 días.

Nombre Cebadores	Secuencia dirección 5'→3'
ARO3 F BamHI	GTCGTGGGATCCTTATGTTTCATTA AAAACGATCACGCCGGTG (SEQ ID NO: 21)
ARO3 K222L R	GCAGTGACACCTGGCAATGTGACAGAAAGG (SEQ ID NO: 22)
ARO3 K222L F	CCTTTCTGTACATTGCCAGGTGTCACTGC (SEQ ID NO: 23)
ARO3 R XhoI	CCGCTCGAGCTATTTTTTCAAGGCCTTTCTTCTGTTTCTAACACC (SEQ ID NO: 24)
ARO4 F BamHI	GTCGTGGGATCCAAATGAGTGAATCTCCAATGTTTCGCTGCC AAC (SEQ ID NO: 25)
ARO4 K229L R	GCAGCAACACCATGCAAAGTAACACCCATG (SEQ ID NO: 26)
ARO4 R XhoI	CCGCTCGAGCTATTTCTTGTTAACTTCTCTTTGTCTGACAGC (SEQ ID NO: 27)
ARO4 K229L F	CATGGGTGTTACTTTGCATGGTGTGCTGC (SEQ ID NO: 28)
ARO7 F BamHI	GTCGTGGGATCCATATGGATTTACAAAACCAGAACTGTTT (SEQ ID NO: 29)

ARO7 G141S R	CTAGTGGCAACAGAAGAGAAGTTATTCTTA (SEQ ID NO: 30)
ARO7 G141S F	TAAGAATAACTTCTCTTCTGTTGCCACTAG (SEQ ID NO: 31)
ARO7 R XhoI	CCGCTCGAGTTACTCTTCCAACCTTCTTAGCAAGTATTCC (SEQ ID NO: 32)
GPDP _{ro} -F	CGGTAGGTATTGATTGTAATTCTG (SEQ ID NO: 33)
CYC1-R	GCGTGAATGTAAGCGTGAC (SEQ ID NO: 34)

Tabla 1. Cebadores utilizados para la obtención de cepas de levadura que sobreexpresa cada uno de los diferentes genes candidatos.

5 1.2. Condiciones de crecimiento y preparación de las muestras

Para determinar la producción de hidroxitirosol, las cepas de laboratorio con HpaBC integrado en su genoma (*S. cerevisiae* HpaBC) y transformadas con los distintos plásmidos (p423GPD-aro3, p423GPD-aro3*, p423GPD-aro4, p423GPD-aro4*,
10 p423GPD-aro7, p423GPD-aro7* y p423GPD-aro10) fueron inoculadas en 5 mL de medio sintético completo sin histidina (SC-His) toda la noche a 28° C en agitación. La composición de este medio se especifica en la Tabla 2.

A la mañana siguiente, se inocularon 25 µL del cultivo crecido en 1,5 mL de medio SC-His fresco en placas de 24 pocillos de 2 mL de capacidad. Este cultivo se incubó en
15 agitación constante a 28 °C, y tras 72 h de crecimiento se tomó muestra para analizar por HPLC-PDA. Las muestras se diluyeron al 50% con metanol absoluto de calidad de HPLC y fueron filtradas con filtros de nylon de 0,22 µm previamente a la inyección en el
20 cromatógrafo.

SC - His	
Glucosa	20 g·L ⁻¹
Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos ni sulfato de amonio (Difco™)	1,7 g·L ⁻¹
Sulfato de amonio	5 g·L ⁻¹

Mezcla SC - His (FORMEDIUM™)	1,93 g·L ⁻¹
------------------------------	------------------------

Tabla 2. Composición del medio sintético completo sin histidina (SC - His) utilizado para la producción de hidroxitirosol

5 1.3. Detección y cuantificación de hidroxitirosol mediante cromatografía líquida

El hidroxitirosol producido se detectó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) en un cromatógrafo *Waters ACQ Arc Sys Core* usando una columna *Accucore™ C18 (Thermo Scientific)* de fase reversa, de dimensiones 4,6 × 150 mm y 2,6 μm de tamaño de partícula. Las fases móviles empleadas fueron A (acetonitrilo) y B (0,01% ácido trifluoroacético en agua) con un flujo constante de 1 mL·min⁻¹, el volumen de inyección fue de 10 μL y el programa de gradientes se ajustó como sigue: flujo inicial de 0:100 % (A:B), 18 min 10:90 % (A:B), 19-27 min 25:75 % (A:B), 28-31 min 100:0 % (A:B) y 39 min 0:100 % (A:B). La detección de analitos tuvo lugar en un detector de matriz de diodos 2998 PDA donde se extrajo el cromatograma correspondiente a la absorbancia a λ=210 nm. El tiempo de retención para el hidroxitirosol fue 9,366 min y de 13,112 min para el tirosol.

20 **Resultados**

La cepa control, con el complejo de *E. coli* HpaBC + p423GPD produjo 0,025 mg·L⁻¹ de hidroxitirosol a partir de un medio completo, con glucosa y nutrientes precursores como la tirosina, tras 72 h de crecimiento en dicho medio. La misma cepa con la sobreexpresión de los distintos genes (*ARO4 K229L* (SEQ ID NO: 6), *ARO4* (SEQ ID NO: 9), *ARO3* (SEQ ID NO: 10), *ARO3 K222L* (SEQ ID NO: 11), *ARO7* (SEQ ID NO: 12), *ARO7 G141S* (SEQ ID NO: 13) y *ARO10* (SEQ ID NO: 14)) aumentó la producción de hidroxitirosol en todos los casos (Figura 1).

No obstante, la cepa con *ARO4* modificado con la sustitución K229L (*S. cerevisiae* HpaBC + *ARO4 K229L*) produjo una cantidad de hidroxitirosol muy superior a su versión silvestre, y también mayor a cualquiera de los otros genes probados, llegando a cantidades de hasta 6 mg·L⁻¹ (Figura 1 y Tabla 3).

La producción de hidroxitirosol por la cepa *S. cerevisiae* HpaBC + *ARO4 K229L* es 240

veces superior a la de la cepa control, indicando la sinergia ejercida entre ARO4 K229L y HpaBC. En cuanto a las modificaciones puntuales en los genes ARO3 y ARO7 no se observó un cambio significativo en la cantidad de hidroxitirosol producida bajo las condiciones de este ensayo.

