



Q

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

INVENTARIO

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

08-125171

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO "PRODUCCION DE ISOPRENÓIDES"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE AMYRIS BIOTECHNOLOGIES, INC.

DOMICILIO ENERGYVILLE, CALIFORNIA, ESTADOS
UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO HUMBERTO RUBIO CANACHO
COD 4134

22. BOGOTÁ, D. C., 25 DE NOVIEMBRE / 2008



No. 08-125171- -00000-0000

Fecha: 2008-11-25 12:07:06 Dep: 2020 NULCREACIONE
Tra: 11 PATENTEIYI Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 230

PETITORIO

26 de 2008

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I

Capítulo II

SOLICITANTE Nombre y **AMYRIS BIOTECHNOLOGIES, INC.**
(71) Dirección: **5980 Horton Street, Suite 450,**
Emeryville, California 94608, Estados Unidos de América
Lugar de
Constitución: **Emeryville, California, Estados Unidos de América**

REPRESENTANTE Nombre: **HUMBERTO RUBIO CAMACHO** IDENTIFICACIÓN
O APODERADO Dirección: **Carrera 7 No. 74 - 64, Of. 506** C.C. **17'192.062**
(74) Teléfono: **3132408** Fax: **3131647** T.P. **50.007 CSJ**

INVENTOR(ES) Nombre y 1) **Neil Stephen RENNINGER**
(72) Dirección: **4058 Lyman Road,**
Oakland, California 94602, Estados Unidos de América
2) **Jack NEWMAN**
1715 Sacramento Street,
Berkeley, California 94702, Estados Unidos de América
3) **Keith Kinhead REILING**
3534 Rhoda Avenue,
Oakland, California 94602, Estados Unidos de América
4) **Rika REGENTIN**
25409 Modoc Court,
Hayward, California 94542, Estados Unidos de América
5) **Christopher John PADDON**
1046 Banyan Way,
Pacific, California 94044, Estados Unidos de América

PCT (86)

Solicitud Internacional No. **PCT/US2007/069807** Fecha **25 DE MAYO DE 2007**
Publicación Internacional No. **WO 2007/140339** Fecha **6 DE DICIEMBRE DE 2007**

TÍTULO (54) "PRODUCCIÓN DE ISOPRENOIDES"

Clasificación Internacional (51)

Prioridad	(33) País de origen	(32) Fecha	(31) Número de solicitud
SI ☒ NO	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	26 DE MAYO DE 2006	60/808,989
	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA	18 DE DICIEMBRE DE 2006	60/870,592

Comprobante de pago No. **08-88,271** Fecha: **10 DE NOVIEMBRE DE 2008**

Bap

**EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION
DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL**

(21) No. SOLICITUD: (51) INT. CL.:
(22) FECHA DE PRESENTACIÓN: (71) SOLICITANTE: AMYRIS BIOTECHNOLOGIES, INC.

(30) PRIORIDAD: ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

(31) No. DE SOLICITUD: 60/808,989 (72) INVENTORES: Neil Stephen RENNINGER
60/870,592 Jack NEWMAN
Keith Kinkead REILING
(32) FECHA DE PRESENTACIÓN: 26 DE MAYO DE 2006 Rika REGENTIN
18 DE DICIEMBRE DE 2006 Christopher John PADDON

(33) PAÍS: (74) APODERADO: Humberto RUBIO CAMACHO

Solicitud Internacional No. PCT/US2007/069807 Fecha 25 DE MAYO DE 2007

Publicación Internacional No. WO 2007/140339 Fecha 6 DE DICIEMBRE DE 2007

(31) FECHA ENTRADA EN FASE NACIONAL:

(54) TITULO: "PRODUCCIÓN DE ISOPRENOIDES"

RESUMEN:

Un método para producir un isoprenoide, caracterizado porque comprende:

- (a) obtener una pluralidad de células huésped que comprenden una ruta enzimática para elaborar isopentenil pirofosfato y en donde todas las enzimas de ruta están bajo el control de un regulador transcripcional heterólogo y (b) cultivar las células huésped en un medio, bajo condiciones que son sub-óptimas en comparaciones con las condiciones que proporcionarían una velocidad de crecimiento específica máxima para las células huésped.

ANEXOS

- X** Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
Poderes, si fuere el caso.
Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
Declaraciones
- X** Copia de la publicación PCT
Copia informe búsqueda internacional.
Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- X** Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
Copia del informe del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional (IPEA). (Incluye modificaciones)
Traducción de los anexos del examen preliminar internacional.
Copia de las modificaciones efectuadas de acuerdo con el Artículo 28 PCT en Fase Nacional.
De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
Arte final 12 x 12
De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- X** Otros. **Listado de secuencias**

(11) Figura característica:

(12)

HUMBERTO RUBIO CAMACHO

FIRMA



C.C.

17'192.062 de Bogotá

T.P.

50.007 Consejo Superior de
La Judicatura

**PARA USO EXCLUSIVO DE
HUMBERTO RUBIO & CIA. LTDA.**

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 88,271
FECHA : NOVIEMBRE 10 DE 2008

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-125171- -00000-0000

Fecha: 2008-11-25 12:07:06 Dep: 2020 NULCORLACION
Tra: 11 PATENTE/II Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 230

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
HUMBERTO RUBIO & CIA ABOG	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	102219740	10/11/2008	2,844,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
		TOTAL :	\$ 501,000.00

SON: QUINIENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
6 December 2007 (06.12.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/140339 A2

(51) International Patent Classification:
C12P 7/04 (2006.01)

(74) Agents: **REAMEY, Robert, H.** et al.; Wilson Sonsini
Goodrich & Rosati, 650 Page Mill Road, Palo Alto, CA
94304-1050 (US).

(21) International Application Number:
PCT/US2007/069807

(22) International Filing Date: 25 May 2007 (25.05.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/808,989 26 May 2006 (26.05.2006) US
60/870,592 18 December 2006 (18.12.2006) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **AMYRIS
BIOTECHNOLOGIES, INC.** [US/US]; 5980 Horton
Street, Suite 450, Emeryville, CA 94608 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **RENNINGER,
Neil, Stephen** [US/US]; 4058 Lyman Road, Oakland, CA
94602 (US). **NEWMAN, Jack** [US/US]; 1715 Sacra-
mento Street, Berkeley, CA 94702 (US). **REILING,
Keith, Kinkead** [US/US]; 3534 Rhoda Avenue, Oakland,
CA 94602 (US). **REGENTIN, Rika** [US/US]; 25409
Modoc Court, Hayward, CA 94542 (US). **PADDON,
Christopher, John** [US/US]; 1046 Banyan Way, Pacifica,
CA 94044 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN,
IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO,
RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— without international search report and to be republished
upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: PRODUCTION OF ISOPRENOIDS

(57) Abstract: The present invention provides methods for a robust production of isoprenoids via one or more biosynthetic path-
ways. The invention also provides nucleic acids, enzymes, expression vectors, and genetically modified host cells for carrying out
the subject methods. The invention also provides fermentation methods for high productivity of isoprenoids from genetically mod-
ified host cells.

WO 2007/140339 A2

PRODUCCION DE ISOPRENOIDES

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los isoprenoides son obicuos por naturaleza. Comprenden una diversa familia de más de 40,000 productos
5 individuales, muchos de los cuales son vitales a los organismos
vivientes. Los isoprenoides sirven para mantener la fluidez
celular, transporte de electrones y otras funciones
metabólicas. Un vasto número de isoprenoides naturales y
sintéticos son útiles como farmacéuticos, cosméticos, perfumes,
10 pigmentos y colorantes, fungicidas, antisépticos, nutracéuticos
e intermediarios químicos finos.

Un producto de isoprenoide está compuesto comúnmente
de cinco unidades de difosfato de isopentil carbono (IPP)
repetitivas, aunque se han reportados isoprenoides y
15 politerpenos irregulares. En la naturaleza, los isoprenoides
son sintetizados mediante condensaciones consecutivas de su IPP
precursor y su isómero de pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP).
Dos rutas para estos precursores son conocidas. Los
eucariontes, con la excepción de plantas, utilizan en general
20 la mevalonato-dependiente (MEV) para convertir acetyl coenzima
A (acetyl-CoA) a IPP, que es isomerizado subsecuentemente a
DMAPP. Los procariontes, con algunas excepciones, emplean
comúnmente solo la ruta mevalonato-independiente o
desoxixilulosa-5-fosfato (DXP) para producir IPP y DMAPP. Las
25 plantas usan tanto como la ruta MEV y la ruta DXP. Véase Rohmer

et al. (1993) *Biochem. J.* 295:517-524; Lange et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(24):13172-13177; Rohdich et al. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:1158-1163.

Tradicionalmente, los isoprenoides han sido
5 manufacturados mediante extracción de fuentes naturales tales
como plantas, microbios y animales. Sin embargo, el rendimiento
por medio de extracción es usualmente muy bajo debido a un
número de profundas limitaciones. En primer lugar, la mayoría
de los isoprenoides se acumulan en la naturaleza en solamente
10 pequeñas cantidades. En segundo lugar, los organismos fuente en
general no son propensos al cultivo a gran escala que es
necesario para producir cantidades comercialmente viables de un
isoprenoide deseado. En tercer lugar, el requerimiento de
ciertos solventes tóxicos para la extracción de isoprenoide
15 necesita manejo especial y procedimientos de desecho y complica
así la producción comercial de isoprenoides.

La elucidación de las rutas metabólicas de MEV y DXP
ha hecho la producción biosintética de isoprenoides factible.
Por ejemplo, se han diseñado microbios para sobreexpresar una
20 parte de toda la ruta de mevalonato para la producción de un
isoprenoide llamado amorfa-4,11-dieno (patentes estadounidenses
Nos. 7,172,886 y 7,192,751). Otros esfuerzos se han enfocado en
equilibrar el cúmulo de gliceraldehído-3-fosfato y piruvato o
el incrementar la expresión de 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato
25 sintasa (dxs) e IPP isomerasa (idi). Véase Farmer et al. (2001)

Biotechnol. Prog. 17:57-61; Kajiwara et al. (1997) *Biochem. J.* 324:421-426; y Kim et al. (2001) *Biotechnol. Bioeng.* 72:408-415.

No obstante, dados las cantidades muy grandes de producto de isoprenoide necesaria para muchas aplicaciones comerciales, todavía hay necesidad por sistemas de expresión sistemas y procedimientos de fermentación que produzcan aún más isoprenoides de los que están disponibles con las tecnologías actuales. La redirección óptima del metabolismo microbiano hacia la producción de isoprenoide requiere que la ruta sintética introducida sea diseñada apropiadamente tanto para encausar al carbono a la producción de isoprenoide eficientemente y para impedir la acumulación de niveles tóxicos de intermediarios metabólicos en un período de tiempo sostenido. La presente invención trata esta necesidad y proporciona ventajas relacionadas también.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

La presente invención proporciona composiciones y métodos para una producción robusta de isoprenoides mediante el uso de enzimas de ruta de isopentenil pirofosfato que están bajo el control de por lo menos un regulador heterólogo o condiciones de fermentación, ya sea solos o en combinación. Ejemplos no limitantes de isoprenoides apropiados incluyen: hemiterpenos (derivado de 1 unidad de isopreno) tal como

isopreno; monoterpenos (derivado de 2 unidades de isopreno) tales como mirceno; sesquiterpenos (derivados de 3 unidades de isopreno) tales como amorfa-4,11-dieno; diterpenos (derivado de cuatro unidades de isopreno) tales como taxadieno; triterpenos
5 (derivado de 6 unidades de isopreno) tales como escualeno; tetraterpenos (derivado de 8 isoprenoides) tales como β -caroteno; y politerpenos (derivado de más de 8 unidades de isopreno) tales como poliisopreno.

En un aspecto, un método para producir un isoprenoide
10 involucra las etapas de (a) obtener una pluralidad de células huésped que comprenden una ruta enzimática para elaborar isopentenil pirofosfato en donde todas las enzimas de la ruta están bajo el control de por lo menos un regulador transcripcional heterólogo; y (b) cultivar las células huésped
15 en un medio bajo condiciones que son subóptimas en comparación con las condiciones que podrían proporcionar una velocidad de crecimiento específico máxima para las células huésped. En algunas modalidades, la ruta es la ruta de mevalonato. En otras modalidades, la ruta es la ruta de DXP. En otras modalidades,
20 la por lo menos una secuencia reguladora transcripcional heteróloga es inducible. En otras modalidades, las enzimas de la ruta están bajo el control de un solo regulador transcriptional. En otras modalidades, las enzimas de la ruta están bajo el control de múltiples reguladores
25 transcripcionales heterólogos.

En algunas modalidades, la ruta comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima de ruta de mevalonato de un procarionte que tiene una ruta de mevalonato endógena. Procariontes ejemplares que tienen una ruta de mevalonato endógena incluye pero no están limitados al género *Enterococcus*, el género *Pseudomonas* y el género *Staphylococcus*. En una modalidad, la enzima de la ruta de mevalonato es seleccionada de acetil-CoA tiolasa, sintasa HMG-CoA, reductasa HMG-CoA y mevalonato cinasa. En otra modalidad, la secuencia de ácido nucleico heteróloga codifica una HMG-CoA reductasa de Clase II.

En otra modalidad, las células huésped son cultivadas en un medio en donde el nivel de nutriente y/o temperatura es mantenido a un nivel menor que el que proporcionaría la velocidad de crecimiento específica máxima para las células huésped. En otra modalidad, las células huésped son cultivadas en un medio en donde la fuente de carbono es mantenida a un nivel para proporcionar menos de aproximadamente 90%, 75%, 50%, 25%, 10% o en cualquier parte entre 90% y 10% de la velocidad de crecimiento específica máxima. En otra modalidad, las células huésped son cultivadas en un medio en donde la fuente de nitrógeno es mantenida a un nivel para proporcionar menos de aproximadamente 90%, 75%, 50%, 25%, 10% o en cualquier parte entre 90% y 10% de la velocidad de crecimiento específica máxima. En otra modalidad, las células huésped son cultivadas

en un medio en donde la temperatura es mantenida a un nivel para proporcionar menos de aproximadamente 90%, 75%, 50%, 25%, 10% o en cualquier parte entre 90% y 10% de la velocidad de crecimiento específica máxima. En otra modalidad, la
5 temperatura del medio es mantenida a por lo menos aproximadamente 2°C, 4°C, 5°C, 6°C, 8°C, 10°C, 15°C o 20°C menor que la temperatura que proporcionaría la velocidad de crecimiento específica máxima.

En todavía otra modalidad, un método para producir un
10 isoprenoide o precursor de isoprenoide comprende las etapas de (i) efectuar una reacción de fermentación que comprende un medio de fermentación y una pluralidad de células huésped modificadas genéticamente que producen isoprenoide bajo condiciones de tal manera que (a) el medio de fermentación es
15 mantenido a una temperatura menor que aquella que proporcionaría una velocidad de crecimiento específica máxima de las células huésped; (b) el medio de fermentación comprende una fuente de carbono presente en una cantidad que es más baja que aquella que proporcionaría una velocidad de crecimiento
20 específica máxima de las células huésped; y/o (c) el medio de fermentación comprende una fuente de nitrógeno presente en una cantidad que es más baja que aquella que proporcionaría una velocidad de crecimiento específica máxima de las células huésped; (ii) recuperar el isoprenoide producido bajo una o más
25 condiciones resumidas en (a) a (c). En un aspecto, el

isoprenoide es producido bajo por lo menos dos de las condiciones resumidas en (a) a (c). En otro aspecto, el isoprenoide es producido bajo todas las condiciones resumidas en (a) a (c).

5

INCORPORACIÓN POR REFERENCIA

Todas las publicaciones y solicitudes de patente mencionadas en esta especificación son incorporadas en la presente por referencia a la misma extensión como si cada
10 publicación o solicitud de patente individual fuera indicada específica e individualmente para ser incorporada por referencia.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

15 La Figura 1A es una representación esquemática de la ruta de mevalonato ("MEV") para la producción de isopentenil pirofosfato ("IPP").

La Figura 1B es una representación esquemática de la ruta de 1-desoxi-D-xilulosa 5-difosfato ("DXP") para la
20 producción de isopentenil pirofosfato ("IPP") y dimetilalil pirofosfato ("DMAPP"). Dxs es 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa; Dxr es 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa (también conocida como IspC); IspD es 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol sintasa; IspE es 4-difosfocitidil-2C-metil-D-
25 eritritol sintasa; IspF es 2C-metil-D-eritritol 2,4-

ciclodifosfato sintasa; IspG es 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfato sintasa (IspG); y ispH es isopentenil/dimetilalil difosfato sintasa.

La Figura 2 es una representación esquemática de la
5 conversión de isopentenil pirofosfato ("IPP") y dimetilalil pirofosfato ("DMAPP") a geranil pirofosfato ("GPP"), farnesil pirofosfato ("FPP") y geranilgeranil pirofosfato ("GGPP") y la síntesis de varios isoprenoides.

La Figura 3 muestra un mapa de la expresión de
10 plásmido pMBIS-gpps.

La Figura 4 muestra un mapa de la expresión del plásmido pAM408.

La Figura 5 muestra un mapa de la expresión del plásmido pAM424.

15 La Figura 6 muestra un mapa de la expresión plásmidos pTrc99A-ADS, pTrc99A-FSA, pTrc99A-LLS, pTrc99A-LMS, pTrc99A-GTS, pTrc99A-APS, pTrc99A-BPS, pTrc99A-PHS, pTrc99A-TS, pTrc99A-CS, pTrc99A- SS y pAM373.

Las Figuras 7A-C son esquemas para la construcción de
20 los plásmidos pAM489-pAM498 y para pAM328.

La Figura 8 muestra la actividad específica superior y estabilidad incrementada del *Enterococcus faecalis* HMGR-CoA reductase (HMGR) en comparación con *Saccharomyces cerevisiae* truncado HMG-CoA reductasa (tHMGR).

25 La Figura 9 muestra la relación entre el peso de

célula seca ("DCW") por litro y OD₆₀₀.

Las Figuras 10A-B muestran la productividad volumétrica incrementada y productividad amorfa-4,11-dieno específica de cepas huésped que portan los genes HMGR y HMGS de *Staphylococcus aureus* en comparación con cepas huésped que portan los genes tHMGR y HMGS de *Saccharomyces cerevisiae*.

La Figura 11A-B muestra el efecto de la temperatura más baja sobre la productividad de amorfa-4,11-dieno de una cepa huésped de *Escherichia coli*.

Las Figuras 12A-D muestran el efecto de niveles de glucosa reducidos sobre la productividad de amorfa-4,11-dieno de una cepa huésped de *Escherichia coli*.

Las Figuras 13A-B muestran los efectos combinados de los niveles de temperatura más baja y niveles de glucosa reducidos sobre la productividad de amorfa-4,11-dieno de una cepa huésped de *Escherichia coli*.

Las Figuras 14A-E y 15A-E muestran los efectos combinados de la temperatura más baja y niveles de glucosa y nitrógeno reducidos sobre la productividad de amorfa-4,11-dieno de una cepa huésped de *Escherichia coli*.