5

	Hidroxitirosol
HpaBC+p423	0,025 ± 0,001
HpaBC+p423 ARO3	2,976 ± 1,384
HpaBC+p423 ARO3*	2,698 ± 0,479
HpaBC+p423 ARO4	1,341 ± 1,156
HpaBC+p423 ARO4*	6,003 ± 0,912
HpaBC+p423 ARO7	0,176 ± 0,035
HpaBC+p423 ARO7*	0,265 ± 0,188
HpaBC+p423 ARO10	2,016 ± 0,077

Tabla 3. Concentraciones en mg·L⁻¹ de hidroxitirosol producido por las cepas modificadas tras 72 h en medio SC - His. Se indica la desviación estándar de la medida de tres réplicas independientes.

10

EJEMPLO 2: PRODUCCIÓN DE HIDROXITIRO SOL CON ARO4 K229L

Los inventores han optimizado la producción de hidroxitirosol a partir de glucosa con la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante, la cepa *S. cerevisiae* HpaBC + ARO4 K229L, mediante la combinación de la integración múltiple en el genoma del complejo hidroxilasa HpaBC de *E. coli* (SEQ ID NO: 5), capaz de transformar el tirosol en hidroxitirosol, y la sobreexpresión de ARO4 de *S. cerevisiae* con la mutación puntual K229L (ARO4 K229L), igualmente mediante la integración en el genoma (SEQ ID NO: 8). Además, sobre esta misma cepa, se evaluó la producción de hidroxitirosol en un medio mínimo con 160 g·L⁻¹ de glucosa durante 295 h para determinar el tiempo óptimo para la producción de hidroxitirosol (Figura 5).

20

Materiales y Métodos

25 2.1. Construcción de plásmidos y cepas productoras de hidroxitirosol (HT)

Las secuencias de los genes *hpaB* (código ENA: CAA86048.1) (SEQ ID NO: 1) y *hpaC* (código ENA: CAA86049.2) (SEQ ID NO: 3) de *E. coli* fueron amplificadas con los cebadores *hpaB* BamHI F (SEQ ID NO: 39), *hpaB* XhoI R (SEQ ID NO: 40), *hpaC* BamHI (SEQ ID NO: 41) F y *hpaC* XhoI R (SEQ ID NO: 42) (Tabla 4) a partir de los plásmidos p426GPD-*hpaB* y p425GPD-*hpaC* (Tabla 5), construidos por *Muñiz-Calvo, et al., 2020*.

Para la modificación de un cambio de aminoácido en el gen *ARO4*, se procedió a la amplificación del gen *ARO4* (SEQ ID NO: 9) mediante PCR a partir del DNA genómico de la cepa de *S. cerevisiae* Sc288C, utilizando los cebadores *ARO4* F BamHI (SEQ ID NO: 25) y *ARO4* R XhoI (SEQ ID NO: 27) (Tabla 4). Estos cebadores incluyen colas que contienen la secuencia de reconocimiento de las enzimas de restricción *BamHI* y *XhoI*, las cuales se utilizaron para el clonaje de *ARO4* en el plásmido p426GPD (*Mumberg et al., 1995*), originando el plásmido p426GPD-*aro4* (Tabla 5). A partir del plásmido p426GPD-*aro4* se realizó mutagénesis dirigida por PCR (Figura 2), para generar una mutación puntual en la secuencia de *ARO4* utilizando los cebadores *ARO4* F BamHI (SEQ ID NO: 25) / *ARO4* R XhoI (SEQ ID NO: 27) / *ARO4* K229L F (SEQ ID NO: 28) / *ARO4* K229L R (SEQ ID NO: 26) (Tabla 4). En concreto, se produjo la sustitución de la secuencia AAG (codificante para el aminoácido lisina, K) por TTG (codificante para el aminoácido leucina, L) en la posición de nucleótido 685 de la secuencia de *ARO4* (SEQ ID NO: 9) obteniendo la secuencia *ARO4* K229L (SEQ ID NO: 6).

Cebador	Secuencia dirección 5'→3'
URA3 STOP F	TCGTTCCAATGTCAAGTTTCGATTTTCGAAAATCATTTAATTTAAACTTGCGCT CAATTCC (SEQ ID NO: 35)
URA3 STOP R	CATGTGTTTTTAGTAAACAAATTTTGGGACCTAATGCTTCGGAATTGAGCGCA AGTTTTA (SEQ ID NO: 36)
LEU2 STOP F	TCGTTCCAATGTCAAGTTTCGATTTTCGAAAATCATTTAATTTAAACTTGCGCT CAATTCC (SEQ ID NO: 37)
LEU2 STOP R	AAAACGGCATCAGCCTTCTTGGAGGCTTCCAGCGCCTCATGGAATTGAGCG CAAGTTTTA (SEQ ID NO: 38)

ES 2 912 603 A1

hpaB BamHI F	AGGTCGTGGGATCCCCATGAAACCAGAAGATTTCCG (SEQ ID NO: 39)
hpaB XhoI R	CCGCTCGAGTTATTTTCAGCAGCTTATCCAGC (SEQ ID NO: 40)
hpaC BamHI F	AGGTCGTGGGATCCCCATGCAATTAGATGAACAACGC (SEQ ID NO: 41)
hpaC XhoI R	CCGCTCGAGTTAAATCGCAGCTTCCATTTCC (SEQ ID NO: 42)
ARO4 F BamHI	GTCGTGGGATCCAAATGAGTGAATCTCCAATGTTTCGCTGCCAAC (SEQ ID NO: 25)
ARO4 K229L R	GCAGCAACACCATGCAAAGTAACACCCATG (SEQ ID NO: 26)
ARO4 R XhoI	CCGCTCGAGCTATTTCTTGTTAACTTCTCTTCTTTGTCTGACAGC (SEQ ID NO: 27)
ARO4 K229L F	CATGGGTGTTACTTTGCATGGTGTGCTGC (SEQ ID NO: 28)
GV1R (HpaC)	CGTGCGAUTTAAATCGCAGCTTCCATTTCC (SEQ ID NO: 43)
GP1F (HpaC)	AGTGCAGGUAAAACAATGCAATTAGATGAACAACGC (SEQ ID NO: 44)
PG1R(TEF1p)	ACCTGCACUTTTGTAATTAATACTTAGATTAGATTGCTAT (SEQ ID NO: 45)
PG2R (PGK1p)	ATGACAGAUTTGTTTTATATTTGTTGTAATAAGTAGATAATT (SEQ ID NO: 46)
GP2F (HpaB)	ATCTGTCAUAAAACAATGAAACCAGAAGATTTCCG (SEQ ID NO: 47)
GV2R(HpaB)	CACGCGAUTTATTTTCAGCAGCTTATCCAGC (SEQ ID NO: 48)
PV2F (GPDp)	CGTGCGAUAGTTTATCATTATCAATACTCGCC (SEQ ID NO: 49)
GV2R (ARO4)	CACGCGAUCTATTTCTTGTTAACTTCTCTTCTTTGTCT (SEQ ID NO: 50)
ADH1_test_fw	GAAATTCGCTTATTTAGAAGTGTC (SEQ ID NO:51)
CYC1_test_rv	CTCCTTCCTTTTCGGTTAGAG (SEQ ID NO: 52)
X-3903 Up	TGACGAATCGTTAGGCACAG (SEQ ID NO: 53)
2221	GTTGACACTTCTAAATAAGCGAATTC (SEQ ID NO: 54)
2220	CCTGCAGGACTAGTGCTGAG (SEQ ID NO: 55)
X-3904 Down	CCGTGCAATACCAAAATCG (SEQ ID NO: 56)

Tabla 4. Cebadores utilizados para la obtención de cepas de levadura modificadas genéticamente para la producción de hidroxitirosol.

Plásmidos	Descripción	Marcador de selección
p425GPD-hpaC	p425GPD con el gen <i>hpaC</i> de <i>E. coli</i>	LEU2
p426GPD-hpaB	p426GPD con el gen <i>hpaB</i> de <i>E. coli</i>	URA3
p426GPD-aro4	p426GPD con el gen <i>aro4</i> de <i>S. cerevisiae</i>	URA3
p426GPD-aro4*	p426GPD con el la variante K229L de ARO4 de <i>S. cerevisiae</i>	URA3
pWS173 URA3 target	Plásmido CRISPR/Cas9 con la diana de secuencia ATTGGATGTTTCGTACCACCAAGG (SEQ ID NO: 57)	G418
pWS174 URA3 target	Plásmido CRISPR/Cas9 con la diana de secuencia (GGTGCTGCTATCGATGCTACAGG) (SEQ ID NO: 58)	Nourseotricina
pCfB2988 HpaBC	Plásmido de sobreexpresión en levadura mediante la integración múltiple de TEF1p::EchpaC PGK1p::EchpaB.	-loxP--KIURA3--degron
pCfB257 ARO4*	Plásmido de sobreexpresión en levadura mediante la integración simple de GPDp::ScARO4K229L	-LoxP-KILEU2
pCfB2628	Plásmido que contiene el promotor dual PGK1p-TEF1p	AmpR

Tabla 5. Plásmidos utilizados para la obtención de cepas de levadura modificadas genéticamente para la producción de hidroxitirosol.

Para la construcción de los plásmidos de integración pCfB2988 HpaBC y pCfB257 ARO4* se procedió al ensamblaje de los mismos mediante la técnica de clonaje conocida como USER (reacción de escisión específica de uracilo). Para ello, se

- amplificaron mediante PCR los siguientes “biobricks”: hpaB (SEQ ID NO:1), hpaC (SEQ ID NO:3), promotor dual TEF1-PGK1 (SEQ ID NO: 17) y GPDp-ARO4* (SEQ ID NO: 18). Para la amplificación de dichos “biobricks”, se utilizaron cebadores que contenían uracilos y la ADN polimerasa *Phusion U Hot Start* (Thermo Scientific). Los cebadores
- 5 empleados para la amplificación de los “biobricks” fueron: GP2F (HpaB) (SEQ ID NO: 47), GV2R (HpaB) (SEQ ID NO: 48), GV1R (HpaC) (SEQ ID NO: 43), GP1F (HpaC) (SEQ ID NO: 44), PG1R (TEF1p) (SEQ ID NO: 45), PG2R (PGK1p) (SEQ ID NO: 46), PV2F (GPDp) (SEQ ID NO: 49) y GV2R (ARO4) (SEQ ID NO: 50) (Tabla 4).
- 10 Para ensamblar el complejo HpaBC en el plásmido pCfB2988 se amplificaron tres secuencias o “biobricks”, una conteniendo HpaC (SEQ ID NO: 6), otra conteniendo HpaB (SEQ ID NO: 5) y una tercera (SEQ ID NO: 17) conteniendo dos promotores constitutivos fuertes PGK1p (SEQ ID NO: 15) y TEF1p (SEQ ID NO: 16) amplificados a partir de los plásmidos construidos previamente p425GPD-hpaC, p426GPD-hpaC y
- 15 pCfB2628, respectivamente (*Muñiz-Calvo, et al., 2020; Germann et al., 2016*) (Tabla 5). Para ello se usaron los cebadores GV1R (HpaC) (SEQ ID NO: 43) /GP1F (HpaC) (SEQ ID NO: 44) / PG1R(TEF1p) (SEQ ID NO: 45) / PG2R (PGK1p) (SEQ ID NO: 46) / GP2F (HpaB) (SEQ ID NO: 47) / GV2R(HpaB) (SEQ ID NO: 48) (Tabla 4).
- 20 Para ensamblar el *ARO4* modificado en el pCfB257, tras la mutagénesis dirigida se construyó el plásmido p426GPD-ARO4* (Tabla 5) (Figura 2), a partir del cual se amplificó tanto el promotor como la secuencia de ARO4 mutado con los cebadores PV2F (GPDp) (SEQ ID NO: 49) / GV2R (ARO4) (SEQ ID NO: 50) (Tabla 4), obteniéndose así el “biobrick” GPDp-ARO4* (SEQ ID NO: 18).
- 25 En paralelo, los vectores pCfB2988 y pCfB257 empleados (*Jensen et al., 2014 y Maury et al., 2016*) se prepararon mediante tratamiento secuencial con las enzimas *AsiSI* (SfaAI) (Thermo Fisher Scientific) y *BsmI* (New England Biolabs). Después de la purificación, los vectores preparados y las secuencias amplificadas se mezclaron y
- 30 trataron con la enzima USER™ (New England Biolabs) y tras la reacción, la mezcla se utilizó directamente para la transformación bacteriana obteniéndose pCfB2988 HpaBC y pCfB257ARO4* (Tabla 5) (Figura 3). La correcta construcción de los plásmidos pCfB2988 HpaBC y pCfB257ARO4* se confirmó mediante secuenciación Sanger utilizando los cebadores ADH1_test_fw (SEQ ID NO: 51) y CYC1_test_rv (SEQ ID NO:
- 35 52) (Tabla 4).