La Figura 16 muestra la producción de amorfa-4,11-dieno vía la ruta DXP mediante una cepa huésped de *Escherichia coli*.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Definiciones

A no ser que se definan de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado como se entiende comúnmente por aquel delimitado ordinario en el arte con el cual la presente invención es concerniente. Se hace referencia en la presente a una diversidad de términos que serán definidos para tener los siguientes significados:

El término "opcional" u "opcionalmente" significa que el elemento o estructura descrito subsecuentemente puede o puede no estar presente o que el elemento o circunstancia descrito subsecuentemente puede o puede no ocurrir y que la descripción incluye instancia en donde un elemento o estructura particular está presente e instancia en donde el elemento o estructura está ausente o instancia en donde elemento o circunstancia ocurre e instancia en donde elemento o circunstancia no ocurre.

Los términos "ruta metabólica" se usan en la presente para referirse a una ruta catabólica o una ruta anabólica. Las rutas anabólicas involucran construir una molécula más grande a partir de moléculas más pequeñas, un proceso que requiere energía. Las rutas catabólicas involucran la ruptura de moléculas más grandes, frecuentemente liberando energía.

El término "ruta de mevalonato" o "ruta MEV" es usado

en la presente para referirse a la ruta biosintética que convierte acetil-CoA a IPP. La ruta de MEV es ilustrada esquemáticamente en la Figura 1A.

El término "ruta de desoxilulosa 5-fosfato" o "ruta de DXP" es usado en la presente para referirse a la ruta que convierte gliceraldeído-3-fosfato y piruvato a IPP y DMAPP. La ruta de DXP es ilustrada esquemáticamente en la Figura 1B.

La palabra "pirofosfato" es usada intercambiabilmente en la presente con "difosfato".

Los términos "vector de expresión" o "vector" se refieren a un ácido nucleico que transduce, transforma o infecta a una célula huésped, provocando mediante esto que la célula produzca ácidos nucleicos y/o proteínas diferentes a aquéllas que son naturales a la célula o para expresar ácidos nucleicos y/o proteínas de una manera que no es natural a la célula.

El término "endógeno" se refiere a una sustancia o proceso que ocurre naturalmente, por ejemplo en una célula huésped no recombinante.

Los términos "ruta enzimática para elaborar isopentenil pirofosfato" se refieren a cualquier ruta capaz de producir isopentenil pirofosfato, en los que se incluye pero no limitado ya sea a la ruta de mevalonato o a la ruta de DXP.

El término "ácido nucleico" se refiere a una forma polimérica de nucleótidos de cualquier longitud, ya sea

ribonucleótidos o desoxinucleótidos. Así, este término incluye pero no está limitado a ADN o ARN de una sola hebra, doble hebra o de múltiples hebras, ADN genómico, cADN, híbridos de ADN-ARN o un polímero que comprende bases de purina y pirimidina u otras bases de nucleótidos naturales, modificadas 5 química o bioquímicamente, no naturales o derivadas.

El término "operon" es usado para referirse a dos o más secuencias de nucleótidos contiguas que en cada una codifican un producto genético tal como un ARN o una proteína y 10 la expresión del cual es regulada coordinadamente por uno o más elementos de control (por ejemplo, un promotor).

El término "producto genético" se refiere a ARN codificado por ADN (o viceversa) o proteína que es codificada por un ARN o ADN, en donde un gen comprenderá comúnmente una o 15 más secuencias de nucleótidos que codifican una proteína y puede también incluir intrones y otras secuencias de nucleótidos sin codificación.

El término "proteína" se refiere a una forma polimérica de aminoácidos de cualquier longitud, que pueden 20 incluir aminoácidos codificados y no codificados, aminoácidos modificados química o bioquímicamente o derivados y polipéptidos que tienen cadenas fundamentales de péptido modificadas.

El término "ácido nucleico heterólogo" como se usa en 25 la presente se refiere a un ácido nucleico en donde por lo

menos uno de los siguientes es cierto: (a) el ácido nucleico es extraño ("exógeno") a (esto es, no es encontrado naturalmente en) una célula huésped dada; (b) el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que es encontrada naturalmente en
 5 (esto es, es "endógena a") una célula huésped dada, pero en la secuencia de nucleótidos es producida en una cantidad no natural en la célula (por ejemplo, mayor de la esperada o mayor de la encontrada naturalmente); (c) el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que difiere en secuencia de una
 10 secuencia de nucleótidos endógeno, pero la secuencia de nucleótidos codifica la misma proteína (que tiene la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos) y es producida en una cantidad no natural (por ejemplo, mayor que la esperada o mayor que la encontrada naturalmente) en la célula o
 15 (d) el ácido nucleico comprende dos o más secuencias de nucleótidos que son encontradas en la misma relación entre sí en la naturaleza (por ejemplo, el ácido nucleico es recombinante).

Un "transgen" se refiere a un gen que es introducido
 20 exógenamente a una célula huésped. Puede comprender un ácido nucleico endógeno o hexógeno o heterólogo.

El término "huésped recombinante" (también denominado como "célula huésped modificada genéticamente" o "microorganismo huésped modificado genéticamente") denota una
 25 célula huésped que comprende un ácido nucleico heterólogo de la

invención.

El término "ácido nucleico exógeno" se refiere a un ácido nucleico que es introducido exógenamente a una célula huésped y de aquí no es encontrado normal o naturalmente en y/o
5 producido en una célula dada en la naturaleza.

El término "elemento regulador" se refiere a secuencias de control de transcripción y traducción, tales como promotores, mejoradores, señales de poliadenilación, terminadores, señales de degradación de proteína y los
10 semejantes, que proporcionan y/o regulan la expresión de una secuencia de codificación y/o producción de un polipéptido codificado en una célula huésped.

El término "transformación" se refiere a un cambio genético permanente o transitorio inducido en una célula
15 enseguida de la introducción de un nuevo ácido nucleico. El cambio genético ("modificación") puede ser efectuado ya sea mediante incorporación del nuevo ADN al genoma de la célula huésped o mediante mantenimiento transitorio o estable del nuevo ADN como un elemento episomal. En células eucarióticas,
20 un cambio genético permanente es sostenido en general mediante introducción del ADN al genoma de la célula. En células procarióticas, un cambio genético permanente puede ser introducido al cromosoma o vía elementos extracromosomales tales como plásmidos y vectores de expresión, que pueden
25 contener uno o más marcadores seleccionables para ayudar en su

mantenimiento en la célula huésped recombinante.

El término "enlazado operativamente" se refiere a una yuxtaposición en donde los componentes así descritos están en una relación que les permite funcionar en su manera planeada.

5 Por ejemplo, un promotor está enlazado operativamente a una secuencia de nucleótido si el promotor afecta la transcripción o expresión de la secuencia de nucleótido.

El término "célula huésped" y "microorganismo huésped" son usados intercambiabilmente en la presente para
10 referirse a cualesquier célula viviente de arcae, bacteriana o eucariónica a la cual un ácido nucleico heterólogo puede ser o ha sido insertado. El término también es concerniente con la progenie de la célula original, que puede no necesariamente ser completamente idéntica en morfología o en complemento de ADN
15 genómico o total al padre original, debido a mutación natural, accidental o deliberada.

El término "sintético" como se usa con referencia a ácidos nucleicos significa el recocido de los bloques de construcción de oligonucleótidos sintetizados químicamente para
20 formar segmentos genéticos, que son luego ensamblados enzimáticamente para construir todo el gen. La síntesis de ácidos nucleicos vía "medios químicos" significa que los nucleótidos componentes fueron ensamblados in vitro.

El término "natural" como es aplicado a un ácido
25 nucleico, una célula o un organismo, se refiere a un ácido

nucleico, célula u organismo que es encontrado en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de polipéptidos o polinucleótidos que está presente en un organismo no patológico (sin enfermedad) que puede ser aislado de una fuente en la naturaleza y que no ha sido modificado intencionalmente por un humano en el laboratorio es natural.

El término "que se presenta de manera estable en la naturaleza" como es aplicado a un ácido nucleico, una enzima, una célula o un organismo, se refiere a un ácido nucleico, enzima, célula u organismo que es encontrado en la naturaleza. Por ejemplo, un polipéptido o secuencia de polipéptidos que está presente en un organismo que puede ser aislado de una fuente en la naturaleza y que no ha sido modificado intencionalmente por un humano en el laboratorio se presenta de manera estable en la naturaleza.

El término "fragmento biológicamente activo" como es aplicado a una proteína, polipéptido o enzima se refiere a una(s) porcion(es) funcional de las proteínas o polipéptido o enzima. Equivalentes funcionalmente pueden tener secuencias de aminoácidos variantes puede surgir, por ejemplo como consecuencia de redundancia de codón y equivalencia funcional que son conocidos que ocurren naturalmente dentro de secuencias de ácidos nucleicos y proteínas así codificadas. Proteínas o péptidos funcionalmente equivalentes pueden alternativamente ser contruidos vía la aplicación de tecnología de ADN

recombinante, en la cual cambios en la estructura de proteína pueden ser diseñados, en base a consideraciones de las propiedades de los aminoácidos que son intercambiados.

Los términos "isoprenoide", "compuesto de isoprenoide", "producto de isoprenoide", "terpeno", "compuesto de terpeno", "terpenoide" y "compuesto de terpenoide" son usados intercambiablemente en la presente. Se refieren a compuestos que son capaces de ser derivados de IPP.

Las formas singulares "un", "uno", y "el" incluyen referencias plurales, a no ser que el contexto lo determine claramente de otra manera. Así, por ejemplo, la referencia a "un vector de expresión" incluye un solo vector de expresión, también como una pluralidad de vectores de expresión y la referencia a "la célula huésped" incluye referencia a una o más células huésped y así sucesivamente. Se notará además que las reivindicaciones pueden ser redactadas para excluir cualquier elemento opcional. Como tal, se pretende que esta afirmación sirva como base de antecedente para uso de tal terminología exclusiva como "solamente", "solo" y los semejantes en relación con la cita de los elementos de la reivindicación o el uso de una limitación "negativa".

A no ser que se indique de otra manera, esta invención no está limitada a secuencias particulares, vectores de expresión, enzimas, microorganismos huésped o procesos, como tal pueden variar de acuerdo con el entendimiento de aquéllos

de habilidad ordinaria en el arte con el cual esta invención es
concerniente en vista de las enseñanzas en la presente. La
terminología usada en la presente es por propósitos de
describir modalidades particulares solamente y no pretende ser
5 limitante.

Células huésped

Cualquier célula huésped apropiada puede ser usada en
la práctica de la presente invención. En una modalidad, la
10 célula huésped es un microorganismo huésped modificado
genéticamente en el cual moléculas de ácido nucleico han sido
insertadas, canceladas o modificadas (esto es, mutadas; por
ejemplo, mediante inserción, cancelación, subdivisión y/o
inversión de nucleótidos), para producir ya sea el compuesto
15 isoprenoide deseado o derivado de isoprenoide o efectuar un
rendimiento incrementado del compuesto isoprenoide deseado o
derivado de isoprenoide. En otra modalidad, la célula huésped
es capaz de ser cultivada en un medio de cultivo líquido. En
contraste una "célula de control" es un sujeto o muestra
20 alternativa usado en un experimento por propósitos de
comparación y es comúnmente una célula padre que no contiene
la(s) modificación(es) efectuada a una célula huésped
correspondiente.

Ejemplos ilustrativos de células huésped apropiados
25 incluyen cualquier célula de arquea, procarónica o

- eucarióntica. Ejemplo de una célula de arquea incluye pero no están limitadas a aquellos que pertenecen a los géneros: Aeropyrum, Archaeoglobus, Halobacterium, Methanococcus, Methanobacterium, Pyrococcus, Sulfolobus, y Thermoplasma.
- 5 Ejemplos ilustrativos de cepas de arcae incluyen pero no están limitadas a Aeropyrum pernix, Archaeoglobus fulgidus, Methanococcus j. annaschii, Methanobacterium thermoautotrophicum, Pyrococcus abyssi, Pyrococcus horikoshii, Thermoplasma acidophilum, Thermoplasma volcanium.
- 10 Ejemplos de una célula procarióntica incluyen pero no están limitados a aquéllas que pertenecen a los géneros: Agrobacterium, Alicyclobacillus, Anabaena, Anacystis, Arthrobacter, Azobacter, Bacillus, Brevibacterium, Chromatium, Clostridium, Corynebacterium, Enterobacter, Erwinia,
- 15 Escherichia, Lactobacillus, Lactococcus, Mesorhizobium, Methylobacterium, Microbacterium, Phorodanidium, Pseudomonas, Rhodobacter, Rhodopseudomonas, Rhodospirillum, Rhodococcus, Salmonella, Sclerotinia, Serratia, Shigella, Staphylococcus, Streptomyces, Synnecoccus, y Zymomonas.
- 20 Ejemplos ilustrativos de cepas bacterianas procariónticas incluyen pero no están limitadas a Bacillus subtilis, Bacillus amyloquelificans, Brevibacterium ammoniagenes, Brevibacterium immariophilum, Clostridium beijerinckii, Enterobacter sakazakii, Escherichia coli, Lactococcus lactis,
- 25 Mesorhizobium loti, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas

mevalonu, *Pseudomonas pudica*, *Rhodobacter capsulatus*,
Rhodobacter sphaeroides, *Rhodospirillum rubrum*, *Salmonella*
enterica, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella*
dysenteriae, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus*
 5 *aureus*, y los semejantes.

En general, si se usa una célula huésped bacterial,
 una cepa no patógena es preferida. Ejemplos ilustrativos de
 cepas no patógenas incluyen pero no están limitadas a *Bacillus*
subtilis, *Escherichia coli*, *Lactobacillus acidophilus*,
 10 *Lactobacillus helveticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas*
mevalonu, *Pseudomonas putida*, *Rhodobacter sphaeroides*,
Rhodobacter capsulatus, *Rhodospirillum rubrum*, y los semejantes.
 Ejemplos de células eucarióticas incluyen pero no están
 limitadas a células fungales. Ejemplos de célula fungal
 15 incluyen pero no están limitadas a aquellas que pertenecen a
 los géneros: *Aspergillus*, *Candida*, *Chrysosporium*, *Cryptococcus*,
Fusarium, *Kluyveromyces*, *Neotryphodium*, *Neurospora*, *Penicillium*,
Pichia, *Saccharomyces*, *Trichoderma* y *Xanthophyllomyces*
 (anteriormente *Phaffia*).

20 Ejemplos ilustrativos de cepas eucarióticas incluyen
 pero no están limitadas a: *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus*
niger, *Aspergillus oryzae*, *Candida albicans*, *Chrysosporium*
lucknowense, *Fusarium graminearum*, *Fusarium venenatum*,
Kluyveromyces lactis, *Neurospora crassa*, *Pichia angusta*, *Pichia*
 25 *finlandica*, *Pichia kodamae*, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia*

methanohca, *Pichia opuntiae*, *Pichia pastons* , *Pichia pijpen*,
Pichia quercuum, *Pichia sahctaria*, *Pichia thermotolerans*,
Pichia trehalophila, *Pichia stψitis*, *Streptomyces ambofaciens*,
Streptomyces aureofaciens, *Streptomyces aureus*, *Saccaromyces*
5 *bayanus*, *Saccaromyces boulardi*, *Saccharomyces cerevisiae*,
Streptomyces fungicidicus, *Streptomyces gnseochromogenes*,
Streptomyces gnseus, *Streptomyces hvidans*, *Streptomyces*
ohvogriseus, *Streptomyces rameus*, *Streptomyces tanashiensis*,
Streptomyces vinaceus, *Tnchoderma reesei* y *Xanthophyllomyces*
10 *dendrorhous* (anteriormente *Phaffia rhodozyma*).

En general, si se usa una célula eucarióntica, una
cepa no patógena es preferida. Ejemplos ilustrativos de cepas
no patógenas incluyen pero no están limitadas a *Fusarium*
graminearum, *Fusarium venenatum*, *Pichia pastoris*, *Saccaromyces*
15 *boulardi*, and *Saccaromyces cerevisiae*.

Además, ciertas cepas han sido designadas por la
Administración de Alimentos y Fármacos como GRAS o consideradas
en consideradas en general como seguras. Estas cepas incluyen:
Bacilus subtilis, *Lactibacilus acidophilus*, *Lactobacilus*
20 *helveticus* y *Saccharomyces cerevisiae*.

IPP Rutas

Las células huésped de la presente invención
comprenden o utilizan la ruta MEV, la ruta DXP o ambas para
25 sintetizar IPP y su isómero, DMAPP. En general, los eucariontes

diferentes a plantas utilizan la ruta isoprenoide MEV exclusivamente para convertir acetil-CoA a IPP, que es isomerizado subsecuentemente a DMAPP. Los procariontes, con algunas excepciones, utilizan la ruta mevalonato-independiente o de DXP para producir IPP y DMAPP separadamente a través de un punto de rama. En general, las plantas usan tanto la ruta de MEV como DXP para la síntesis de IPP.

Ruta de MEV

Una representación esquemática de la ruta de MEV es descrita en la Figura 1A. En general, la ruta comprende seis etapas.

En la primera etapa, dos moléculas de la acetil-coenzima A son combinadas enzimáticamente para formar acetoacetil-CoA. Una enzima conocida para catalizar esta etapa es por ejemplo, acetil-CoA tiolasa (también conocida como acetil-CoA acetiltransferasa). Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos incluyen pero no están limitadas a los siguientes números de acceso de GenBank y el organismo del cual las secuencias se derivan: (NC 000913 REGION: 2324131..2325315; *Escherichia coli*), (D49362; *Paracoccus denitrificans*) y (L20428; *Saccharomyces cerevisiae*).

En la segunda etapa de la ruta de MEV, acetoacetil-CoA es condensada enzimáticamente con otra molécula de acetil-CoA para formar 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). Una

enzima conocida para catalizar esta etapa es, por ejemplo, HMG-CoA sintasa. Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos incluyen pero no están limitados a: (NC_001145. complemento 19061..20536; *Saccharomyces cerevisiae*), (X96617; *Saccharomyces*
 5 *cerevisiae*), (X83882; *Arabidopsis thaliana*), (AB037907; *Kitasatospora griseola*), (BT007302; *Homo sapiens*) y (NC_002758, Locus tag SAV2546, GeneID 1122571; *Staphylococcus aureus*).

En la tercera etapa, HMG-CoA es convertida enzimáticamente a mevalonato. Una enzima conocida para
 10 catalizar esta etapa es, por ejemplo, HMG-CoA reductasa. Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos incluyen pero no están limitadas a: (NM_206548; *Drosophila melanogaster*), (NC_002758, Locus tag SAV2545, GeneID 1122570; *Staphylococcus aureus*), (NM_204485; *Gallus gallus*), (AB015627;
 15 *Streptomyces sp.* KO 3988), (AF542543; *Nicotiana attenuata*), (AB037907; *Kitasatospora griseola*), (AX128213, que proporciona la secuencia que codifica un HMGR truncado; *Saccharomyces cerevisiae*) y (NC_001145: complemento (115734..118898; *Saccharomyces cerevisiae*).