El plásmido pCfB2988 HpaBC, es un vector que permite integraciones múltiples del complejo HpaBC en sitios que comparten homología con los elementos Ty1, los cuales están distribuidos ampliamente por todo el genoma de la levadura. Por otra parte, el plásmido pCfB257ARO4* se integra de forma sencilla en la localización X-3 del cromosoma 10, la cual ha sido previamente seleccionada por presentar un buen nivel de expresión génica, tener un riesgo mínimo de reordenamientos espontáneos y no afectar el crecimiento de la cepa modificada mediante inserción en dicho lugar (*Maury et al., 2016*).

10

Para poder integrar el casete génico *HpaBC* (SEQ ID NO: 5), así como el casete génico con el gen *ARO4* mutado (SEQ ID NO: 8) (Figura 3), se generó una cepa vínica auxótrofa para los genes *URA3* y *URA3+LEU2* utilizando los plásmidos CRISPR/Cas9 pWS173 y pWS174 (tabla 5) para interrumpir la traducción de dichos genes introduciendo un codón de parada prematuro, mediante los cebadores URA3 STOP F (SEQ ID NO: 35), URA3 STOP R (SEQ ID NO: 36), LEU2 STOP F (SEQ ID NO: 37) y LEU2 STOP R (SEQ ID NO: 38) (Tabla 4).

15

Para la integración de las modificaciones anteriormente comentadas en la cepa, tras la comprobación de la correcta construcción de los vectores pCfB2988 HpaBC y pCfB257 ARO4* mediante secuenciación Sanger, se amplificaron ambos vectores para la extracción de los casetes génicos, mediante la digestión de ambos plásmidos con la enzima de restricción *NotI* y purificación por columna, previo a la transformación de la levadura (Figura 3). En la tabla 5 se muestra la información de ambos plásmidos.

20

Para la transformación de *S. cerevisiae* se utilizó el protocolo de transformación de acetato de litio descrito por *Gietz et al., 2004*, en el que las células son incubadas en presencia de acetato de litio, polietilenglicol, DNA "carrier" y el plásmido de interés y sometidas a un choque térmico de 42°C durante 20 minutos. Posteriormente, las células se siembran en los diferentes medios de selección y se incuban a 30°C durante 2 o 3 días.

25

La correcta integración de las secuencias fue confirmada mediante PCR de colonia utilizando los cebadores (hpaC BamHI F (SEQ ID NO: 41) / hpaC XhoI R (SEQ ID NO: 42)) para HpaBC y las parejas (X-3903 Up (SEQ ID NO: 53) / 2221 (SEQ ID NO: 54)) o

30

(2220 (SEQ ID NO: 55) / X-3904 Down (SEQ ID NO: 56)) para ARO4*(Tabla 4).

La cepa originada tras la integración del casete génico obtenido de la digestión con *NotI* del pCfB2988 HpaBC se identifica como “cepa HpaBC”. La cepa originada tras la
 5 integración en la cepa HpaBC del casete génico obtenido de la digestión con *NotI* del pCfB257ARO4* se identifica como “cepa HpaBC + ARO4K229L” (Figura 3).

2.2. Condiciones de crecimiento y preparación de las muestras

10 Para determinar la producción de hidroxitirosol, las cepas vínicas modificadas HpaBC y HpaBC + ARO4K229L fueron inoculadas en 5 mL de medio mínimo toda la noche a 28° C en agitación. La composición de este medio se especifica en la tabla 6.

A la mañana siguiente, se inoculó el cultivo en medio fresco en una proporción 1/100 y
 15 se creció en medio mínimo en matraces tipo Erlenmeyer con una proporción de volumen de medio / volumen total de 1/5. Este cultivo se incubó en agitación constante a 28° C, y tras 120 h de crecimiento se tomó muestra para analizar por HPLC-PDA. Las muestras se diluyeron al 50% con metanol absoluto de calidad de HPLC y fueron filtradas con filtros de nylon de 0,22 µm previamente a la inyección en el cromatógrafo.

20 Para determinar la producción de hidroxitirosol con la cepa vínica modificada HpaBC + ARO4K229L bajo condiciones óptimas de cultivo se modificó la concentración de glucosa del medio mínimo testando un rango amplio desde 20 hasta 300 g·L⁻¹. El tiempo de cultivo también se modificó a la luz de los resultados obtenidos en el ejemplo 1,
 25 tomando muestra a tiempos 220, 240 y 315 h.

Para evaluar el efecto del tiempo en la producción de hidroxitirosol la cepa de laboratorio con HpaBC integrado en su genoma (*S. cerevisiae* HpaBC) y transformada con el plásmido p423GPD-aro4* fue inoculada en 5 mL de medio mínimo suplementado con
 30 leucina (380 mg L⁻¹) toda la noche a 28° C en agitación. La composición de este medio se especifica en la Tabla 6. A la mañana siguiente se inocularon 500 µL de cultivo crecido en 50 mL de medio mínimo fresco con 160 g·L⁻¹ de glucosa y suplementado con leucina en matraces de 250 mL de capacidad. Este cultivo se incubó en agitación constante a 28° C y tras 120, 144, 168, 197, 223, 247 y 295 h de crecimiento se tomaron
 35 muestras para analizar mediante HPLC-PDA (Figura 5). Las muestras se diluyeron al

50% con metanol absoluto de calidad de HPLC y fueron filtradas con filtros de nylon de 0,22 μm previamente a la inyección en el cromatógrafo.

Medio mínimo	
Glucosa	*20-300 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos ni sulfato de amonio (Difco™)	1,7 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
Sulfato de amonio	5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

Tabla 6. Composición del medio mínimo utilizado para la producción de hidroxitirosol.

5 *Las concentraciones de glucosa empleadas fueron 20, 80, 160, 200, 250 y 300 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, como se menciona anteriormente.

2.3. Detección y cuantificación de hidroxitirosol mediante cromatografía líquida

10 El hidroxitirosol producido se detectó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) en un cromatógrafo Waters ACQ Arc Sys Core usando una columna Accucore™ C18 (Thermo Scientific) de fase reversa, de dimensiones 4,6 × 150 mm y 2,6 μm de tamaño de partícula. Las fases móviles empleadas fueron A (acetonitrilo) y B (0.01% ácido trifluoroacético en agua) con un flujo constante de 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, el volumen de
 15 inyección fue de 10 μL y el programa de gradientes se ajustó como sigue: flujo inicial de 0:100 % (A:B), 18 min 10:90 % (A:B), 19-27 min 25:75 % (A:B), 28-31 min 100:0 % (A:B) y 39 min 0:100 % (A:B). La detección de analitos tuvo lugar en un detector de matriz de diodos 2998 PDA donde se extrajo el cromatograma correspondiente a la absorbancia a $\lambda = 210 \text{ nm}$. El tiempo de retención para el hidroxitirosol fue 9,366 min y de 13,112 min
 20 para el tirosol.