20 En la cuarta etapa, el mevalonato es fosforilado enzimáticamente para formar mevalonato 5-fosfato. Una enzima conocida para catalizar esta etapa es por ejemplo, mevalonato cinasa. Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos incluyen pero no están limitadas a: (L77688; *Arabidopsis*
 25 *thaliana*) y (X55875; *Saccharomyces cerevisiae*).

En la quinta etapa, un segundo grupo de fosfato es agregado enzimáticamente a mevalonato 5-fosfato para formar mevalonato 5-pirofosfato. Una enzima conocida para catalizar esta etapa es, por ejemplo, fosfomevalonato cinasa. Ejemplos
 5 ilustrativos de secuencias de nucleótidos incluyen pero no están limitadas a: (AF429385; *Hevea brasiliensis*), (NM_006556; *Homo sapiens*) y (NC_001145. complemento 712315..713670; *Saccharomyces cerevisiae*).

En la sexta etapa, mevalonato 5-pirofosfato es
 10 convertido enzimáticamente a IPP. Una enzima conocida para catalizar esta etapa es, por ejemplo, mevalonato pirofosfato decarboxilasa. Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos incluyen pero no están limitados a: (X97557; *Saccharomyces cerevisiae*), (AF290095; *Enterococcus faecium*) y
 15 (U49260; *Homo sapiens*).

Si IPP va a ser convertido a DMAPP, entonces se requiere una séptima etapa. Una enzima conocida para catalizar esta etapa es, por ejemplo, IPP isomerasa. Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos incluyen pero no
 20 están limitados a: (NC_000913, 3031087..3031635; *Escherichia coli*) y (AF082326; *Haematococcus pluvialis*). Si se requiere la conversión a DMAPP, una expresión incrementada de IPP isomerasa asegura que la conversión de IPP a DMAPP no representa una etapa limitante de velocidad en la ruta global.

Ruta de DXP

Una representación esquemática de la ruta de DXP es descrita en la Figura 1B. En general, la ruta de DXP comprende siete etapas. En la primera etapa, el piruvato es condensado con D-gliceraldehído 3-fosfato para elaborar 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato. Una enzima conocida para catalizar esta etapa es, por ejemplo, 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa. Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos incluyen pero no están limitadas a: (AF035440; *Escherichia coli*), (NC_002947, Locus tag PP0527; *Pseudomonas putida* KT2440), (CP000026, Locus tag SPA2301; *Salmonella enterica* Paratyphi, véase ATCC 9150), (NC_007493, Locus tag RSP_0254; *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1), (NC_005296, Locus tag RPA0952; *Rhodopseudomonas palustris* CGA009), (NC_004556, Locus tag PD1293; *Xylella fastidiosa* Temeculal) y (NC_003076, Locus tag AT5G11380; *Arabidopsis thaliana*).

En la segunda etapa, 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato es convertido a 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato. Una enzima conocida para catalizar esta etapa es, por ejemplo, 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa. Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos incluyen pero no están limitados a: (AB013300; *Escherichia coli*), (AF148852; *Arabidopsis thaliana*), (NC_002947, locus_tag PP1597; *Pseudomonas putida* KT2440), (AL939124, locus_tag SCO5694; *Streptomyces coelicolor* A3(2)), (NC_007493, locus_tag RSP_2709; *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1)

y (NC_007492, locus_tag PfI 1 107; *Pseudomonas fluorescens* PfO-1).

En la tercera etapa, 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato es convertido a 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol. Una
 5 enzima conocida para catalizar esta etapa es por ejemplo, 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol sintasa. Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos incluyen pero no están limitadas a: (AF230736; *Escherichia coli*), (NC_007493, locus_tag RSP_2835; *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1), (NC_003071,
 10 locus_tag AT2G02500; *Arabidopsis thaliana*) y (NC_002947, locus_tag PP1614; *Pseudomonas putida* KT2440).

En la cuarta etapa, 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol es convertido a 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol-2-fosfato. Una enzima conocida para catalizar esta
 15 etapa es por ejemplo, 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol cinasa. Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos incluyen pero no están limitadas a: (AF216300; *Escherichia coli*) y (NC_007493, locus_tag RSP_1779; *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1).

20 En la quinta etapa, 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol-2-fosfato es convertido a 2C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato. Una enzima conocida para catalizar esta etapa es por ejemplo, 2C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato sintasa. Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos
 25 incluyen pero no están limitados a: (AF230738; *Escherichia*

coli), NC_007493, locus_tag RSP_6071; *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1), y (NC_002947, locus_tag Pp16168; *Pseudomonas putida* KT2440).

En la sexta etapa, 2C-metil-D-eritritol 2,4-
 5 ciclodifosfato es convertido a 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil-4-difosfato. Una enzima conocida para catalizar esta etapa es, por ejemplo, 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil-4-difosfato sintasa. Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos incluyen pero no están limitadas a: (AY033515, *Escherichia*
 10 *coli*), (NC_002947, locus_tag PP0853; *Pseudomonas putida* KT2440) y (NC_007493, locus_tag RSP_2982; *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1).

En la séptima etapa, 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil-4-difosfato es convertido ya sea a IPP o su isómero, DMAPP. Una
 15 enzima conocida para catalizar esta etapa es, por ejemplo, ispentil/dimetilalil difosfato sintasa. Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos incluyen pero no están limitados a: (AY062212; *Escherichia coli*) y (NC_002947, locus_tag PP0606; *Pseudomonas putida* KT2440).

20 En algunas modalidades, "diafonía" (o interferencia) entre los propios procesos metabólicos de la célula huésped y aquellos procesos involucrados con la producción de IPP como se proporciona por la presente invención son minimizados o eliminado completamente. Por ejemplo, la diafonía es minimizada
 25 o eliminada por completo cuando el microorganismo huésped

depende exclusivamente de la ruta de DXP para sintetizar IPP y una ruta de MEV es introducida para proporcionar IPP adicional. Tales organismos huésped no estarían equipados para alterar la expresión de las enzimas de ruta MEV o procesar los intermediarios asociados con la ruta MEV. Los organismos que dependen exclusiva o predominantemente de la ruta de DXP incluyen, por ejemplo, *Escherichia coli*.

En algunas modalidades, la célula huésped produce IPP vía la ruta de MEV, ya sea exclusivamente o en combinación con la ruta de DXP. En otras modalidades, la ruta de DXP del huésped es deshabilitada funcionalmente, de tal manera que la célula huésped produce IPP exclusivamente por medio de una ruta de MEV introducida heterológamente. La ruta de DXP puede ser deshabilitada funcionalmente al deshabilitar la expresión genética o desactivar la función de una o más de las enzimas de ruta de DXP.

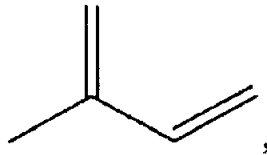
Compuestos de C₅

Los compuestos C₅ de la invención son divididos en general de IPP o DMAPP. Estos compuestos también son conocidos como hemiterpenos debido a que son derivados de una sola unidad de isopreno (IPP o DMAPP).

Isopreno

El isopreno, cuya estructura es

5



es encontrado en muchas plantas. El isopreno es elaborado a partir de IPP mediante isopreno sintasa. Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos apropiadas incluyen pero no están limitados a: (AB198190; *Populus alba*) y (AJ294819; *Populus alba* x *Populus tremula*).

Compuestos de C₁₀

Los compuestos C₁₀ de la invención derivados en general de geranil pirofosfato (GPP) que es elaborado mediante la condensación de IPP con DMAPP. Una enzima conocida para catalizar esta etapa es por ejemplo, geranil pirofosfato sintasa. Los compuestos de C₁₀ también son conocidos como monoterpenos debido a que son derivados de dos unidades de isopreno.

La Figura 2 muestra esquemáticamente cómo IPP y DMAPP pueden producir GPP, que puede ser procesado adicionalmente a un monoterpeno.

Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos para geranil pirofosfato sintasa incluyen pero no están

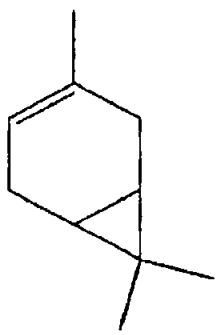
limitados a: (AF513111; *Abies grandis*), (AF513112; *Abies grandis*), (AF513113; *Abies grandis*), (AY534686; *Antirrhinum majus*), (AY534687; *Antirrhinum majus*), (Y17376; *Arabidopsis thaliana*), (AE016877, Locus API 1092; *Bacillus cereus*; ATCC 5 14579), (AJ243739; *Citrus sinensis*), (AY534745; *Clarkia breweri*), (AY953508; *Ips pini*), (DQ286930; *Lycopersicon esculentum*), (AF182828; *Mentha x piperita*), (AF182827; *Mentha x piperita*), (MPI249453; *Mentha x piperita*), (PZE431697, Locus CAD24425; *Paracoccus zeaxanthinifaciens*), (AY866498; *Picrorhiza* 10 *kurrood*), (AY351862; *Vitis vinifera*) y (AF203881, Locus AAF12843; *Zymomonas mobilis*).

GPP es luego convertido subsecuentemente a una variedad de compuestos de C_{10} . Ejemplos ilustrativos de compuestos de C_{10} incluyen pero no están limitados a:

15

Careno

El careno, cuya estructura es



20

es encontrado en la resina de muchos árboles, 25 particularmente árboles de pino. El careno es elaborado a

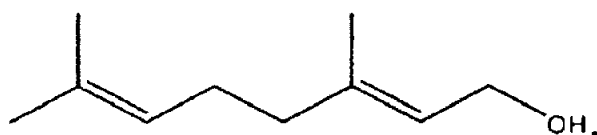
partir de GPP de careno sintasa. Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos apropiadas incluyen pero no están limitados a: (AF461460, REGION 43..1926; *Picea abies*) y (AF527416, REGION: 78..1871; *Salvia stenophylla*).

5

Geraniol

El geraniol (también conocido como rhodnol), cuya estructura es

10

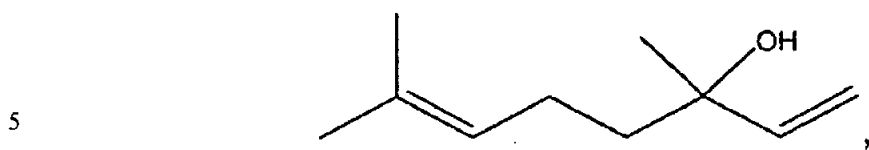


es el componente principal del aceite de rosa y aceite de palmarosa. También se presenta en geranio, limon y citronela. El geraniol es elaborado a partir de GPP mediante geraniol sintasa. Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos apropiadas incluyen pero no están limitados a: (AJ457070; *Cinnamomum tenuipilum*), (AY362553; *Ocimum basilicum*), (DQ234300; *Perilla frutescens* cepa 1864), (DQ234299; *Perilla citriodora* cepa 1861), (DQ234298; *Perilla citriodora* cepa 4935) y (DQ088667; *Perilla citriodora*).

25

Linalool

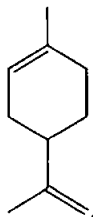
El linalool, cuya estructura es



es encontrado en muchas flores y plantas de especias tales como semillas de coriander. El linalool es fabricado a partir de GPP mediante linalool sintasa. Ejemplos ilustrativos de secuencia de nucleótidos apropiadas incluyen pero no están limitados a: (AF497485; *Arabidopsis thaliana*), (AC002294, Locus AAB71482; *Arabidopsis thaliana*), (AY059757; *Arabidopsis thaliana*), (NM_104793; *Arabidopsis thaliana*), (AF154124; *Artemisia annua*), (AF067603; *Clarkia breweri*), (AF067602; *Clarkia concinna*), (AF067601; *Clarkia breweri*), (U58314; *Clarkia breweri*), (AY840091; *Lycopersicon esculentum*), (DQ263741; *Lavandula angustifolia*), (AY083653; *Mentha citrate*), (AY693647; *Ocimum basilicum*); XM_463918; *Oryza sativa*), (AP004078, Locus BAD07605; *Oryza sativa*), (XM_463918, Locus XP_463918; *Oryza sativa*), (AY917193; *Perilla citriodora*), (AF271259; *Perilla frutescens*), (AY473623; *Picea abies*), (DQ195274; *Picea sitchensis*), y (AF444798; *Perilla frutescens* var. *crispa* cultivar No. 79).

Limoneno

El limoneno cuya estructura es

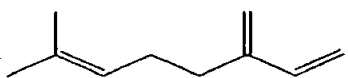


5

es encontrado en la cáscara de fruta cítrica y hiebabuena. El limoneno es elaborado a partir de GPP mediante limoneno sintasa. Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos apropiadas incluyen pero no están limitados a: (+)-limoneno sintasas (AF514287, REGION: 47..1867; *Citrus limon*) y (AY055214, REGION: 48..1889; *Agastache rugosa*) y (-)-limoneno sintasas (DQ195275, REGION: 1..1905; *Picea sitchensis*), (AF006193, REGION: 73..1986; *Abies grandis*) y (MHC4SLSP, 15 REGION: 29..1828; *Mentha spicata*).

Mirceno

El mirceno, cuya estructura es



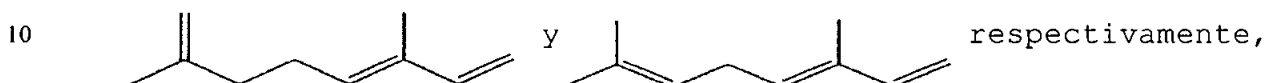
20

es encontrado en el aceite esencial en muchas plantas en los que se incluyen laurel, verbena y mircia en la cual tiene su nombre. El mirceno es elaborado a partir de GPP mediante mirceno sintasa. Ejemplos ilustrativos de secuencias de 25 nucleótidos apropiadas incluyen pero no están limitados a:

U87908; *Abies grandis*), (AY195609; *Antirrhinum majus*),
 (AY195608; *Antirrhinum majus*), (NM 127982; *Arabidopsis thaliana*
 TPS10), (NMJ 13485; *Arabidopsis thaliana* ATTPS-CIN),
 (NM_113483; *Arabidopsis thaliana* ATTPS-CIN), (AF271259; *Perilla*
 5 *frutescens*), (AY473626; *Picea abies*), (AF369919; *Picea abies*) y
 (AJ304839; *Quercus ilex*).

Ocimeno

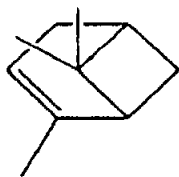
El α - y β -ocimeno cuyas estructuras son:



son encontrados en una variedad de plantas y frutas en los que
 se incluyen *ocimum basilicum* y es elaborado a partir de GPP
 mediante ocimeno sintasa. Ejemplos ilustrativos de secuencias
 15 de nucleótidos apropiadas incluyen pero no están limitados a:
 (AY195607; *Antirrhinum majus*), (AY195609; *Antirrhinum majus*),
 (AY195608; *Antirrhinum majus*), (AK221024; *Arabidopsis*
thaliana), (NMJ 13485; *Arabidopsis thaliana* ATTPS-CIN), (NMJ
 13483; *Arabidopsis thaliana* ATTPS-CIN), (NMJ 17775; *Arabidopsis*
 20 *thaliana* ATTPS03), (NM_001036574; *Arabidopsis thaliana*
 ATTPS03), (NM_127982; *Arabidopsis thaliana* TPS10), (AB110642;
Citrus unshiu CitMTSL4) y (AY575970; *Lotus corniculatus* var.
japonicus)

α -pineno

El α -pineno, cuya estructura es:



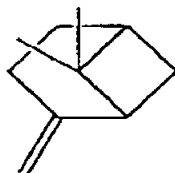
5

es encontrado en los árboles de pino y eucalipto. El α -pineno es elaborado mediante GPP mediante α -pineno sintasa. Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos apropiadas incluyen pero no están limitadas a: (+) α -pineno sintasa (AF543530, REGION 1..1887, *Pinus taeda*), (-) α -pineno sintasa (AF543527, REGION 32..1921, *Pinus taeda*) y (+)/(-) α -pineno sintasa (AGU87909, REGION 6111892; *Abies grandis*).

10

 β -pineno

El β -pineno, cuya estructura es:



15

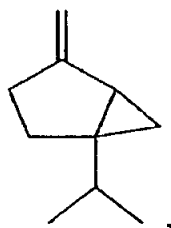
es encontrado en los árboles de pino, romero, perejil, enebro, albahaca y rosa. El β -pineno es elaborado a partir de GPP mediante β -pineno sintasa. Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos apropiadas incluyen pero no están limitados a: (-) β -pineno sintasas (AF276072, REGION 1..1749, *Artemisia annua*) y (AF514288, REGION 26..1834, *Citrus limon*).

20

Sabineno

El sabineno, cuya estructura es:

5

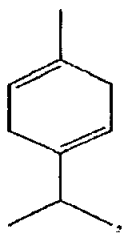


es encontrado en pimienta negra, semilla de zanahoria, salvia y árboles de té. El sabineno es elaborado a partir de GPP a partir de sabineno sintasa. Un ejemplo ilustrativo de una
10 secuencia de nucleótidos apropiada incluye pero no está limitada a AF051901, REGION 26..1798 de *Salvia officinalis*.

 γ -Terpineno

El γ -terpineno, cuya estructura es:

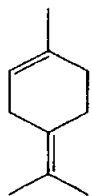
15



es un constituyente del aceite esencial de frutas cítricas.
20 Bioquímicamente, el γ -terpineno es elaborado a partir de GPP mediante un γ -terpineno sintasa. Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos apropiadas incluyen: (AF514286, REGION: 30..1832 de *Citrus limon*) y (AB110640, REGION 1..1803 de *Citrus unshiu*).

Terpinoleno

El terpinoleno, cuya estructura es:



5

es encontrado en grosella negra, ciprés, guayaba, líquen, papaya, pino y té. El terpinoleno es elaborado a partir de GPP mediante terpinoleno sintasa. un ejemplo ilustrativo de una
 10 secuencia de nucleótidos apropiada incluye pero no está limitada a AY906866, REGION: 10..1887 de *Pseudotsuga menziesii*.

Compuestos de C₁₅

Los compuestos de C₁₅ de la invención se derivan en
 15 general de farnesil pirofosfato (FPP) que es elaborado mediante la condensación de dos moléculas de IPP con una molécula de DMAPP. una enzima conocida para catalizar esta etapa es, por ejemplo, farnesil pirofosfato sintasa. Estos compuestos de C₁₅ también so conocidos como sesquiterpenos debido a que son
 20 derivados de tres unidades de isopreno.

La Figura 2 muestra esquemáticamente cómo IPP y DMAPP pueden ser combinados para producir FPP, que puede ser procesado adicionalmente a un sesquiterpeno.

Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos
 25 para farnesil pirofosfato sintasa incluyen pero no están

limitados a: (ATU80605; *Arabidopsis thaliana*), (ATHFPS2R,
Arabidopsis thaliana), (AAU36376, *Artemisia annua*), (AF461050;
Bos taurus), (D00694; *Escherichia coli* K-12), (AE009951, Locus
 AAL95523; *Fusobacterium nucleatum subsp nucleatum* ATCC 25586),
 5 (GFFPPSGEN; *Gibberella fujikuroi*), (CP000009, Locus AAW60034,
Gluconobacter oxydans 621H), (AF019892, *Helianthus annuus*),
 (HUMFAPS; *Homo sapiens*), (KLPFPSQCR, *Kluyveromyces lactis*),
 (LAU15777, *Lupinus albus*), (LAU20771, *Lupinus albus*),
 (AF309508, *Mus musculus*), (NCFPPSGEN; *Neurospora crassa*),
 10 (PAFPS1, *Parthenium argentatum*), (PAFPS2, *Parthenium*
argentatum), (RATFAPS; *Rattus norvegicus*), (YSCFPP;
Saccharomyces cerevisiae), (D89104; *Schizosaccharomyces pombe*),
 (CP000003, Locus AAT87386; *Streptococcus pyogenes*), (CP000017,
 Locus AAZ51849, *Streptococcus pyogenes*), (NC 008022, Locus YP
 15 598856, *Streptococcus pyogenes* MGAS10270), (NC 008023, Locus YP
 600845, *Streptococcus pyogenes* MGAS2096), (NC_008024, Locus
 YP_602832, *Streptococcus pyogenes* MGAS 10750) y (MZEFPS, *Zea*
mays).

Alternativamente, FPP puede también ser elaborado al
 20 agregar IPP a GPP. Ejemplos ilustrativos de secuencias de
 nucleótidos que codifican para una enzima capaz de esta
 reacción incluyen pero no están limitados a: (AE000657, Locus
 AAC06913, *Aquifex aeolicus* VF5), (NM_202836, *Arabidopsis*
thaliana), (D84432, Locus BAA12575; *Bacillus subtilis*),
 25 (U12678, Locus AAC28894; *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110),

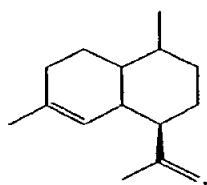
(BACFDPS; *Geobacillus stearothermophilus*), (NC 002940, Locus NP_873754; *Haemophilus ducreyi* 35000HP), (L42023, Locus AAC23087, *Haemophilus influenzae* Rd KW20), (J05262, *Homo sapiens*), (YP_395294, *Lactobacillus sakei* subsp *sakei* 23K),
 5 (NC_005823, Locus YP 000273; *Leptospira interrogans* serovar *Copenhageni* str *Fiocruz* Ll-130), (AB003187; *Micrococcus luteus*), (NC_002946, Locus YP 208768; *Neisseria gonorrhoeae* FA 1090), (U00090, Locus AAB91752, *Rhizobium* sp. NGR234), (J05091; *Saccharomyces cerevisiae*), (CP000031, Locus AAV93568;
 10 *Silicibacter pomeroyi* DSS-3), (AE008481, Locus AAK99890; *Streptococcus pneumoniae* R6) y (NC 004556, Locus NP 779706; *Xylella fastidiosa* Temeculal).

Luego el FPP es convertido subsecuentemente a una variedad de compuestos C₁₅. Ejemplos ilustrativos de compuestos
 15 C₁₅ incluyen pero no están limitados a:

Amorfadieno

Amorfadieno, cuya estructura es:

20

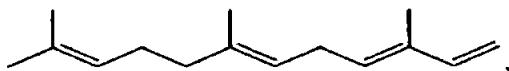


es un precursor a artemisinina que es elaborada mediante *Artemisia anna*. El amorfadieno es elaborado a partir de FPP
 25 mediante amorfadieno sintasa. Un ejemplo ilustrativo de una

secuencia de nucleótidos apropiada es SEQ ID NO. 37 de la Patente Estadounidense No. 7,192,751.

α -Farneseno

5 El α -Farneseno, cuya estructura es:

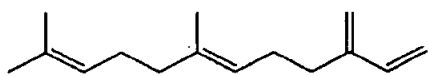


es encontrado en varias fuentes biológicas en las que se incluyen pero no limitados a la glándula de Dufour en hormigas y
 10 en el recubrimiento de cáscaras de manzana y pera. El α -Farneseno es elaborado a partir de FPP mediante α -farneseno sintasa. Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos apropiadas incluyen pero no están limitados a DQ309034 de *Pyrus communis* cultivar d'Anjou (pera; nombre del gen AFS1) y
 15 AY182241 de *Malus domestica* (manzana; gen AFS1). Pechouus et al., *Planta* **219(1)**: 84-94 (2004).

β -Farneseno

El β -Farneseno, cuya estructura es:

20



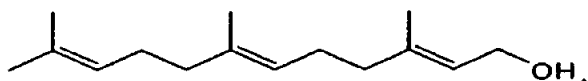
es encontrado en varias fuentes biológicas en los que se incluyen pero no limitadas a áfidos y aceites esenciales tales como el de hierbabuena. En algunas plantas, tales como patata silvestre, el β -farneseno es utilizado como un repelente de

insectos natural. El β -farneseno es elaborado a partir de FPP mediante β -farneseno sintasa. Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos apropiadas incluyen pero no están limitadas a GenBank No. de acceso AF024615 de *Mentha x piperita* 5 (hierbabuena; gen Tspall) y AY835398 de *Artemisia annua*. Picaud et al., *Phytochemistry* **66(9)**: 961-967 (2005).

Farnesol

El Farnesol, cuya estructura es:

10



15

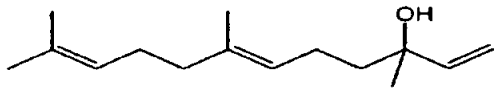
20

es encontrado en varias fuentes biológicas en las que se incluyen insectos y aceites esenciales tales como citronella, neroli, ciclamen, pasto de limón, tuberosa y rosa. El farnesol es elaborado a partir de FPP mediante una hidroxilasa tal como farnesol sintasa. Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos apropiadas incluyen pero no están limitados a GenBank No. de acceso AF529266 de *Zea mays* y YDR481C de *Saccharomyces cerevisiae* (gen Pho8). Song, L., *Applied Biochemistry and Biotechnology* **128**: 149-158 (2006).

25

Nerolidol

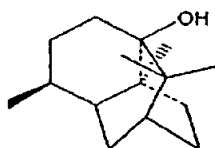
En nerolidol, cuya estructura es:



5 es también conocido como peruvicol y es encontrado en varias fuentes biológicas en las que se incluyen como aceites esenciales tales como de neroli, gengibre, jazmín, lavanda, árbol de té y césped de limón. El nerolidol es elaborado a partir de FPP mediante una hidroxilasa tal como nerolidol
10 sintasa. Un ejemplo ilustrativo de una secuencia de nucleótidos apropiada incluye pero no está limitada a AF529266 de *Zea mays* (maíz; gen *tps1*).

Patchoulol

15 El patchoulol, cuya estructura es:

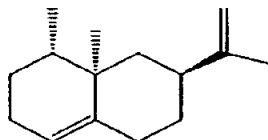


es también conocido como alcohol de patchuli y es un
20 constituyente del aceite esencial de *Pogostemon patchouli*. El patchouliol es elaborado a partir de FPP mediante patchouliol sintasa. Un ejemplo ilustrativo en una secuencia de nucleótidos apropiada incluye pero no está limitada a AY508730 REGION: 1..1659 de *Pogostemon cablin*.

25

Valenceno

El valenceno, cuya estructura es:



5

es uno de los componentes químicos principales del olor y sabor de naranjas y es encontrado en cáscaras de naranja. El valenceno es elaborado a partir de FPP mediante nootkatona sintasa. Ejemplos ilustrativos de una secuencia de nucleótidos incluye pero no está limitada a AF441124 RAGION: 1..1647 de *Citrus sinensis* y AY917195 REGION: 1..1653 de *Perilla frutescens*.

10

Compuestos de C₂₀

Los compuestos de C₂₀ de la invención derivados en general de genarilgeraniol pirofosfato (GGPP) que es elaborado mediante la condensación de tres moléculas de IPP con una molécula de DMAPP. Una enzima conocida para catalizar esta etapa es, por ejemplo, geranilgeranil pirofosfato sintasa. Estos compuestos de C₂₀ son también conocidos como diterpenos debido a que también son derivados de cuatro unidades de isopreno.

15

20

La Figura 2 muestra esquemáticamente cómo IPP y DMAPP pueden ser combinados para producir GGPP, que puede ser procesado adicionalmente a un diterpeno o puede ser procesado

25

adicionalmente para producir un carotenoide.

Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos para geranilgeranil pirofosfato sintasa incluyen pero no están limitados a: ATHGERPYRS, *Arabidopsis thaliana*), (BT005328, *Arabidopsis thaliana*), (NM_119845, *Arabidopsis thaliana*), (NZ_AAJM01000380, Locus ZP_00743052, *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis*, ATCC 35646 sql563), (CRGGPPS, *Catharanthus roseus*), (NZ_AABF02000074, Locus ZP_OO_144509, *Fusobacterium nucleatum* subsp *vincentii*, ATCC 49256), (GFGGPPSGN, *Gibberella fujikuroi*), (AY371321; *Ginkgo biloba*), (AB055496; *Hevea brasiliensis*), (AB017971; *Homo sapiens*), (MCI276129; *Mucor circinelloides* f. *lusitanicus*), (AB016044; *Mus musculus*), (AABX01000298, Locus NCU01427; *Neurospora crassa*), (NCU20940; *Neurospora crassa*), (NZ_AAKL01000008, Locus ZP_00943566; *Ralstonia solanacearum* UW551), (AB118238; *Rattus norvegicus*), (SCU31632; *Saccharomyces cerevisiae*), (AB016095; *Synechococcus elongates*), (SAGGPS; *Sinapis alba*), (SSOGDS; *Sulfolobus acidocaldarius*), (NC_007759, Locus YP_461832; *Syntrophus aciditrophicus* SB) y (NC_006840, Locus YP_204095; *Vibrio fischeri* ES1 14).

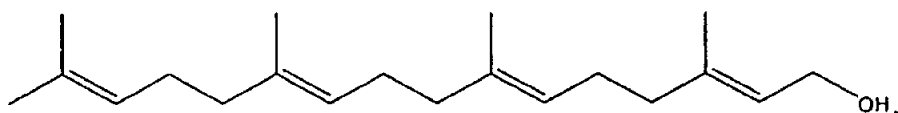
Alternativamente, GGPP puede también ser elaborado al agregar IPP a FPP. Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos que codifican una enzima capaz de esta reacción incluyen pero no están limitados a: (NM_112315; *Arabidopsis thaliana*), (ERWCRTE; *Pantoea agglomerans*), (D90087, Locus

BAA14124; *Pantoea ananatis*), (X52291, Locus CAA36538; *Rhodobacter capsulatus*), (AF195122, Locus AAF24294; *Rhodobacter sphaeroides*) y (NC 004350, Locus NP_721015; *Streptococcus mutans* UA159).

5 Luego GGPP es convertido subsecuentemente a una variedad de isoprenoides de C₂₀. Ejemplos ilustrativos de compuestos de C₂₀ incluyen pero no están limitados a:

Geranilgeraniol

10 El geranilgeraniol, cuya estructura es:

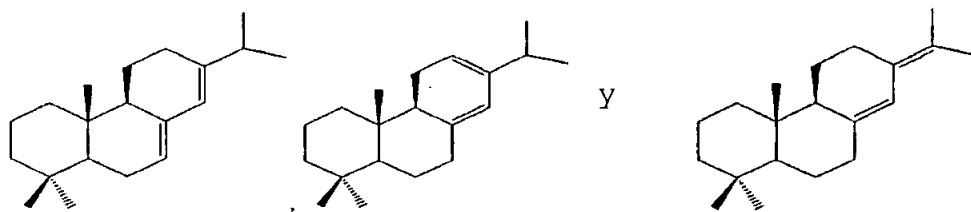


es un constituyente de aceite de madera de *Cedrela toona* y de aceite de linasa. El geranilgeraniol puede ser elaborado mediante por ejemplo, adición a los constructos de expresión de un gen de fosfatasa después del gen para una GGPP sintasa.

Abietadieno

El abietadieno abarca los siguientes isómeros:

20



y es encontrado en árboles tales como *Abies grandis*. El abietadieno es elaborado mediante abietadieno sintasa. Un ejemplo ilustrativo de una secuencia de nucleótidos apropiada

incluye pero no está limitado a: (U50768; *Abies grandis*) y (AY473621; *Picea abies*).

Compuestos de C₂₀₊

5 Los compuestos de C₂₀₊ también están dentro del alcance de la presente invención. Ejemplos ilustrativos de tales compuestos incluyen sesterterpenos (compuestos de C₂₅ compuestos de cinco unidades de isopreno), triterpenos (compuestos de C₃₀ compuestos de seis unidades de isopreno) y
10 tetraterpenos (compuestos de C₄₀ compuestos de ocho unidades de isopreno). Estos compuestos son elaborados utilizando métodos similares descritos en la presente y sustituyendo o agregando secuencias de nucleótidos por la(s) sintasa(s) apropiada(s).

15 Rutas de diseño

La presente invención utiliza una ruta de MEV y/o DXP diseñada para efectuar la producción de alto nivel de isoprenoides en una célula huésped. La ruta es diseñada comúnmente mediante tecnología de ADN recombinante al expresar
20 secuencias heterólogas que codifican enzimas en por lo menos una de estas rutas.

Los ácidos de nucleótidos presentes pueden ser expresados mediante un solo o múltiples vectores. Por ejemplo, un solo vector de expresión puede comprender por lo menos dos,
25 tres, cuatro, cinco o todas las secuencias heterólogas que

codifican todas las enzimas de ruta de MEV o DXP. EN tanto que la selección de un solo o múltiples vectores puede depender del tamaño de las secuencias heterólogas y la capacidad de los vectores, dependerá estrictamente del rendimiento global de un isoprenoide dado que el vector es apto de proporcionar cuando es expresado en la célula huésped seleccionada. Los vectores sujetos pueden permanecer replicables episomalmente o como parte integral del genoma de la célula huésped. Comúnmente, el último es preferido para una propagación sostenida de la célula huésped.

En ciertas células huésped, la una o más secuencias heterólogas que codifican las enzimas de ruta MEV o DXP pueden ser controladas por uno o más operones. En algunas instancias, un sistema de dos o tres operones proporciona un rendimiento más alto de un isoprenoide con respecto a un sistema de un solo operón.

En donde se desee, las secuencias de ácidos nucleicos presentes pueden ser modificadas para reflejar la preferencia de codón de una célula huésped seleccionada para efectuar una expresión superior de tales secuencias en una célula huésped. Por ejemplo, las secuencias de nucleótidos presentes serán modificadas en algunas modalidades por la preferencia de codón de levadura. Véase por ejemplo, Bennetzen y Hall (1982) J. Biol. Chem. 257(6): 3026-3031. Como otro ejemplo no limitante, las secuencias de nucleótidos serán modificadas en otras

modalidades por preferencia de codón de *E. coli*. Véase, por ejemplo, Gouy y Gautier (1982) *Acid Nucleic Res.* 10(22): 7055-7074; Eyre-Walker (1996) *Mol. Biol. Evol.* 13(6): 864-872. Véase también Nakamura et al. (2000) *Nucleic Acid Res.* 28(1):292. Tablas de uso de codón para muchos organismos están disponibles, que pueden ser usadas como referencia para diseñar secuencias de la presente invención. El uso de codones prevaletentes de un microorganismo huésped dado incrementa en general la probabilidad de traducción y así el nivel de expresión de las secuencias deseadas.

La preparación de los ácidos nucleicos presentes se pueden llevar a cabo mediante una variedad de técnicas recombinantes de rutina y procedimientos sintéticos. Brevemente, los ácidos nucleicos sujetos pueden ser preparados a partir de fragmentos de ADN genómicos, cADN y ARN, todos los cuales pueden ser extraídos directamente de una célula o producidos recombinantemente mediante varios procesos de amplificación en los que se incluyen pero no limitados a PCR y rt-PCR (reacción en cadena de polimerasa a temperatura ambiente).

La síntesis química directa de ácidos nucleicos involucra comúnmente la adición secuencial de monómeros de nucleótidos 3'-bloqueados y 5'-bloqueados al grupo 5'-hidroxilo terminal de una cadena polimérica de nucleótidos creciente, en donde cada adición es efectuada mediante ataque nucleofílico

del grupo 5'-hidroxilo terminal sobre la cadena creciente en la posición 3' del monómero agregado, que es comúnmente un derivado de fósforo, tal como fosfotriéster, fosforamidita o los semejantes. Tal metodología es conocida por aquellos de habilidad ordinaria en el arte y es descrita en los textos y literatura pertinentes (por ejemplo, Matteuci et al. (1980) Tet. Lett. 521: 719; Patente Estadounidense No. 4,500,77 expedida a Caruthers et al. y Patentes Estadounidenses Nos. 5,436,327 y 4,700,637 expedida a Southern et al.).

10 El nivel de transcripción de un ácido nucleico en un microorganismo huésped debe ser incrementado en una diversidad de maneras. Por ejemplo, esto puede ser obtenido al incrementar el número de copias de la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima (por ejemplo, al utilizar un número de copia mayor de
15 vectores de expresión que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifican la enzima o al introducir copias adicionales de una secuencia de nucleótidos que codifican la enzima al genoma del organismo huésped, por ejemplo, mediante recombinación recA-moderada, el uso de vectores de "suicidio",
20 recombinación utilizando recombinasa de fago lambda y/o inserción vía un transposón o elemento transposable). Además, se puede llevar a cabo al cambiar el orden de las regiones de codificación sobre el mRNA policistrónico de un operón o al romper un operón en genes individuales, cada uno con sus
25 propios elementos de control o incrementar la resistencia del

promotor (inicio de transcripción o secuencia de control de transcripción) a la cual la región de codificación de enzima es enlazada operativamente (por ejemplo, utilizando un promotor de arabimosa- o lactosa- inducible de consenso en un microorganismo huésped de *Escherichia coli* en lugar de un promotor lactosa- inducible modificado, tal como el encontrado en pBluescript y los plásmidos pBBR1MCS) o utilizando un promotor inducible e inducir el promotor inducible al agregar un químico a un medio de crecimiento. El nivel de reducción de una secuencia de nucleótidos en un microorganismo huésped puede ser incrementado en un número de maneras, en los que se incluyen pero no limitados a incrementar la estabilidad de mRNA, modificar la secuencia del sitio de enlace de ribosoma, modificar la distancia o secuencia entre el sitio de enlace de ribosoma y el codón de inicio de la secuencia de codificación de enzima, modificar toda la región inter-cistronica localizada "corriente arriba de" o adyacente al lado 5' del codón de inicio de la región de codificación de enzima, estabilizar el extremo 3' del transcripto mRNA utilizando secuencias de horquilla y secuencias especializadas, modificar el uso de codón de enzima, alterar la expresión de tARN de codón raro utilizados en la biosíntesis de la enzima y/o incrementar la estabilidad de la enzima, tal como por ejemplo vía mutación de su secuencia de codificación. La determinación de codones preferidos y tARN de codón raro puede estar basada en un

análisis de secuencia de genes derivados del microorganismo huésped.

La actividad de un MEV, DXP o preniltransferasa en un huésped puede ser alterada en una diversidad de maneras, en los
5 que se incluyen pero no limitados a, expresar una forma modificada de la enzima que exhibe solubilidad incrementada en la célula huésped, expresar una forma alterada de la enzima que carece de un dominio por medio del cual la actividad de la enzima es inhibida, expresar una forma modificada de la enzima
10 que tiene una Kcat más alta o una Km más baja para el sustrato o expresar una forma alterada de la enzima que no es afectada por retroalimentación o regulación de alimentación hacia adelante por otra molécula en la ruta. Tales enzimas variantes pueden también ser aisladas por medio del metagénesis aleatoria
15 de una enzima de especificidad más amplia, como se describe posteriormente en la presente y una secuencia de nucleótidos que codifica al enzima variante puede ser expresada de un vector de expresión o de un gen recombinante integrado al genoma de un microorganismo huésped.

20 El vector sujeto puede ser construido para producir un nivel deseado de números de copia de la enzima codificada. En algunas modalidades, los vectores sujetos producen por lo menos 10, entre 10 a 20, entre 20-50, entre 50-100 o aún más alto de 100 copias de la HMG-CoA reductasa, mevalonato sinasa o
25 ambos. Plásmidos de bajo número de copia proporcionan en

general menos de aproximadamente 20 copias de plásmido por célula; los plásmidos de números de copia medio proporcionan en general de aproximadamente 20 copias de plásmido por célula a aproximadamente 50 copias de plásmido por célula o de
 5 aproximadamente 20 copias de plásmido por célula a aproximadamente 80 copias de plásmido por célula y plásmidos de número de copia alto en general proporcionan de aproximadamente 80 copias de plásmido por célula a aproximadamente 200 copias de plásmido por célula o más.

10 Vectores de expresión de bajo número de copias apropiados para *Escherichia coli* incluyen pero no están limitados a pACYC184, pBeloBac1 1, pBR332, pBAD33, pBBR1MCS y sus derivados, pSC101, SuperCos (cósmidos), y pWE15 (cósmido). Vectores de expresión de copias medias apropiados para
 15 *Escherichia coli* incluyen pero no están limitados a pTrc99A, pBAD24 y vectores que contienen un origen de CoIE1 de replicación y sus derivados. Vectores de expresión de alto número de copia apropiados para *Escherichia coli* incluyen pero no están limitadas a vectores pUC, pBluescript, pGEM, and pTZ.
 20 Vectores de expresión de bajo número de copias apropiados (Centro Médico) para levadura incluyen pero no están limitados a pRS415 y pRS416 (Sikorski & Hieter (1989) Genetics 122.19-27). Vectores de expresión microscópicos de alto número de copias son empleados en levadura incluyen pero no están
 25 limitados a pRS425 and pRS426 (Chnsteinson et al. (1992) Gene

110:119-122). Vectores de expresión de dos micras alternativos incluyen variantes no seleccionables del vector de dos micras (Bruschi & Ludwig (1988) Curr. Genet 15:83-90) o plásmidos de dos micras intactos que llevan un cassette de expresión (tal como se ejemplifica en la Solicitud de Patente Estadounidense número 20050084972) o plásmidos de 2 micras que llevan un marcador de selección defectuoso tal como LEU2d (Erhanrt et al. (1983) J. Bacteriol 156 (2): 625-635) o URA3d (Okkels (1996) Annals of the New York Academy of Sciences 782(1)- 202- 207).

Elementos reguladores incluyen como por ejemplo promotores y operadores pueden también ser diseñados para incrementar el flujo metabólico de la ruta MEV o DXP al incrementar la expresión de uno o más genes que juegan un papel significativo para determinar el rendimiento global de un isoprenoide producido. Un promotor es una secuencia de nucleótidos que inicia y controla la transcripción de una secuencia de ácido nucleico por una enzima de ARN polimerasa. Un operador es una secuencia de nucleótidos adyacente al promotor que funciona para controlar la transcripción de la secuencia de ácidos nucleicos deseada. El operador contiene un dominio de enlace de proteína en donde una proteína represora específica se puede enlazar. En ausencia de una proteína represora apropiada, la transcripción se inicia por medio del promotor. En presencia de una proteína represora apropiada, la

proteína represora se enlaza al operador e inhibe mediante esto la transcripción del promotor. Promotores y operadores son también denominados como reguladores de transcripción.

En algunas modalidades de la presente invención, los
5 promotores usados en vectores de expresión son inducibles. En otras modalidades, los promotores usados en vectores de expresión son constitutivos. En algunas modalidades, una o más secuencias de ácido nucleico son enlazadas operativamente a un promotor inducible y una o más de otras secuencias de ácido
10 nucleico son enlazadas operativamente a un promotor constitutivo.

Ejemplos no limitantes de promotores apropiados para uso en células huésped procarióticas incluyen un promotor de ARN polimerasa de T7 bacteriófago; un promotor de trp; un
15 promotor de operón de lac; un promotor híbrido, por ejemplo, un promotor híbrido lac/tac, un promotor híbrido de tac/trc, un promotor de trp/lac; un promotor de T7/lac, un promotor de trc, un promotor de tac y los semejantes y un promotor de araBAD; promotores regulados in vivo, tales como un promotor ssaG o un
20 promotor relacionado (véase, por ejemplo Publicación de Solicitud de Patente Estadounidense No. 20040131637), un promotor de pagC (Pulkkinen and Miller, J. Bacteriol. (1991) 173(1):86-93; Alpuche-Aranda et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 89(21):10079-83), un promotor de nirB (Harborne et
25 al. (1992) MoI Micro. 6:2805-2813), y los semejantes (véase,

por ejemplo, Dunstan et al (1999) Infect. Immun. 67:5133-5141; McKelvie et al. (2004) Vaccine 22:3243-3255; y Chatfield et al. (1992) Biotechnol. 10:888-892); un promotor de sigma70, por ejemplo un promotor de sigma70 de consenso (véase, por ejemplo, 5 GenBank número de acceso AX798980, AX798961, y AX798183); un promotor de fase estacionaria, por ejemplo, un promotor dps, un promotor spv y los semejantes; un promotor derivado de la isla de patogenicidad SPI-2 (véase, por ejemplo WO96/17951); un promotor actA (véase, por ejemplo, Shetron-Rama et al. (2002) 10 Infect. Immun. 70:1087-1096); un promotor rpsM (véase, por ejemplo, Valdivia and Falkow (1996) Mol. Microbiol 22:367-378); un promotor tet (véase, por ejemplo, Hillen et al. (1989). In Saenger W. y Heinemann U. (eds) Topics in Molecular and Structural Biology, Protein-Nucleic Acid Interaction. Macmillan, 15 London, UK, Vol. 10, pp. 143-162); un promotor SP6 (véase, por ejemplo, Melton et al. (1984) Nucl. Acids Res. 12:7035-7056), y los semejantes.

En algunas modalidades, la actividad total de una enzima MEV o DXP heteróloga que juega un papel más grande en el 20 rendimiento global de un isoprenoide en relación con otras enzimas en la ruta respectiva es incrementada al expresar la enzima de un promotor fuerte. Promotores fuertes apropiados para *Escherichia coli* incluyen, pero no están limitados a Trc, Tac, T5, T7, y P_{Lambda}. En otra modalidad de la presente 25 invención, la actividad total de la una o más enzimas de ruta

de MEV en un huésped es incrementada al expresar la enzima de un promotor fuerte sobre un plásmido de alto número de copias. Ejemplos apropiados para *Escherichia coli* incluyen, pero no están limitados a usar promotores Trc, Tac, T5, T7, y P_{Lambda} con
 5 vectores pBAD24, pBAD18, pGEM, pBluescript, pUC, y pTZ.

Ejemplos no limitantes de promotores apropiados para uso en células huéspedes eucarióticas incluyen, pero no están limitados a un promotor prematuro inmediato de CMV, un promotor de timidina cinasa de HSV, un promotor de SV40 prematuro o
 10 tardío, LTRD retrovirus y un promotor de metalotioneína-I de ratón.

Ejemplos no limitantes de promotores constitutivos apropiados para uso en células huésped procarióticas incluyen un promotor sigma70, (por ejemplo un promotor de sigma70 de
 15 consenso). Ejemplos no limitantes de promotores inducibles apropiados para uso en células huésped bacterianas incluyen el pL de bacteriófago λ ; Plac; Ptrp; Ptac (promotor híbrido de Ptrp-lac); un promotor de isopropil-beta D44 tiogalactopiranoside (IPTG)-inducible, por ejemplo, un promotor
 20 lacZ; un promotor inducible de tetraciclina; un promotor inducible de arabinosa, por ejemplo, PBAD (véase, por ejemplo, Guzman et al. (1995) J. Bacteriol. 177:4121-4130); un promotor xilosa-inducible, por ejemplo, Pxyl (véase, por ejemplo, Kim et al. (1996) Gene 181:71-76); un promotor de GAL1; un promotor de
 25 triptófano; un promotor lac; un promotor alcohol-inducible, por

ejemplo, un promotor metanol-inducible; un promotor etanol-inducible; un promotor de rafinosa-inducible; un promotor inducible por calor, por ejemplo promotor PL lambda inducible por calor; un promotor controlado por un represor sensible al calor (por ejemplo, vectores de expresión a base de CI857-reprimidos lambda, por ejemplo véase, Hoffmann et al. (1999) FEMS Microbiol Lett. 177(2):327-34); y los semejantes.

Ejemplos no limitantes de promotores constitutivos apropiados para uso en células huésped de levadura incluyen un promotor de ADH1, ADH2, PGK, o LEU2. Ejemplos no limitantes de promotores inducibles apropiados para uso en células huésped de levadura incluyen pero no están limitados a un promotor galactosa-inducible divergente tal como GAL 1 o un promotor de GAL 10 (West et al. (1984) Mol. Cell. Biol. 4(11):2467-2478), o un promotor de CUP1. En donde se desee, el vector sujeto comprende un promotor que es más fuerte que un promotor de Lac de *E. coli* natural.

Ejemplos no limitantes de operadores para uso en células huésped bacterianas incluyen un operador de promotor de lactosa (la proteína represora LacI cambia de conformación cuando se pone en contacto con lactosa, impidiendo mediante esto que la proteína represora LacI se enlace al operador), un operador promotor de triptófano (cuando es acoplado con triptófano, la proteína represora de TrpR tiene una conformación que se enlaza al operador; en ausencia del

triptófano, la proteína represora de TrpR tiene una conformación que no se enlaza al operador) y un operador de tac (véase, por ejemplo deBoer et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:21-25.).

5 Los genes en el vector de expresión también codifican comúnmente un sitio de enlace de ribosoma para dirigir la traducción (esto es, síntesis) de cualquier producto de gen de mRNA codificado. Para sitios de enlace de ribosoma apropiados para uso en *Escherichia coli*, véase Shine et al. (1975) Nature
10 254:34, y Steitz, in *Biological Regulation y Development: Gene Expression* (ed. R. F. Goldberger), vol. 1, p. 349, 1979, Plenum Publishing, N. Y. La inserción del sitio de enlace de ribosoma que codifica la secuencia de nucleótidos 5'-AAAACA-3' corriente arriba de una secuencia de codificación facilita una traducción
15 eficiente en un microorganismo huésped de levadura (Looman et al. (1993) Nuc. Ac. Res. 21:4268-4271; Yun et. al. (1996) MoI. Microbiol. 19:1225-1239).

Otros elementos reguladores que pueden ser usados en un vector de expresión incluyen elementos mejoradores de
20 transcripción y terminadores de transcripción. Véase, por ejemplo Bitter et al. (1987) *Methods in Enzymology*, 153:516-544.

Un vector de expresión puede ser apropiado para uso en tipos particulares de microorganismos huésped y no otros.
25 Aquél de habilidad ordinaria en el arte, sin embargo, puede

determinar fácilmente por medio de experimentación de rutina si un vector de expresión particular es apropiado para un organismo huésped dado. Por ejemplo, el vector de expresión puede ser inducido al organismo huésped, que es luego
5 monitoreado en cuanto a viabilidad y expresión de cualesquier genes contenidos en el vector.

El vector de expresión puede también contener uno o más genes marcadores seleccionables que, después de la expresión, confieren uno o más rasgos genotípicos útiles para
10 seleccionar o identificar de otra manera células huésped que portan el vector de expresión. Ejemplos no limitantes de marcadores seleccionables apropiados para células eucarióticas incluyen dihidrofoliato reductasa y resistencia a neomicina. Ejemplos no limitantes de marcadores seleccionables apropiados
15 para células procarióticas incluyen tetraciclina, ampicilina, cloranfenicol, carbenicilina y resistencia a canamicina.

Para la producción de isoprenoide a escala industrial, puede ser impráctico o demasiado costoso utilizar un marcador seleccionable que requiere la adición de un
20 antibiótico al medio de fermentación. Así, algunas modalidades de la presente invención emplean células huésped que no requieren el uso de un marcador seleccionable que confiere resistencia a antibiótico para asegurar mantenimiento del plásmido (vector de expresión). En estas modalidades de la
25 presente invención, el vector de expresión contiene un sistema

de mantenimiento de plásmido tal como el plásmido 60-kb IncP (RK2), opcionalmente junto con un sistema de replicación/segregación de plásmido RK2, para efectuar la retención del plásmido en ausencia de selección de antibiótico

5 (véase, por ejemplo, Sia et al. (1995) J. Bacteriol. 177:2789-97; Pansegrau et al. (1994) J. Mol. Biol. 239:623-63). Un sistema de mantenimiento de plásmido apropiado para este propósito es codificado por el operon *parDE* de RK2, que codifica para una toxina estable y una antitoxina inestable. La

10 antitoxina puede inhibir la acción mortal de la toxina mediante interacción de proteína-proteína directa. Las células que pierden el vector de expresión que alberga el operon *parDE* son rápidamente privados de la antitoxina inestable, dando como resultado que la toxina estable provoca luego muerte celular.

15 El sistema de replicación del plásmido RK2 es codificado por el gen *trfA*, que codifica una proteína de replicación de ADN. El sistema de segregación del plásmido de RK2 es codificado por el operon *parCBA*, que codifica proteínas que funcionan para resolver multímeros de plásmido que pueden surgir de la

20 replicación de ADN.

Los vectores sujeto pueden ser introducidos a una célula huésped estable o transitoria mediante una variedad de técnicas establecidas. Por ejemplo, un método involucra un tratamiento con cloruro de calcio en donde el vector de

25 expresión es introducido vía un precipitado de calcio. Otras

sales, por ejemplo fosfato de calcio, pueden también ser usadas siguiendo un procedimiento similar. Además, la electroporación (esto es, la aplicación de corriente para incrementar la permeabilidad en las células a ácidos nucleicos) puede ser usada. Otros métodos de transformación incluyen microinyección, transformación moderada por dextrana DEAE y choque térmico en presencia de acetato de litio. Complejos de lípido, liposomas y dendrímeros pueden también ser empleados para transfectar el microorganismo huésped.

Después de la transformación, una variedad de métodos se puede llevar a la práctica para identificar las células huésped a las cuales los vectores sujeto han sido introducidos. Un método de selección ejemplar involucra sub-cultivar células individuales para formar colonias individuales, seguido por pruebas en cuanto a la expresión del producto genético deseado. Otro método abarca seleccionar células huésped transformadas en base a rasgos fenotípicos conferidos por medio de la expresión de genes marcadores seleccionables contenidos dentro del vector de expresión. Aquellos de habilidad ordinaria pueden identificar células huésped modificadas genéticamente utilizando estos u otros métodos disponibles en el arte.

La introducción de varias secuencias de rutas de la invención en una célula huésped puede ser confirmada mediante métodos tales como PCR, Southern blot o hibridización de Northern blot. Por ejemplo, ácidos nucleicos pueden ser

preparados a partir de las células huésped resultantes y las
secuencias específicas de interés pueden ser amplificadas
mediante PCR utilizando cebadores específicos para las
secuencias de interés. El producto amplificado es sometido a
5 electroforesis de gel de agarosa, electroforesis de gel de
poliacrilamida o electroforesis capilar, seguido por teñido con
bromuro de etidio, solución verde SYBR o los semejantes o
detección de ADN con una detección de UV. Alternativamente,
sondas de ácido nucleico específicas para las secuencias de
10 interés pueden ser empleadas en una reacción de hibridización.
La expresión de una secuencia genética específica puede ser
determinada al detectar el mRNA correspondiente vía PCR
acoplada a transcripción inversa, hibridización de Northern
blot o mediante inmunoanálisis utilizando anticuerpos reactivos
15 con el producto genético codificado. Inmunoanálisis ejemplares
incluyen pero no están limitados a ELISA, radioinmunoanálisis e
inmunoanálisis de emparejado.

La actividad enzimática de una enzima de ruta dada
puede ser analizada mediante una variedad de métodos conocidos
20 en el arte. En general, la actividad enzimática puede ser
determinada mediante la formación del producto o conversión de
un sustrato de una reacción enzimática que está bajo
investigación. La reacción puede tomar lugar in vitro o in
vivo. Por ejemplo, la actividad relativa de HMG-CoA reductasa y
25 HMB-CoA sintasa en una célula puede ser medida mediante el

nivel de estado estable de HMG-CoA en una célula. HMG-CoA puede ser extraído mediante ácido tricloroacético (TCA) seguido por análisis del material extraído mediante cromatografía líquida/espectrometría de masas. La actividad de mevalonato 5 cinasa puede ser demostrada mediante la formación de mevalonato 5-fosfato. La actividad relativa de mevalonato cinasa y HMG-CoA reductasa puede ser medida mediante el nivel de estado estable de mevalonato, que puede ser determinado mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas. Véase por ejemplo WO 10 05033287, que es incorporado en la presente por referencia.