Resultados

La cepa de *S. cerevisiae* con el complejo de *E. coli* HpaBC produjo aproximadamente
 25 0,3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de hidroxitirosol desde glucosa en un medio simple tras 120 h de crecimiento en dicho medio. Al modificar dicha cepa con la sobreexpresión del gen ARO4 modificado con la sustitución K229L produjo un aumento de más de 26 veces la producción de hidroxitirosol respecto a la cepa con solo HpaBC, superando los 8,5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figura 4 y Tabla 7). Del mismo modo que ocurre con el hidroxitirosol, la sobreexpresión de la

variante ARO4 K229L, produjo un aumento de alrededor de 30 veces de la síntesis de tirosol, llegando a superarse los 200 mg·L⁻¹ (Figura 4 y Tabla 7).

	Tirosol	Hidroxitirosol
HpaBC	6.908 ± 0.787	0.331 ± 0.042
HpaBC+ARO4K229L	199.608 ± 3.009	8.801 ± 0.050

- 5 **Tabla 7.** Concentraciones en mg·L⁻¹ de tirosol e hidroxitirosol producido por las cepas modificadas tras 120 h en medio mínimo con 160 g·L⁻¹ de glucosa.

Por otra parte, la producción de hidroxitirosol por la cepa *S. cerevisiae* HpaBC + ARO4 K229L en medio mínimo con 160 g·L⁻¹ de glucosa y suplementado con leucina (380 mg L⁻¹) superó los 350 mg·L⁻¹ a partir de las 223 h de crecimiento, sin mostrar un gran aumento a tiempos posteriores (Figura 5). Teniendo en cuenta estos resultados se estableció un tiempo óptimo de producción en torno a las 220h de crecimiento. En estas condiciones de concentración de glucosa y tiempo de cultivo, la producción de hidroxitirosol por la cepa *S. cerevisiae* HpaBC + ARO4 K229L es 42 veces superior a la de la cepa control, poniendo de manifiesto el impacto de la concentración de glucosa y el tiempo de incubación en la producción de HT.

20 Cuando se testó la concentración de glucosa óptima y el tiempo de cultivo, con esta misma cepa de *S. cerevisiae*, produjo más de 17 mg·L⁻¹ de hidroxitirosol tras 220 h de crecimiento en medio mínimo con 300 g·L⁻¹ de glucosa (Figura 6 y Tabla 8).

	Hidroxitirosol
220 h	17.21 ± 1.871
240 h	17.804 ± 1.833
315 h	18.094 ± 1.814

Tabla 8. Concentraciones en mg·L⁻¹ de hidroxitirosol producido por la cepa modificada tras 220, 240 y 315 h en medio mínimo con 300 g·L⁻¹ de glucosa.

25

REIVINDICACIONES

1. Una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante que comprende las siguientes secuencias de nucleótidos:

5 (i) las secuencias de nucleótidos que codifican el complejo enzimático hidroxilasa HpaBC de *Escherichia coli* o un fragmento de las mismas, y

(ii) la secuencia de nucleótidos que codifica para la enzima ARO4 de *Saccharomyces cerevisiae* que comprende la sustitución de K (lisina) por L (leucina) en la posición 229 (ARO4 K229L) o un fragmento de la misma;

10 en donde la secuencia de nucleótidos (ii) está sobreexpresada con respecto a una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* no recombinante.

2. La cepa según la reivindicación 1 donde las secuencias de nucleótidos que codifican para el complejo enzimático hidroxilasa HpaBC comprenden las secuencias de nucleótidos que presentan una identidad de, al menos, un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 15 98, 99% con las secuencias de nucleótidos SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 3.

3. La cepa según la reivindicación 1 o 2 donde el complejo enzimático hidroxilasa HpaBC comprende las secuencias de aminoácidos que presentan una identidad de secuencia de, al menos, un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% con las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4. 20

4. La cepa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde las secuencias de nucleótidos que codifican para el complejo enzimático hidroxilasa HpaBC comprenden las secuencias de nucleótidos que presentan una identidad de secuencia del 100% con la secuencia SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 3. 25

5. La cepa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en donde la secuencia de nucleótidos que codifica para la enzima ARO4 K229L de *Saccharomyces cerevisiae* comprende una secuencia de nucleótidos que presenta una identidad de secuencia de, al menos, un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% con la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 6. 30

6. La cepa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en donde la enzima ARO4 K229L de *Saccharomyces cerevisiae* comprende una secuencia de aminoácidos que 35

presenta una identidad de secuencia de, al menos, un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99% con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7.

5 7. La cepa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en donde la secuencia de nucleótidos que codifica para la enzima ARO4 K229L de *Saccharomyces cerevisiae* comprende una secuencia de nucleótidos que presenta una identidad de secuencia del 100% con la secuencia SEQ ID NO: 6.

10 8. Una composición que comprende una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

9. Un método para producir hidroxitirosol que comprende:

15 (a) cultivar al menos una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o una población que comprende una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en un medio de cultivo que comprende al menos una fuente de carbono y una fuente de nitrógeno, y
(b) purificar el hidroxitirosol obtenido durante la etapa (a).

20 10. El método según la reivindicación 9 en donde la fuente de carbono es glucosa y/o la fuente de nitrógeno es amonio.

25 11. El método según la reivindicación 10 en donde el medio de cultivo comprende glucosa en una concentración entre 1 y 400 gramos de glucosa por litro de medio de cultivo.

30 12. El método según la reivindicación 11 en donde el medio de cultivo comprende glucosa en una concentración entre 100 y 300 gramos de glucosa por litro de medio de cultivo, más preferiblemente 150 o 160 gramos de glucosa por litro de medio de cultivo.

13. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12 en donde la etapa (a) se lleva a cabo a una temperatura entre 25 y 35°C durante entre 100 y 150 horas en condiciones de agitación.

35 14. El método según la reivindicación 13 en donde la temperatura es 28°C.

15. El método según la reivindicación 13 o 14 en donde la etapa (a) se lleva a cabo durante 120 horas.
- 5 16. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15 en donde la purificación del hidroxitirosol de la etapa (b) se lleva a cabo con una disolución de metanol.
- 10 17. El método según la reivindicación 16 en donde además la purificación del hidroxitirosol de la etapa (b) se lleva a cabo mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).
- 15 18. Uso de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o de la composición según la reivindicación 8 para la producción de hidroxitirosol.

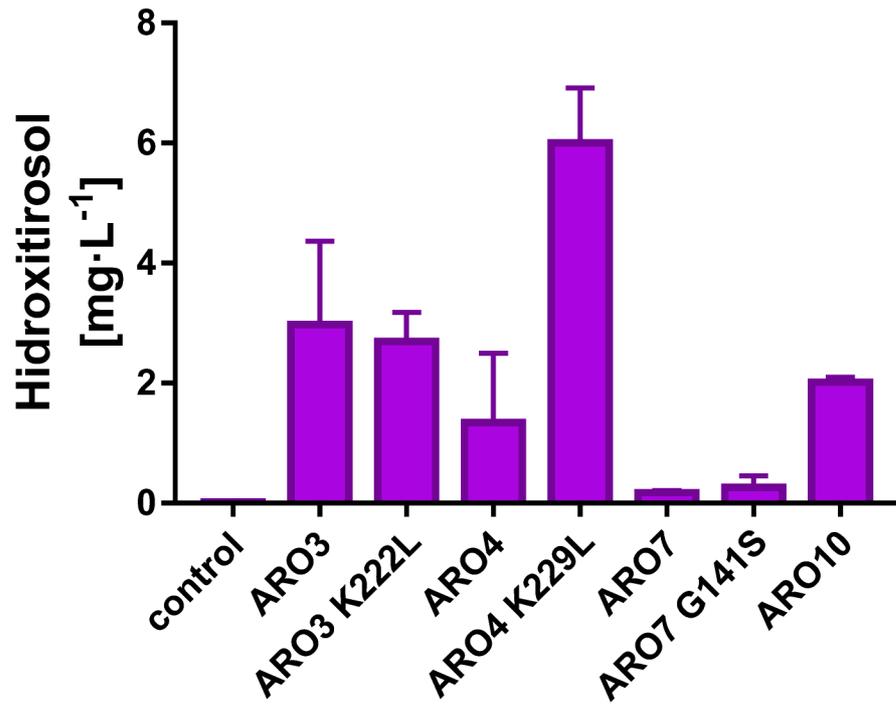


Fig. 1

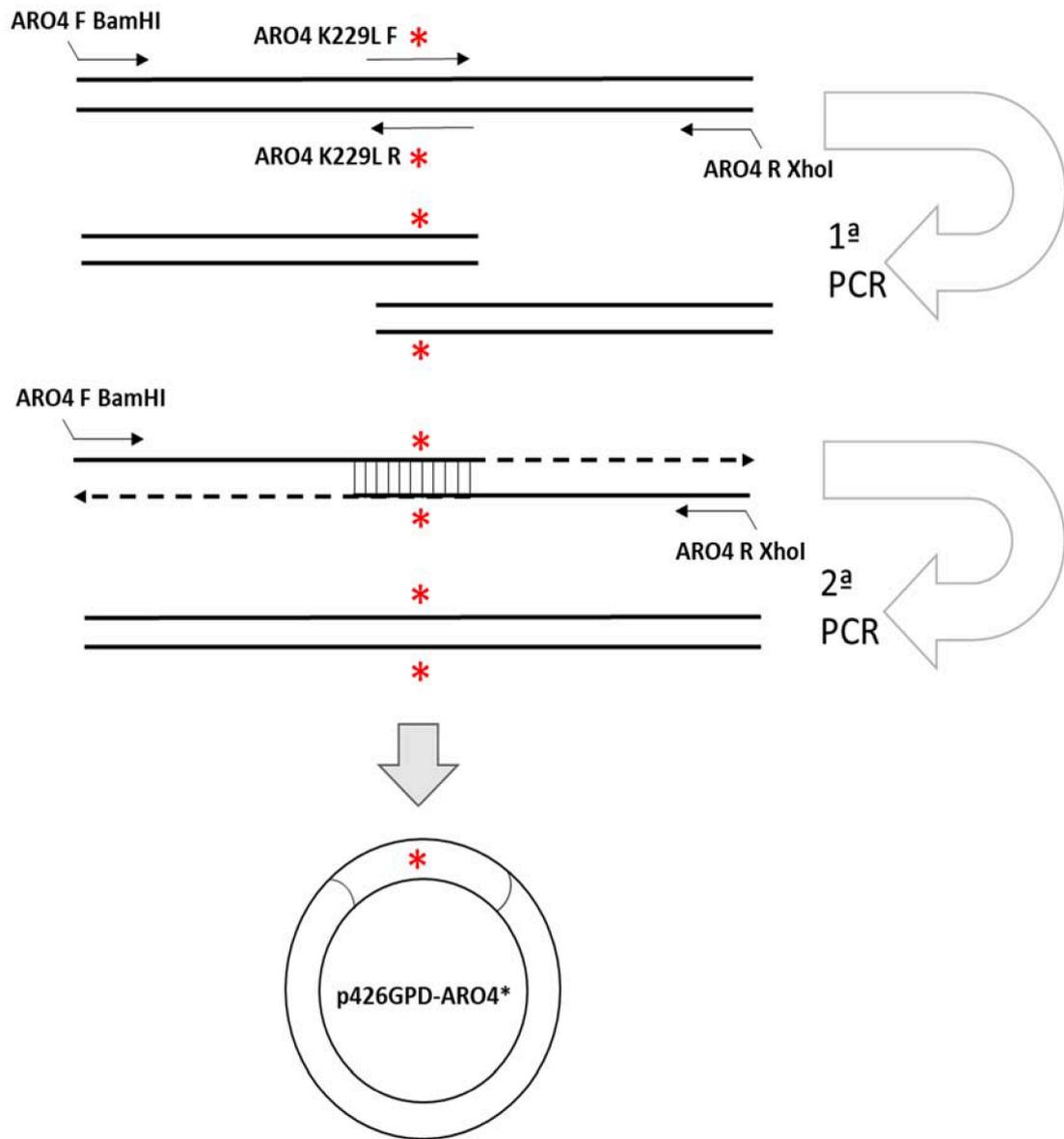


Fig. 2

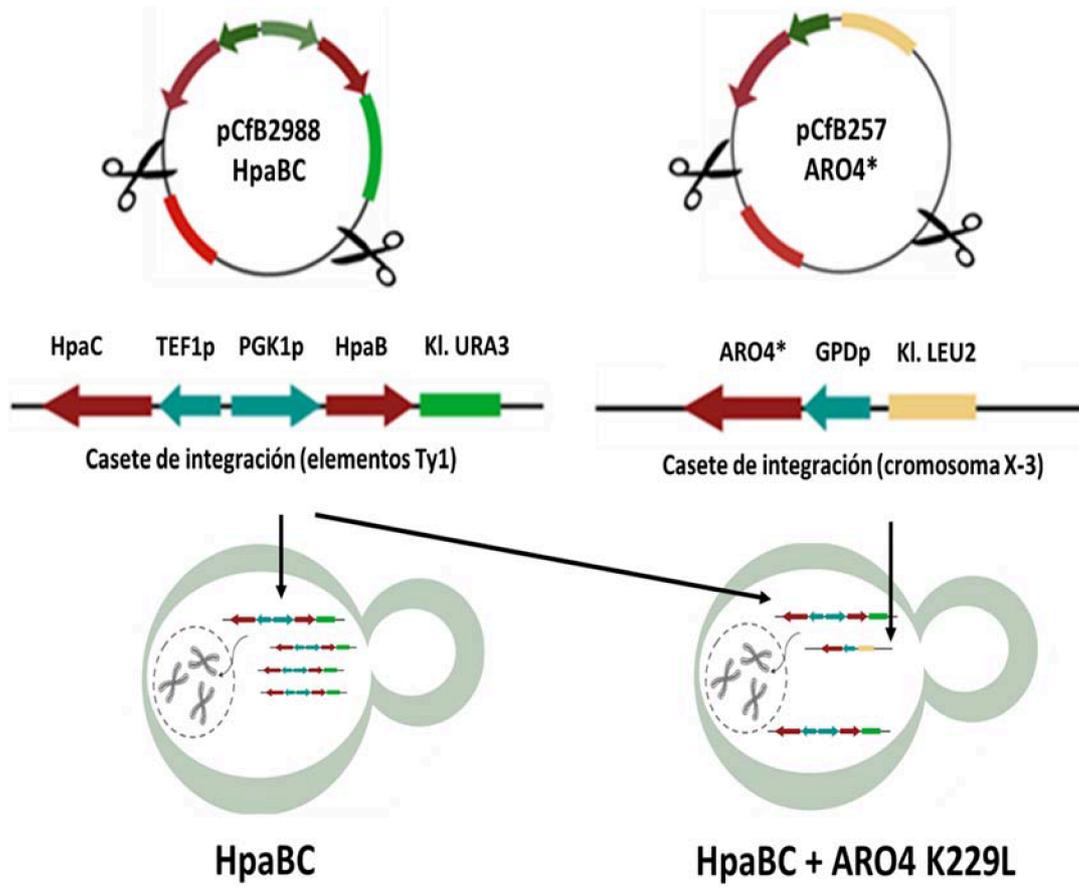


Fig. 3

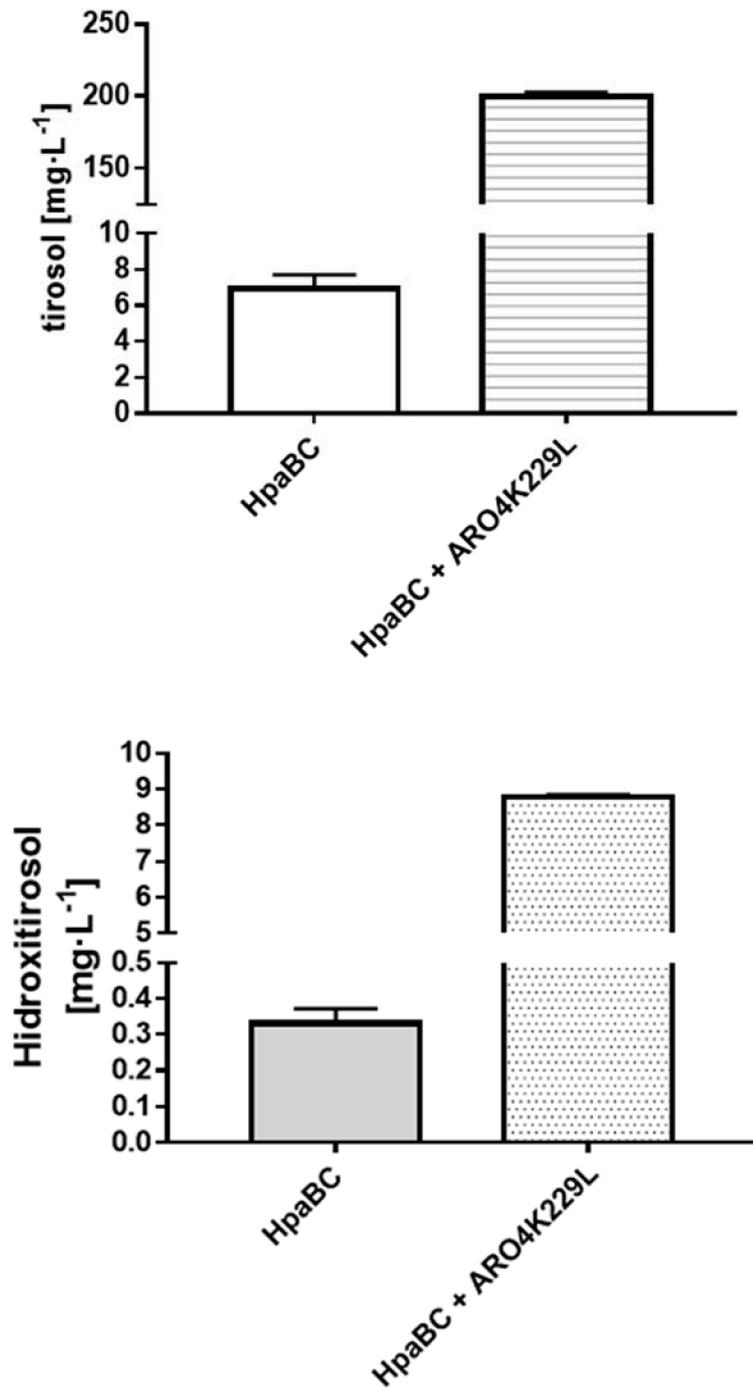


Fig. 4

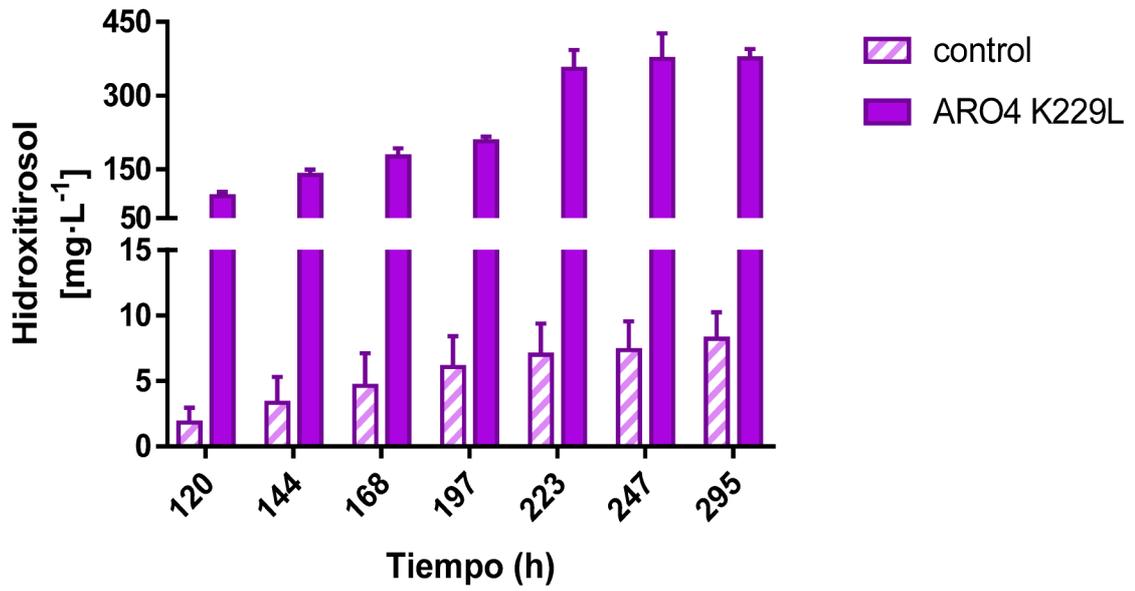


Fig. 5

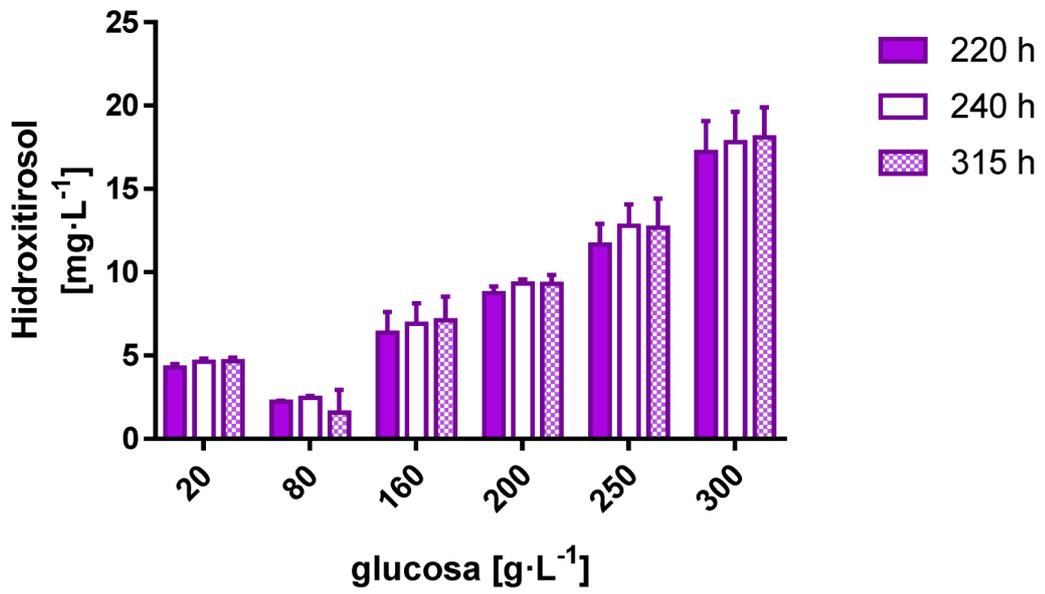


Fig. 6