El rendimiento de un isoprenoide vía una o más rutas metabólicas reveladas en la presente puede ser aumentado al inhibir reacciones que desvían los intermediarios de etapas productivas hacia formación del producto de isoprenoide. La 15 inhibición de las reacciones no productivas puede ser obtenida al reducir la expresión y/o actividad de enzimas involucradas en una o más reacciones no productivas. Tales reacciones incluyen reacciones secundarias de ciclo de TCA que conduce a biosíntesis de ácido graso, biosíntesis de alanina, la súper- 20 ruta de aspartato, gluconeogenesis, biosíntesis de heme, y/o biosíntesis de glutamato, a un nivel que afecta el rendimiento global de la producción de isoprenoide. Adicionalmente, la conversión de acetil-CoA a acetato vía la acción de fosfotransacetilasa es otro ejemplo de reacción secundaria no 25 productiva. Por consiguiente, en donde se desea la "expulsión"

o "supresión" del gen *pta* que codifica fosfotransacetilasa puede también ser llevado a cabo con el fin de incrementar el rendimiento de la producción de isoprenoide. Dependiendo del isoprenoide específico de interés, aquel experimentado en el arte puede escoger las etapas no productivas adicionales objetivo. Por ejemplo, en donde el carotenoide es el isoprenoide de elección, se puede optar por "expulsar" o "suprimir" uno o más genes seleccionados del grupo que consiste de *gdhA*, *aceE*, *fdhF*, *yjiD*, *hnr* o *yjfP*, *ackA*, *appY*, *aspC*, *clp*,
 5 *clpP*, *clpXP*, *crcB*, *csdA*, *cyaA*, *evgS*, *fdhA*, *fdhD*, *feoB*, *fumA*,
 10 *glnE*, *gbcR*, *gntK*, *hycl*, *lipB*, *lysU*, *modA*, *moeA*, *nadA*, *nuoC*,
nuoK, *pflB*, *pitA*, *pst*, *pstC*, *pta*, *p-yjiD*, *sohA*, *stpA*, *yagR*,
yaiD, *ybaS*, *ycfZ*, *ydeN*, *yebB*, *yedN*, *yfcC*, *ygiP*, *yibD*, *yjfP*,
yjhH o *yliE*, o cualquier otros genes solos o en combinación, la
 15 inhibición de los cuales daría como resultado un rendimiento más alto de carotenoide como se describe en la solicitud de patente estadounidense 20060121558, que es incorporado en la presente por referencia.

Una variedad de métodos están disponibles para
 20 expulsar o suprimir un gen de interés. Por ejemplo, una expresión de gen reducida puede ser llevado a cabo mediante cancelación, mutación y/o rearreglo genético. También se puede llevar a cabo con el ARN antisentido, siARN, miRNA, ribozimas, ADN de triple hebra e inhibidores de transcripción y/o
 25 traducción. Además, se pueden emplear transposones para someter

a disrupción la expresión genética, por ejemplo, al insertarlo entre la región de promotor y la región de codificación o entre dos genes adyacentes para desactivar uno o ambos genes.

5 **Altos Rendimientos de Compuestos de Isoprenoide**

La presente invención proporciona composiciones y métodos para una producción robusta de isoprenoides mediante el uso de enzimas de ruta de isopentenil pirofosfato que están bajo el control de por lo menos un regulador heterólogo o
10 condiciones de fermentación, ya sea solos o en combinación.

En un aspecto, un método de producción de un isoprenoide involucra las etapas de (a) obtener una pluralidad de células huésped que comprenden una ruta enzimática para fabricar isopentenil pirofosfato en donde todas las enzimas de
15 ruta están bajo el control de por lo menos un regulador de transcripción heterólogo y (b) cultivar las células huésped en un medio bajo condiciones que son sub-óptimas en comparación con las condiciones que proporcionarían una velocidad de crecimiento específica máxima para las células huésped. En
20 algunas modalidades, la ruta es la ruta de mevalonato. En otras modalidades, la ruta es la ruta de DXP. En otras modalidades, la por lo menos una secuencia reguladora transcripcional heteróloga es inducible. En otras modalidades, las enzimas de ruta están bajo el control de un solo regulador de
25 transcripción. En otras modalidades, las enzimas de ruta están

bajo el control de múltiples reguladores de transcripción heterólogos.

En algunas modalidades, la ruta comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una enzima de ruta de mevalonato de un procarionte que tiene una ruta de mevalonato endógena. Ejemplos no limitantes de procariontes apropiados incluyen aquellos de los géneros: *Actinoplanes*, *Archaeoglobus*, *Bdellovibrio*, *Borrelia*; *Chloroflexus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Oceanobacillus*; *Paracoccus*; *Pseudomonas*, *Staphylococcus*; *Streptococcus*, *Streptomyces*, *Thermoplasma*; y *Vibrio*. Ejemplos no limitantes de especies específicas incluyen: *Archaeoglobus fulgidus*; *Bdellovibrio bacteriovorus*; *Borrelia burgdorferi*; *Chloroflexus aurantiacus*; *Enterococcus faecalis*; *Enterococcus faecium*; *Lactobacillus johnsonii*; *Lactobacillus plantarum*; *Lactococcus lactis*, *Listeria innocua*; *Listeria monocytogenes*; *Oceanobacillus iheyensis*, *Paracoccus zeaxanthinifaciens*; *Pseudomonas mevalonum*; *Staphylococcus aureus*; *Staphylococcus epidermidis*; *Staphylococcus haemolyticus*; *Streptococcus agalactiae*; *Streptomyces gneseolosporeus*; *Streptococcus mutans*; *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*; *Thermoplasma acidophilum*, *Thermoplasma volcanium*, *Vibrio cholerae*; *Vibrio parahaemolyticus* y *Vibrio vulnificus*.

En otra modalidad, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica una enzima de ruta de mevalonato es seleccionada

de acetil-CoA tiolasa, HMG-CoA sintasa, HMG-CoA reductasa y mevalonato cinasa. En otra modalidad, la secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima de ruta de mevalonato es seleccionada de acetil-CoA tiolasa, HMG-CoA sintasa, HMG-CoA reductasa y mevalonato cinasa y es de un procarionte perteneciente al género *Enterococcus* o el género *Pseudomonas* o el género *Staphylococcus*. En otra modalidad, la secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima de ruta de mevalonato es seleccionada de acetil-CoA tiolasa, HMG-CoA sintasa, HMG-CoA reductasa y mevalonato cinasa y es de *Enterococcus faecalis* o de *Staphylococcus aureus*.

En otra modalidad, secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima de ruta de mevalonato es HMG-CoA reductasa de Clase II. Las HMG-CoA reductasa son clasificadas en general en dos clases, que son distinguibles en base a propiedades de homología de secuencia y/o propiedades enzimáticas (véase, por ejemplo, Hedl, et al., J. Bacteriology, 1927-1932, 2004 y Bochar, et al., Molec. Genet. Metab, 66, 122-127, 1999).

Las HMG-CoA reductasas de Clase II pueden ser caracterizadas en parte por su baja sensibilidad a estatinas, en las que se incluye pero no limitados a Atorvastatina, Cemvastatin, Fluvastatina, Lovastatina, Pravastatina, Simvastatina, en algunas modalidades, la HMG-CoA reductasa de Clase II exhibe una constante de inhibición de estatina mayor de aproximadamente 1 micromolar, 10 micromolar o 100

micromolar. En otras modalidades, la HMG-CoA reductasa de Clase II tiene una constante de inhibición para Lovastatina mayor que aquella de la HMG-CoA de Clase I por un factor de por lo menos aproximadamente 10, 100, 1000 ó 10,000. En otras modalidades, la HMG-CoA reductasa de Clase II tiene una constante de inhibición para Lovastatina mayor que aquella de la HMG-CoA de Clase I aislada de un *Homo sapien* por un factor de por lo menos aproximadamente 10, 100, 1000 ó 10,000. En otras modalidades, la HMG-CoA reductasa de Clase II es de un procarionte. En otras modalidades, la HMG-CoA reductasa de Clase II es de bacteria de archae.

Una HMG-CoA reductasa de Clase II prototípica es derivada de *Pseudomonas mevalonii*. También abarcadas en la invención se encuentran HMG-CoA reductasas de Clase II variantes que exhiben por lo menos aproximadamente 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 80%, 90% ó 95% de identidad en comparación con la secuencia de aminoácidos de la HMG-CoA reductasa de *P. mevalonii*. Abarcados además en la invención se encuentran variantes que tienen menos de aproximadamente 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, o menos de identidad con una HMG-CoA reductasa de *Homo Sapiens*. Las identidades de secuencias de aminoácidos pueden ser determinadas mediante los métodos descritos en Bochar, et al., Molec. Genet. Metab., 66, 122-127, 1999.

HMG-CoA reductasas de Clase II ejemplares no

limitantes incluyen aquellas derivadas de HMG-CoA reductasas de: *Archaeoglobus fulgidus* (NC_000917), *Bdellovibrio bactenovor* (BX842650); *Borrelia burgdorferi* (AE001169); *Chloroflexus aurantiacus* (AJ299212); *Enterococcus faecalis* 5 (AAO81155); *Enterococcus faecium* (AF290094); *Lactobacillus johnsonii* (AE017204); *Lactobacillus plantarum*; *Lactococcus lactis* (AE006387); *Listeria innocua* (CAC96053); *Listeria monocytogenes* (AE017324); *Oceanobacillus iheyensis* (NC_000917), *Paracoccus zeaxanthinifaciens* (AJ431696); *Pseudomonas mevalonii* 10 (M24015); *Staphylococcus aureus* (AF290086); *Staphylococcus epidermidis* (AF290090); *Staphylococcus haemolyticus* (AF290088); *Streptococcus agalactiae* (CAD47046); *Streptomyces griseolosporeus* (AB037907); *Streptococcus mutans* (AAN58647); *Streptococcus pneumoniae* (AF290098); *Streptococcus pyogenes* 15 (AF290096); *Thermoplasma acidophilum* (CAC1 1548), *Thermoplasma volcanium* (AL935253); *Vibrio cholerae* (AAF96622); *Vibrio parahaemolyticus* (BAC62311); y *Vibrio vulnificus* (AAO07090).

Los métodos de fermentación descritos en la presente son concernientes con la modulación de la velocidad de 20 crecimiento específico de las células huésped.

Frecuentemente representada por el parámetro μ , la velocidad de crecimiento específica representa la velocidad de crecimiento de células por unidad de biomasa por tiempo unitario. La velocidad de crecimiento específica tiene unidades 25 de recíproco del tiempo ($1/t$). La velocidad de crecimiento

específica máxima para células en un medio de cultivo se relaciona con el efecto de la concentración del sustrato sobre la velocidad del crecimiento. En general, las células crecerán lentamente a un bajo nivel del sustrato y a medida que el nivel del sustrato en el medio se incrementa, así también se incrementa la velocidad de crecimiento celular. Sin embargo, la velocidad de crecimiento celular no continúa elevándose indefinidamente y a altos niveles de sustrato, un incremento dado en la cantidad de sustrato producirá un incremento cada vez más pequeño en la velocidad de crecimiento celular. Por consiguiente, la velocidad de crecimiento alcanza finalmente un límite, que es denominado frecuentemente como la velocidad de crecimiento específica máxima. Un tratamiento teórico de la relación entre la velocidad de crecimiento en el cultivo es bien conocido para aquellos experimentados en el arte y es denominado como la ecuación de Monod. Véase, por ejemplo, Pirt, Principles de Microbe and Cell Cultivation, Wiley, NY, 1975, páginas 4-10. En este tratamiento teórico, la velocidad específica máxima es un límite asintomático que nunca se alcanza hasta que se alcanza un nivel infinito de sustrato. Sin embargo, en la práctica, la velocidad de crecimiento específica máxima puede ser considerada al ser obtenida cuando las condiciones bajo investigación (por ejemplo, un nivel o temperatura del sustrato) soporte la velocidad de crecimiento inicial más rápida. Por ejemplo, en un reactor de alimentación

por lote, la condición inicial en donde los nutrientes son suministrados en exceso es tratada como las condiciones para la velocidad de crecimiento máxima. Véase, por ejemplo, Lee et al. (1996) *Trends Biotechnol.* 14: 98-105 y Korz et al. (1995) *J Biotechnology* 39 59-65. Las condiciones en donde un sustrato es agregado para soportar la velocidad de crecimiento específica máxima es también algunas veces denominada como crecimiento ilimitado. Además, en tanto que la ecuación de Monod describe las propiedades de velocidad teóricas para un sustrato que se aproximan asintóticamente a la velocidad específica máxima, para muchos sustratos, en lugar de aproximarse al valor a medida que más sustrato es agregado, una disminución en la velocidad es observado a niveles más altos del sustrato después que se obtiene una velocidad máxima, esto es, la velocidad de crecimiento específica máxima se obtiene seguida por una disminución en velocidad de crecimiento.

La velocidad de crecimiento específica máxima puede también ser aplicada con respecto a la temperatura también como a sustratos. En general, un organismo crecerá lentamente a bajas temperaturas y crecerá a una velocidad más rápido a medida que la temperatura se incrementa hasta un cierto punto, después de lo cual la velocidad de crecimiento disminuirá. Habrá una temperatura a la cual la velocidad de crecimiento estará a un nivel máximo, esta es la temperatura a la cual sostiene la velocidad de crecimiento máxima. Se ha encontrado

que la producción de isoprenoides puede ser incrementada al disminuir la temperatura por debajo de la temperatura que soporta la velocidad de crecimiento específica máxima.

La velocidad de crecimiento específica máxima puede
5 también ser aplicada con respecto a otros aditivos a la fermentación que los sustratos. Por ejemplo, con respecto a nutrientes, vitaminas y minerales, que pueden estar a una baja proporción a bajas cantidades de estos componentes, la velocidad se volverá más alta a medida que la concentración del
10 componente es incrementada, luego, en algunos casos, a concentraciones aún más altas de estos componentes, la velocidad disminuirá. La velocidad de crecimiento específica máxima es obtenida en donde la concentración del componente soporta la velocidad más alta.

15 La velocidad de crecimiento específica máxima para una célula en un medio es frecuentemente determinada a las etapas iniciales de la fermentación antes de la inhibición por el producto final o intermediario, población de la célula u otros factores contribuyen a disminuir la velocidad de
20 crecimiento. Por ejemplo, la velocidad de crecimiento máxima es frecuentemente determinada durante la fase exponencial de crecimiento en lugar de en la fase de retardo, fase de desaceleración o la fase estacionaria. El concepto de velocidad de crecimiento específica máxima puede también ser aplicado a
25 etapas posteriores de la fermentación al tomar en cuenta las

variables apropiadas.

Así, en algunas novedades, las células huésped son cultivadas bajo condiciones de tal manera que el crecimiento es menor de aproximadamente 90% de la velocidad de crecimiento específica máxima. En otras modalidades, las células huésped son cultivadas bajo condiciones de tal manera que el crecimiento es menor de aproximadamente 80%, 75%, 60%, 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 10%, 5%, o 1%, o menor, de la velocidad de crecimiento específica máxima.

En otras modalidades, las células huésped son cultivadas a una temperatura media que es de por lo menos aproximadamente 90% menor que la temperatura que proporcionaría la velocidad del crecimiento específica máxima. Al disminuir la temperatura el crecimiento es reducido lo que a su vez produce la formación de productos secundarios tóxicos en el medio y la generación de calor metabólico. La disminución de la temperatura de cultivo también reduce la demanda de oxígeno celular que permite que se obtengan densidades de célula más altas.

La temperatura a la cual la velocidad de crecimiento específica máxima de una célula huésped puede ser obtenida dependerá del tipo de célula huésped seleccionada. Esto puede ser determinado al cultivar las células huésped bajo varias temperaturas en un periodo de tiempo definido para averiguar las curvas de crecimiento relevantes. La temperatura que

soporta la velocidad de crecimiento específica máxima puede ser determinada al comparar las pendientes de crecimiento de las curvas respectivas. En el caso de *E. Coli*, la temperatura para la velocidad de crecimiento máxima específica es de aproximadamente 37°C. Así, si *E. Coli* es la célula huésped a ser usada para la producción por la fermentación de isoprenoide, la temperatura de fermentación es menor de 37°C. Si se usa este punto cervical, la temperatura para la velocidad de crecimiento específica máxima es de aproximadamente 30°C. Así, si *S. cerevisiae* es la célula huésped a ser usada para la producción por fermentación de isoprenoide, la temperatura de fermentación es menor de 30°C. Comúnmente una temperatura deseada es de aproximadamente 2°C, 4°C, 5°C, 6, 8, 10°C, 15°C, y 20°C menor que la temperatura a la cual se puede obtener la velocidad de crecimiento específica máxima de la célula huésped.

En otras modalidades, las células huésped son cultivadas en un medio de fermentación que comprende una fuente de carbono presente en una cantidad que es más baja que aquella que proporcionaría una velocidad de crecimiento específica máxima. En ciertas modalidades, las células huésped son cultivadas en un medio en donde la fuente de carbono es mantenida a un nivel para proporcionar menos de aproximadamente 90%, 80%, 75%, 60%, 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 10%, 5%, 1%, o menos de la velocidad de crecimiento específica máxima.

Cualesquier fuentes que contienen carbono que son digeribles por el microorganismo pueden ser usadas. Ejemplos no limitantes incluyen carbohidratos tales como monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos, ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido propiónico y alcoholes tales como etanol y propanol y polioles tales como glicerol.

En algunas modalidades, las fuentes de carbono comprenden principalmente monosacáridos u oligosacáridos. En otras modalidades, la fuente de carbono consiste esencialmente de monosacáridos y disacáridos. En todavía otras modalidades, la fuente de carbono está esencialmente libre de celulosa.

Los monosacáridos son los azúcares simples que sirven como bloques de construcción para carbohidratos. Son clasificados en base a su cadena fundamental de átomos de carbono (C): triosa que tiene tres átomos de carbono, tetrosa cuatro, pentosa cinco, hexosa seis, y heptosa siete. Los átomos de carbono son enlazados a átomos de hidrógeno (-H), grupos hidroxilo (-OH), y grupos carbonilo (-C=O), cuyas combinaciones, orden y configuraciones permiten que existan un gran número de estereoisómeros. Las pentosas incluyen xilosas, encontrada en materiales de madera; arabinosa encontrada en gomas de coníferas; ribosa, un componente de ARN y varias vitaminas y desoxirribosa, un componente de ADN. Hexosas ejemplares incluyen glucosa, galactosa y fructuosa. Los monosacáridos se combinan entre sí y otros grupos para formar una variedad de

disacáridos y oligosacáridos. Un oligosacárido es un polímero de sacárido que contiene un número pequeño (comúnmente de 3 a 10) de azúcares simples. Son generalmente encontrados ya sea O- o N-enlazado a cadenas laterales de aminoácidos compatibles en proteínas o porciones de lípido. Un oligosacárido preferido para uso en la presente reacción de fermentaciones disacárido, en los que se incluyen por ejemplo sacarosa o trisacárido tal como rafinosa.

En donde se desea tener celulosa, glicana, almidón u otros polisacáridos como la última fuente de carbono, estos polisacáridos pueden ser convertidos primero a monosacáridos y oligosacáridos por medios químicos o mediante métodos enzimáticos. Por ejemplo, la celulosa puede ser convertida a glucosa por la enzima celulasa. Así, si polisacáridos tales como celulosa encontrados en la biomasa (en los que se incluyen, por ejemplo, canola, alfalfa, arroz, centeno, sorgo, girasol, trigo, soya, tabaco, patata, cacahuete, algodón, patata dulce, mandioca, café, coco, árboles cítricos, cacao, te, frutas tales como plátano, higo, piña, guayaba, mango, avena, cebada, vegetales, ornamentales o coníferas) es usada como la última fuente de carbono, puede ser sometida a digestión por celulasa para generar azúcares más simples para uso en conjunción con el procedimiento de fermentación de la presente invención. En ciertas modalidades, después del rompimiento del polisacárido, el monosacárido y/u oligosacárido

constituye por lo menos aproximadamente el 50% en peso de la fuente de carbono como se determina al comienzo de la fermentación. En otras modalidades, el monosacárido y/u oligosacárido constituye por lo menos aproximadamente 80% o aún 5 90% en peso de la fuente de carbono tal como se determina al comienzo de la fermentación, de tal manera que el medio de fermentación está esencialmente libre de celulosa.

En otras modalidades, las células huésped son cultivadas en un medio de fermentación que comprende una fuente 10 de nitrógeno presente en una cantidad que es más baja que aquélla que proporcionaría una velocidad de crecimiento específica máxima. En tanto que no se está limitado por alguna teoría particular, es sabido que al cambiar los niveles de componentes tales como el nitrógeno que está disponible a una 15 célula puede cambiar el flujo relativo a través de las varias rutas químicas dentro de la célula. Se ha encontrado que al restringir el nivel de nitrógeno disponible al microorganismo, la cantidad de isoprenoide tal como amorfadieno producido por el microorganismo es incrementado. Niveles ejemplares de 20 nitrógeno de la presente invención incluyen una cantidad que soportaría aproximadamente 90%, 80%, 75%, 60%, 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 10%, 5%, 1%, o menos, de la velocidad del crecimiento específica máxima.

La restricción del nitrógeno puede ser implementada 25 por etapas. En algunas modalidades, el nitrógeno en forma de

amoniaco es provisto al comienzo de la fermentación para apoyar el crecimiento inicial, pero adiciones subsecuentes a la fermentación están libres de nitrógeno o están libres de nitrógeno ahorrado para que el nivel de amoniaco necesario para
5 mantener el pH de la fermentación a 7 con una solución de amoniaco. Para el global de la fermentación, el nivel de nitrógeno es mantenido a un nivel que es menor que la cantidad que soportaría la velocidad de crecimiento específica máxima. Las cantidades pueden ser por ejemplo cantidades que
10 soportarían por lo menos aproximadamente 90%, 80%, 75%, 60%, 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 20%, 10%, 5%, 1% o menos de la velocidad de crecimiento específica máxima. Una fermentación de la presente invención podría tener un nivel de nitrógeno inicial por encima de 10 mM, tal como es medida en el medio de
15 fermentación, para soportar un crecimiento inicial y un nivel de nitrógeno subsecuente menor de 50 mM, 40 mM, 30 mM, 20 mM, 10 mM o 4 mM en el medio de fermentación.

Fuentes de nitrógeno asimilable que pueden ser usadas en una mezcla de reacción de la fermentación apropiada
20 incluyen pero no están limitadas a fuentes de nitrógeno simple, fuentes de nitrógeno orgánicas y fuentes de nitrógeno complejas. Tales fuentes de nitrógeno amoniaco anhidro, sales de amoniaco de ácidos orgánicos e inorgánicos tales como cloruro de amonio, sulfato de amonio, acetato de amonio,
25 fosfato de amonio, otros compuestos que contienen nitrógeno y

sustancias de origen vegetal, animal y/o microbiano. Los aminoácidos pueden también ser usados como la fuente de nitrógeno, en los que se incluyen leucina, isoleucina o valina, o una mezcla de los mismos.

5 Cualquier método conocido para patrocinar un sustrato a la reacción de fermentación puede ser usado para mantener el sustrato menor del nivel que proporcionaría la velocidad de crecimiento específica máxima. Ejemplos ilustrativos incluyen el método por lotes, en donde todo el sustrato para la
10 fermentación es agregado en el comienzo de la reacción de la fermentación; el método de alimentación continua y el método de velocidad de alimentación variable, en donde, por ejemplo, se proporciona una cantidad incrementada de sustrato a medida que la fermentación procede con el fin de soportar la concentración
15 incrementada de células en el medio. Combinaciones de estos tres métodos son frecuentemente empleadas. Por ejemplo, es común tener una cierta cantidad de sustrato presente inicialmente en la fermentación, para permitir que los microorganismos agoten esta cantidad inicial de sustrato, luego
20 agregar subsecuentemente sustrato ya sea continuamente o agregarlo de manera variable después que la cantidad inicial de sustrato es utilizada. Es un aspecto de esta invención proporcionar una cantidad inicial de sustrato a las células en el medio de fermentación, que pueden estar presentes a un nivel
25 relativamente alto, para permitir que las células huésped usen

sustancialmente el sustrato inicial, luego proporcionar subsecuentemente el sustrato a las células huésped a un nivel que es óptimo en comparación con la cantidad que soportaría la velocidad de crecimiento máxima ya sea por una velocidad de alimentación continua o velocidad de alimentación variable. Se apreciará por aquellos de habilidad en el arte que puesto que las células pueden estar creciendo a una velocidad exponencial, puede ser ventajoso hacer variar la velocidad de alimentación a una velocidad exponencial en lugar de mantener la cantidad de sustrato en relación con el nivel de células huésped constante. Así, en ciertas modalidades, los sustratos son agregados de manera exponencialmente incrementada, pero todavía a un nivel que es más bajo que el nivel que proporcionaría la velocidad de crecimiento específica máxima.

En algunas modalidades, la reacción de la fermentación es dada una alimentación reducida a la fuente de carbono en relación con la alimentación de carbono que proporcionaría la velocidad de crecimiento específica máxima. En tanto que no se pretende estar limitados por una teoría particular, es conocido que al cambiar los niveles de nutrientes disponibles a una célula cambiará el flujo relativo a través de las varias rutas químicas dentro de la célula. Por ejemplo, algunas enzimas son inducibles y serán solamente activas cuando ciertos nutrientes están presentes. Se ha observado que al disminuir la velocidad de alimentación de la

fuelle de carbono a un microorganismo puede mejorar la cantidad de isoprenoide producido en la fermentación. En la práctica, la fuente de carbono puede ser suministrada inicialmente en una cantidad suficiente para soportar un crecimiento inicial de las
5 células huésped hasta que tal fuente de carbono inicial es agotada sustancialmente, después de lo cual la fuente de carbono es agregada a una velocidad exponencial, pero a una velocidad que es menor que aquella que soportaría la velocidad de crecimiento específica de las células huésped. Por ejemplo,
10 en un método de la presente invención, la fuente de carbono es agregada en una cantidad que soportaría aproximadamente 90%, 80%, 75%, 60%, 50%, 40%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, o menos de la velocidad de crecimiento específica máxima.

En otras modalidades, se da a la reacción de
15 fermentación un vuelo inicial de fuentes de carbono suficiente para crecer a cerca de la velocidad de crecimiento específica máxima (crecimiento ilimitado) seguido por una velocidad de alimentación reducida a un nivel menor que aquel requerido para soportar la velocidad de crecimiento específica máxima por el
20 resto de la fermentación. En algunos casos, el punto en el cual la velocidad de alimentación de fuente de carbono reducida es implementada es el punto en el cual se tiene una velocidad de alimentación predeterminada. En ciertas modalidades, el microorganismo es provisto con suficiente fuente de carbono
25 para crecer exponencialmente a una velocidad de alimentación de

aproximadamente 15 g/l/h después de lo cual la velocidad de alimentación es reducida a 5.7 g/l/h y es mantenida constante a aquella velocidad por el resto de la fermentación.

En ciertas modalidades, una o más enzimas de ruta de mevalonato o DXP heterólogas son inducibles e inducidas después
5 que la velocidad de alimentación de fuente de carbono ha sido reducida a un nivel menor que aquel requerido para el crecimiento específico máximo. Por ejemplo, en donde el microorganismo diseñado tiene un promotor inducible, la
10 fermentación se pone en operación primero al agregar fuente de carbono para obtener una velocidad de crecimiento exponencial, pero a un nivel que es menor que aquella para soportar el crecimiento específico máximo, luego la velocidad de alimentación de fuente de carbono es reducida a un nivel aún
15 más bajo por el resto de la fermentación y el inductor es agregado después que la velocidad de alimentación de fuente de carbono es reducida. En algunas modalidades, los microorganismos son inducidos con isopropiltio-beta-D-galactoside (IPTG) después que la alimentación de fuente de
20 carbono reducida es iniciada.

En otras modalidades, la reacción de fermentación es efectuada de una manera que evita la acumulación de sustancias tóxicas que disminuyen las velocidades de crecimiento celular. Por ejemplo, es conocido que cuando demasiada glucosa es
25 agregada al medio, productos tóxicos tales como acetato se

pueden acumular en el organismo. Véase, por ejemplo, Kortz et al (1995) *J Biotechnol* 39: 59-65. Así, al proporcionar un alto nivel de fuente de carbono, o al aproximarse a la cantidad que soportaría una velocidad de crecimiento máxima (crecimiento ilimitado), el crecimiento inicial de las células puede ser más alto, pero el crecimiento se detiene debido a la acumulación de sustancias tóxicas. El nivel al cual la fuente de carbono es agregada debajo del nivel en donde los productos tóxicos no se acumulan es denominado como el nivel crítico o el umbral inhibitorio. Así, en ciertas modalidades, la reacción de fermentación es efectuada de tal manera que la fuente de carbono es mantenida por debajo de nivel crítico para la acumulación de sustancias tóxicas. Aquellos experimentados en el arte apreciarán que la concentración crítica de sustratos variará con la cepa y el medio que es usado.

Una mezcla de reacción de fermentación efectiva puede contener otros compuestos tales como sales inorgánicas, vitaminas, metales en trazas o promotores de crecimiento. Tales otros compuestos pueden también estar presentes en carbono, nitrógeno o fuentes minerales en la mezcla de reacción efectiva o pueden ser agregados específicamente a la mezcla de reacción. Una modalidad de la invención involucra proporcionar estos compuestos a niveles que son sub-óptimos en comparación con aquel que soportaría la velocidad de crecimiento máxima de las

células huésped con el fin de incrementar la producción de isoprenoide.

La mezcla de reacción de fermentación puede también contener una fuente de fosfato apropiada. Tales fuentes de fosfato incluyen tanto fuentes de fosfato inorgánica como orgánicas. Ejemplos no limitantes de fuentes de fosfato incluyen, pero no están limitadas a, sales de fosfato tales fosfatos de sodio y potasio mono- o dibásicos, fosfato de amonio, polifosfato y mezclas de los mismos. Una mezcla de reacción de fermentación apropiada puede también incluir una fuente de magnesio. En algunas modalidades, el magnesio está en forma de una sal aceptable fisiológicamente, tal como sulfato de magnesio heptahidratado, aunque otras fuentes de magnesio en concentraciones que contribuyen con cantidades similares de magnesio pueden ser usadas. Además, en algunas instancias, puede ser deseable permitir que la mezcla de reacción de fermentación se agote de una fuente de magnesio durante la fermentación. En algunas modalidades, la fuente de fósforo es provista en una cantidad que es sub-óptima en comparación con aquella que soportaría una velocidad de crecimiento específica máxima.

La mezcla de reacción de fermentación puede también incluir un agente quelante aceptable biológicamente, tal como el dihidrato de citrato de trisodio y ácido etilendiamintetraacético. La mezcla de reacción de fermentación

puede también incluir inicialmente un ácido o base aceptable biológicamente para mantener el pH deseado de la mezcla de reacción de fermentación. Ácidos aceptables biológicamente incluyen pero no están limitados a ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y mezclas de los mismos. Bases aceptables biológicamente incluyen, pero no están limitadas a, hidróxido de amonio, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio y mezclas de los mismos.

La mezcla de reacción de fermentación puede también incluir una fuente de calcio aceptable biológicamente, en los que se incluye pero no limitados a, cloruro de calcio. La mezcla de reacción de fermentación puede también incluir cloruro de sodio. La mezcla de reacción de fermentación puede también incluir metales en trazas. Tales metales en trazas pueden ser agregados a la mezcla de reacción de fermentación como una solución concentrada que, por conveniencia, puede ser preparada separadamente del resto de la mezcla de reacción de fermentación. Una solución de metales en trazas apropiada puede incluir, pero no está limitada a seleniato de sodio, sulfato ferroso heptahidratado, sulfato cúprico pentahidratado, sulfato de zinc heptahidratado, molibdato de sodio dihidratado, cloruro cobaltoso, solución de selenio o cromo hexahidratada y sulfato manganoso monohidratado. El ácido clorhídrico puede ser agregado a la solución concentrada para mantener las sales de metal en trazas en solución.

Si un intermediario de ruta o un compuesto puede ser convertido a un intermediario de ruta es agregado al medio de fermentación, el intermediario o compuesto está comúnmente presente en una cantidad en exceso.

5 La fermentación se puede llevar a cabo bajo condiciones anaeróbicas (deficientes de oxígeno) o aeróbicas (oxigenada). Bajo condiciones aeróbicas, los microorganismos pueden romper azúcares a productos finales tales como CO_2 y H_2O . Bajo condiciones anaeróbicas, las células huésped utilizan una
10 ruta alternativa para producir CO_2 y etanol. La fermentación puede también ser usada para referirse al crecimiento global de microorganismos sobre un medio de cultivo en donde no se hace ninguna distinción entre metabolismo aeróbico y anaeróbico. En general, la fermentación aeróbica es llevada a cabo para la
15 producción de isoprenoides.

Las fermentaciones de la presente invención se pueden llevar a cabo en un proceso por lotes, de alimentación por lotes o semi-continuo. Un proceso por lotes es comúnmente un proceso cerrado en donde todas las materias primas son
20 agregadas al comienzo de la fermentación. Un proceso de alimentación por lotes es comúnmente un proceso cerrado en donde la fuente de carbono y/u otros sustratos son agregados en incrementos en todos el proceso. Un proceso de alimentación por lotes permite mayor control de medio y el crecimiento de los
25 microorganismos. Un proceso continuo puede ser considerado un

sistema abierto en donde el medio es agregado continuamente y el producto es removido simultáneamente. Los procesos entre estos tipos pueden también ser usados. Por ejemplo, en una modalidad, la fermentación comienza como un proceso de alimentación por lotes y una capa orgánica, tal como dodecano es puesta en contacto con el medio de fermentación en tanto que el proceso de fermentación continúa. Los isoprenoides, que tienen comúnmente una solubilidad más alta en el medio orgánico que en el medio de fermentación acuoso son extraídos del medio de fermentación a la capa orgánica. En donde los isoprenoides son producidos en exceso del punto de extracción y forman una capa separable de medio, entonces la separación simple por medio de drenado o succión de la capa de fase distinta se puede llevar a cabo. Este proceso tiene características tanto de un proceso de alimentación por lotes como un proceso continuo, debido a la remoción de producto del medio y la fermentación avanza. Los procesos de alimentación por lotes y continuos permiten el control de la adición de componentes de alimentación durante el proceso de fermentación. Un proceso de alimentación por lotes, continuo o combinación de estos procesos es usualmente preferido para llevar a cabo la invención. Los procesos permiten mayor control de la velocidad de adición de alimentación y otros componentes de fermentación como función del tiempo. La remoción de producto durante la fermentación puede ser benéfica, especialmente en donde el

producto acumulado conduce a la inhibición de las rutas de producción.

La cantidad de microorganismos por litro de fermentación o la densidad de microorganismo puede ser medida al medir el peso de microorganismo aislado de un volumen dado del medio de fermentación. Una medida común es el peso seco de células por litro de medio de fermentación. Otro método que puede ser usado para monitorear la fermentación en tanto que está en avance es la medición de la densidad óptica del medio. Un método común es medir la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm, denominada como la OD₆₀₀ o la OD. La OD puede ser correlacionada con la densidad con un tipo específico de organismo dentro de un medio específico, pero la relación específica entre OD y cantidad de microorganismo por volumen en general no será aplicable a través de todos los tipos de organismos en todos los tipos de medios. Se puede crear una curva de calibración al medir la OD y el peso de célula seca en un intervalo de densidades celulares. En algunos casos, estas correlaciones pueden ser usadas en diferentes fermentaciones del mismo microorganismo o microorganismos similares en el mismo medio o medios similares.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método que comprende las etapas de (i) efectuar una reacción de fermentación que comprende un medio de fermentación y una pluralidad de células huésped modificadas genéticamente que

producen el isoprenoide bajo condiciones de tal manera que (a) el medio de fermentación es mantenido a una temperatura más baja que aquella que proporcionaría una velocidad de crecimiento específica máxima de las células huésped; (b) el medio de fermentación comprende una fuente de carbono presente en una cantidad que es más baja que aquella que proporcionaría una velocidad de crecimiento específica máxima de las células huésped; y/o (c) el medio de fermentación comprende una fuente de nitrógeno presente en una cantidad que es más baja que aquella que proporcionaría una velocidad de crecimiento específica máxima de las células huésped; (ii) recuperar el isoprenoide producido bajo una o más condiciones resumidas en (a) a (c). En una modalidad, la reacción de fermentación se pone en operación bajo la condición (a). En otra modalidad, la reacción de fermentación se pone en operación bajo condiciones (a) y (b). En todavía otra modalidad, la reacción de fermentación se pone en operación bajo condiciones de (a), (b) y (c) o en cualesquier combinaciones de las mismas.

Utilizando los métodos descritos en la presente, las células huésped producen más de aproximadamente 10 gramos de isoprenoide por litro de mezcla de reacción de fermentación (10 g/l). En otras modalidades, más de aproximadamente 15 g/l, más de aproximadamente 20 g/l, más de 25 g/l son producidos, o más de aproximadamente 30 g/l de isoprenoide es producido.

En otra modalidad, las células huésped producen más de aproximadamente 50 miligramos de isoprenoide por gramo de células huésped secas (50 miligramos por gramo de peso de célula seca) es producido. En otras modalidades, más de 5 aproximadamente 100 miligramos por gramo de peso de célula seca, más de aproximadamente 150 miligramos por gramo de peso de célula seca, más de aproximadamente 200 miligramos por gramo de peso de célula seca, más de aproximadamente 250 miligramos por gramo de peso de célula seca, más de aproximadamente 500 10 miligramos por gramo de peso de célula seca, más de aproximadamente 750 miligramos por gramo de peso de célula seca, o más de aproximadamente 1000 miligramos por gramo de peso de célula seca de isoprenoide es producido.

En otras modalidades, el nivel de producción, ya sea 15 en gramos por litro o miligramos por gramo de peso de célula seca se obtiene en menos de aproximadamente 150 horas, preferiblemente menos de aproximadamente 96 horas, o aún menos de aproximadamente 72 horas.

Ejemplos no limitantes de isoprenoides apropiados 20 incluyen: hemiterpenos (derivado de 1 unidad de isopreno) tal como isopreno; monoterpenos (derivado de 2 unidades de isopreno) tal como mirceno; sesquiterpenos (derivado de 3 unidades de isopreno) tales como amorfa-4,11-dieno; diterpenos (derivado de cuatro unidades de isopreno) tales como taxadieno; 25 triterpenos (derivado de 6 unidades de isopreno) escualeno;

tetraterpenos (derivado de 8 isoprenoides) β -caroteno; y politerpenos (derivado de más de 8 unidades de isopreno) tales como poliisopreno. En algunas modalidades, el isoprenoide no es un carotenoide. En otras modalidades, el isoprenoide es un
5 isoprenoide C_5-C_{20} .