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

21 N.º solicitud: 202031186

22 Fecha de presentación de la solicitud: 26.11.2020

32 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. ci.: **C12N1/19** (2006.01)
C12R1/865 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	MUÑIZ-CALVO, SARA et al. "Overproduction of hydroxytyrosol in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> by heterologous overexpression of the Escherichia coli 4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase". FOOD CHEMISTRY, 15/10/2019, Vol. 58, N.º 308, Páginas 1-5 [en línea][recuperado el 26/08/2021]. Recuperado de Internet <URL: http://www.journals.elsevier.com/food-chemistry/#description >, ISSN 1096-7176, <DOI: doi: 10.1016/j.ymben.2019.08.008>. todo el documento.	1-18
A	CAO MINGFENG et al. "Building microbial factories for the production of aromatic amino acid pathway derivatives: From commodity chemicals to plant-sourced natural products". METABOLIC ENGINEERING, 20190810 ACADEMIC PRESS, US. Alper Hal, 10/08/2019, Vol. 58, Páginas 94 - 132 [en línea][recuperado el 27/08/2021]. , ISSN 1096-7176, <DOI: doi:10.1016/j.ymben.2019.08.008>. (ver punto 7.2).	1-18
A	CN 110499260 A (CHENGDU WEIHE BIOTECHNOLOGY CO LTD) 26/11/2019, (ver resumen y reivindicaciones).	1-18
A	CN 104805110 A (TIANJIN INST IND BIOTECHNOLOGY CAS) 29/07/2015, (ver resumen).	1-18
A	CN 107586794 A (UNIV BEIJING CHEM TECH) 16/01/2018, (ver reivindicaciones).	1-18
A	WO 2008064837 A2 (DSM IP ASSETS BV et al.) 05/06/2008, ver secuencias SEQ ID NO: 5 y 7.	1-18

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe
01.09.2021

Examinador
M. d. García Coca

Página
1/2

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12N, C12R

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE/NLM, EMBASE/Elsevier, Compendex/EI, EMBL-EBI, XPESP y Bases de Datos TXT