Aunque la invención ha sido descrita en conjunción con modalidades específicas de la misma, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención. Otros aspectos, ventajas y modificaciones dentro del
10 alcance de la invención serán evidentes para aquellos experimentados en el arte con el cual la invención es concerniente.

EJEMPLOS

15 La práctica de la presente invención puede emplear, a no ser que se indique de otra manera, técnicas convencionales de la industria biosintética y los semejantes, que están dentro de la habilidad de aquellos experimentados en el arte. A la extensión de tales técnicas no son descritas plenamente en la
20 presente, se puede encontrar amplia referencia a ellas en la literatura científica.

En los siguientes ejemplos, se han realizado esfuerzos para asegurar la exactitud con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura y así
25 sucesivamente), pero se puede compensar la variación y

desviación y en el caso de que un error ortográfico en los números reportados en la presente exista, aquel de habilidad ordinaria en el arte con el cual esta invención es concerniente puede deducir la cantidad correcta en vista de la revelación
5 restante en la presente. A no ser que se indique de otra manera, la temperatura es reportada en grados Celsius y la presión es la presión atmosférica o cerca de la presente atmosférica al nivel del mar. Todos los reactivos, a no ser que se indique de otra manera, fueron obtenidos comercialmente. Los
10 siguientes ejemplos se proponen por propósitos ilustrativos solamente y no limitan de ninguna manera el alcance de la presente invención.

Ejemplo 1

15 Este ejemplo describe métodos para elaborar plásmidos de expresión que codifican enzimas que incluyen enzimas de la ruta de MEV de *Saccharomyces cerevisiae* organizados en operones.

El plásmido de expresión pMevT fue generado al
20 insertar el operón MevT (SEA ID NO: 1) al vector pBAD33. El operón MevT codifica el conjunto de enzimas de ruta de MEV que transforman conjuntamente el precursor ubicuo acetil-CoA a (R)-mevalonato, es decir acetoacetil.CoA tiolasa, HMG-CoA sintasa y HMG-CoA reductasa. El operón MevT fue generado mediante PCR que
25 amplifica de ADN genómico de *Escherichia coli* la secuencia de

codificación del gen *atoB* (GenBank No. de acceso NC_000913
 REGION: 2324131..2325315) (codifica una acetoacetyl-CoA
 tiolasa), del ADN genómico de *Saccharomyces cerevisiae* la
 secuencia de codificación del gen *ERG13* (GenBank No. de acceso
 5 X96617, REGION: 220..1695) (codifica una HMG-CoA sintasa) y de
 ADN genómico de *Saccharomyces cerevisiae* un segmento de la
 región de codificación del gen *HMG1* (GenBank No. de acceso
 M22002, REGION: 1660..3165) (codifica una reductasa truncada
 HMG-CoA (tHMGR)). El cebador de PCR corriente arriba usado por
 10 la amplificación del fragmento de gen *HMG1* incluía un codón de
 inicio artificial. Los fragmentos amplificados fueron
 empalmados conjuntamente sobre expresiones de superposición
 (SOEing), proceso durante el cual los sitios de enlace de
 ribosoma fueron introducidos después de las secuencias de
 15 codificación *atoB* y *ERG13*. Después de la adición de los
 colgantes 3' A, el operón *MevT* fue ligado al vector de
 clonación de TA pCR4 (Invitrogen, Carlsbad, CA) y secuenciados
 para asegurar la exactitud. El operón *MevT* fue ligado
 subsecuentemente al sitio de enzima de restricción *XmaI PstI*
 20 del vector pBAD33 (Guzman et al. (1995) *J. Bacteriol.* **177**(14):
 4121-4130). Para colocar el operón bajo el control del promotor
P_{Lac}, el fragmento de *araC-P_{BAD}NsiI-XmaI* de pBAD33 fue
 reemplazado con el fragmento de *NsiI-XmaI* de pBR1MCS,
 produciendo el plásmido de expresión pMecT (véase Patente
 25 Estadounidense No. 7,192,751).

El plásmido de expresión pAM36-MecT66 puede generar al insertar el operón MevT66 en el vector pAM36. El vector pAM36 fue generado al insertar un casete de oligonucleótido que contiene los sitios de enzima de restricción *AscI-SfiI-XhoI-PacI-FsII-PmeI* al vector pACYC184 (GenBank No. de acceso X06403) y al remover el gen de resistencia *tet* en pACYC184. El operón de MevT66 fue generado sintéticamente utilizando la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 1 como una plantilla, que comprende el gen *atoB* de *Escherichia coli* (GenBank No. de acceso NC_000913 REGION: 2324131..2325315), el gen *ERG13* de *Saccharomyces cerevisiae* (GenBank No. de acceso X96617, REGION: 220..1695) y una versión truncada de *HMG1* de *Saccharomyces cerevisiae* (GenBank No. de acceso M22002, REGION: 1777..3285), todas las tres secuencias siendo codón-optimizadas para la expresión en *Escherichia coli*. El operón MevT66 generado sintéticamente fue flanqueado por un sitio de enzima de restricción 5' *EcoRI* y un sitio de enzima de restricción 3' *HindIII* y podría así ser clonada a sitios de enzima de restricción compatibles de un vector de clonación tal como un vector de origen pUC o pACYC estándar. A partir de este constructo, el operón de MevT66 fue amplificado por PCR con sitios de enzimas de restricción *SfiI* y *AsiSI* con flaqueo, el fragmento de ADN amplificado fue sometido a digestión para continuación utilizando enzimas de restricción *SfiI* y *AsiSI*, la mezcla de reacción puede ser resuelta mediante electroforesis

de gel, el fragmento de ADN de aproximadamente 4.2 Kb fue extraído por gel utilizando un kit de purificación de gel de Qiagen (Valencia, CA) y el fragmento de ADN aislado fue ligado al sitio de enzima de restricción de *SfiI* *AsiSI* del vector pAM36-MevT66, produciendo el plásmido de expresión.

El plásmido de expresión pAM25 fue generado al insertar el operón MevT66 al vector pAM29. El vector pAM29 fue creado al ensamblar el origen de p15A de replicación y el gen de resistencia *kan* de pZS24-MCS1 (Lutz y Nujard (1997) *Nucl Acid Res.* **25**: 1203-1210) con un promotor de *lacUV5* oligonucleótido-generado. El constructo de síntesis de ADN comprende el operón MevT66 (véase anteriormente) fue sometido a digestión hasta su formación utilizando enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*, la mezcla de reacción fue resuelta mediante electroforesis en gel, el fragmento de ADN de 4.2 Kb fue extraído por gel y el fragmento de ADN aislado fue ligado al sitio de enzima de restricción *EcoRI* *HindIII* de pAM29, produciendo el plásmido de expresión pAM25.

El plásmido de expresión pMevB-Cm fue generado al insertar el operón MevB al vector pBBR1NCS-1. El operón MevB codifica el conjunto de enzimas que convierten conjuntamente(R)-mevalonato a IPP, es decir, mevalonato cinasa, fosfomevalonato cinasa y mevalonato pirofosfato carboxilasa. El operón MevB fue generado mediante amplificación de PCR de ADN genómico de *Saccharomyces cerevisiae* las secuencias de

codificacuión del gen *ERG12* (GenBank No. de acceso X55875, REGION: 580..1911) (codifica una mevalonato cinasa), el gen *ERG8* (GenBank No. de acceso Z49939, REGION: 3363..4718) (codifica una fosfomevalonato cinasa) y el gen *MVD1* (GenBank No. de acceso X97557, REGION: 544..1734) (codifica una mevalonato pirofosfato carboxilasa) y mediante el empalme de los fragmentos de PCR conjuntamente utilizando extensiones de superposición (SOEing). Al escoger las secuencias de cebador apropiadas, los codones de *ERG12* y *ERG8* fueron cambiados de TAA a TAG durante la amplificación para introducir sitios de enlaces de ribosoma. Después de la adición de los colgantes de 3'A, el operón de MevB fue ligado al vector de clonación de TA pCR4 (Invitrogen, Carlsbad, CA). El operón de MevB fue extirpado al digerir el constructo de clonación a la conformación utilizando la enzima de restricción *PstI*, resolviendo la mezcla de reacción mediante electroforesis de gel, extracción de egel del fragmento de ADN de 4.2 Kb y ligando el fragmento de ADN aislado al sitio de enzima de restricción *PstI* del vector pBBR1MCS-1 (Kovach et al., Gene 166(1): 175-176 (1995)), produciendo el plásmido de expresión pMevB-Cm.

El plásmido de expresión pMBI fue generado al insertar el operón MBI al vector pBBR1MCS-3. El operón de MBI codifica las enzimas en el operón de MevB, también como una isopentenil pirofosfatasa isomerasa que cataliza la conversión

de IPP a DMAPP. El operón de MBI fue generado mediante
 amplificación de PCR a partir de ADN genómico de *Escherichia*
coli, la secuencia de codificación del gen *idi* (GenBank No. de
 acceso AF119715) utilizando cebadores que contenían un sitio de
 5 enzima de restricción *XmaI* en sus extremos 5', sometiendo a
 digestión el fragmento de ADN amplificado a la conformación
 utilizando la enzima de restricción *XmaI*, resolviendo la mezcla
 de reacción mediante electroforesis de gel, extracción de gel
 del fragmento de 0.5 Kb y ligando del fragmento de ADN aislado
 10 al sitio de enzima de restricción *XmaI* del plásmido de
 expresión pMevB-Cm, colocando mediante esto *idi* en el extremo
 3' del operón MevB. El operón de MBI fue subclonado a los
 sitios de enzimas de restricción *SalI* y *SacI* del vector pBBR1M
 CS-3 (Kovach et al., *Gene* 166(1): 175-176 (1995)), produciendo
 15 el plásmido de expresión pMBI (véase Patente Estadounidense No.
 7,192,751).

El plásmido de expresión pMBIS fue generado al
 insertar el gen *ispA* a pMBI. El gen *ispA* codifica una farnesil
 pirofosfato sintasa que cataliza la condensación de dos
 20 moléculas de IPP con una molécula de DMAPP para fabricar
 farnesil pirofosfato (FPP). La secuencia de codificación del
 gen *ispA* (GenBank No. de acceso D00694, REGION: 484..1383) fue
 amplificado por PCR a partir de ADN genómico de *Escherichia*
coli utilizando un cebador delantero con un sitio de enzima de
 25 restricción de *SacII* y un cebador inverso con un sitio de

enzima de restricción *SacI*. El producto de PCR amplificado fue sometido a digestión a la consumación con enzimas de restricción *SacII* y *SacI*, la mezcla de reacción fue resuelta mediante electroforesis de gel y el fragmento de ADN de 0.9 Kb fue extraído por gel. El fragmento de ADN aislado fue ligado al sitio de restricción de enzima *SacII* *SacI* de pMBI, colocando mediante esto el gen *ispA* 3' de *idi* y el operón de *MevB* y produciendo el plásmido de expresión pMBIS (véase Patente Estadounidense No. 7,192,151).

El plásmido de expresión pMBIS-gpps fue derivado del plásmido de expresión pMBIS al reemplazar la secuencia de codificación de *ispA* con una secuencia de nucleótidos que codifica una geranil difosfato sintasa ("gpps"). Un fragmento de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la geranil difosfato sintasa fue generado sintéticamente utilizando la secuencia de codificación del gen *gpps* de *Arabidopsis thaliana* (GenBank No. de acceso Y17376, REGION: 52..1320), codón-optimizado para la expresión en *Escherichia coli*, como plantilla. La secuencia de nucleótidos fue flanqueada por un sitio de enzima de restricción *SacII* líder y un sitio de enzima de restricción *SacI* terminal y puede ser clonada a sitios de enzimas de restricción compatibles de un vector de clonación tal como un vector de origen pUC o pACYC estándar. La secuencia de geranil difosfato sintasa generada sintéticamente fue aislada al someter a digestión el constructo

de síntesis de ADN a la conformación utilizando enzimas de restricción *SacII* y *SacI*, resolviendo la mezcla de reacción mediante electroforesis de gel, extracción de gel del fragmento de ADN de aproximadamente 1.3 Kb y ligando del ADN aislado al sitio de enzima de restricción *SacII* *SacI* del plásmido de expresión pMBIS, produciendo el plásmido de expresión pMBIS-gpps (véase Figura 3 para un mapa de plásmido).

El plásmido de expresión pAM45 es generado al insertar el operón MBIS al pAM36-MevT66 y agregar los promotores *lacUV5* enfrente de los dos operones, El operón MBIS fue amplificado por PCR a partir de pMBIS utilizando cebadores que comprenden un sitio de enzima de restricción 5' *XhoI* y el sitio de enzima de restricción 3' *PacI*. El producto de PCR amplificado fue sometido a digestión hasta su conformación utilizando enzimas de restricción *XhoI* y *PacI*, la mezcla de reacción fue resuelta mediante electroforesis de gel, el fragmento de ADN de 5.4 Kb fue extraído por gel y el fragmento de ADN aislado fue ligado al sitio de enzima de restricción *XhoI* *PacI* de pAM36-MevT66, produciendo el plásmido pAM43. Un fragmento de ADN que comprende una secuencia de nucleótido que codifica el promotor *lacUV5* fue sintetizado a partir de oligonucleótidos y subclonado a los sitios de enzima de restricción *AscI* *SfiI* y *AsiSI* *XhoI* de pAM43, produciendo el plásmido de expresión pAM45.

Ejemplo 2

Este ejemplo describe métodos para elaborar vectores de expresión que codifican enzimas en las que se incluyen enzimas de la ruta MEV de *Staphylococcus aureus* organizadas en operones.

El plásmido de expresión pAM41 fue derivado del plásmido de expresión pAM25 al reemplazar la secuencia de codificación del gen *HMG1*, que codifica la HMG-CoA reductasa de *Saccharomyces cerevisiae*, con la secuencia de codificación del gen *mva A*, que codifica la HMG-CoA reductasa de *Staphylococcus aureus* (GenBank No. de acceso BA000017, REGION: 2688925..2687648). La secuencia de codificación del gen *mva A* fue amplificada mediante PCR de *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC 70069) a ADN genómico utilizando cebadores 4-49 *mva A* SpeI (SEQ ID NO: 2) y 4-49 *mva AR* XbaI (SEQ ID NO: 3), el fragmento de ADN amplificado fue sometido a digestión a la consumación utilizando la enzima de restricción SpeI, la mezcla de reacción fue resuelta mediante electroforesis de gel y el fragmento de ADN de aproximadamente 1.3 Kb fue extraído por gel. La secuencia de codificación de *HMG1* fue removida de pAM25 al someter a digestión el plásmido hasta consumación utilizando la enzima de restricción *HindIII*. Los colgantes terminales del fragmento de ADN lineal resultante fueron recortados utilizando ADN polimerasa T4. Luego el fragmento de ADN fue sometido a digestión parcial utilizando la enzima de restricción

SpeI, la mezcla de reacción fue resuelta mediante electroforesis de gel y el fragmento de ADN de 4.8 Kb fue extraído por gel. El fragmento de ADN aislado fue ligado al producto de PCR de *mvaA* *SpeI*-digerido, produciendo el plásmido de expresión pAM41. La secuencia de nucleótidos del operón *atoB(opt):ERG13(opt):mvaA* contenidos en pAM41 es SEQ ID NO: 41.

El plásmido de expresión pAM52 fue derivado del plásmido de expresión pAM41 al reemplazar la secuencia de codificación del gen *ERG13*, que codifica la HMG-CoA sintetasa de *Sacharomyces cerevisiae*, con la secuencia de codificación de *mvaS*, que codifica la HMG-CoA de *Staphylococcus aureus* (GenBank No. de acceso BA000017, REFION: 2689180.2690346). *ERG13* es también conocido como HMGS o HMF-CoA sintasa. La secuencia de codificación del gen de *mvaS* fue amplificado mediante PCR de ADN genómico de *Staphylococcus aureus* subsp *aureus* (ATCC 70069) utilizando los cebadores HMGS 5'a *mvaS*-S (SEQ ID NO: 4) y HMGS 3' Sa de *mvaS*-AS (SEQ ID NO: 5) y el fragmento de ADN amplificado fue usado como cebador de PCR para reemplazar la secuencia de codificación del gen *HMG1* en pAM41 de acuerdo con el método de Geiser et al. (*BioTechniques* **31**: 88-92 (2001)), produciendo el plásmido de expresión pAM52. La secuencia de nucleótidos del operón *atoB(opt):mvaS:mvaA* contenido en pAM52 es SEQ ID NO. 42.

El plásmido de expresión pAM97 fue derivado del plásmido de expresión pAM45 al reemplazar el operón *MevT66* con

el operón (*atoB(opt):mvaS:mvaA*) del plásmido de expresión pAM52. El plásmido de expresión pAM45 fue sometido a digestión hasta su consumación utilizando las enzimas de restricción *AsiSI* y *SfiI*, la mezcla de reacción fue resuelta mediante electroforesis de gel y el fragmento de ADN de 8.3 Kb que carece del operón MevT66 fue extraído por gel. El operón (*atoB(opt):mvaS:mvaA*) de pAM52 fue amplificado por PCR utilizando los cebadores 19-25 *atoB SfiI-S* (SEQ ID NO: 6) y 19-25 *mvaA-AsiSI-AS* (SEQ ID NO: 7), el producto de PCR fue sometido a digestión hasta la consumación utilizando las enzimas de restricción *SfiI* y *AsiSI*, la mezcla de reacción fue resuelta mediante electroforesis de gel, el fragmento de ADN de 3.7 Kb fue obtenido por gel y el fragmento de ADN aislado fue ligado al sitio de la enzima de restricción *AsiSI SfiI* del plásmido de expresión pAM45, produciendo el plásmido de expresión pAM97.

El plásmido de expresión pAM97-BMI fue derivado del plásmido de expresión pAM97 y pAM45 al reemplazar el operón de MBIS de pAM97 con el operón MBI de pAM45. El operón de MBI fue amplificado por PCR a partir del pAM45 utilizando los cebadores 9-70C (SEQ ID NO: 8) y 26-39B (SEQ ID NO: 9), la mezcla de reacción fue resuelta mediante electroforesis de gel, el fragmento de ADN de 4.5 Kb fue extraído por gel y el fragmento de ADN aislado fue sometido a digestión a la consumación utilizando enzimas de restricción *SacI* y *XhoI*. El plásmido de

expresion pAM97 fue sometido a digestión hasta la consumación utilizando las enzimas de restricción *SacI* y *XhoI*, la mezcla de reacción fue resuelta mediante electroforesis, el fragmento de 7.6 Kb fue extraído por gel y el fragmento de ADN aislado fue
5 ligado con el producto de PCR del operón de MBI, produciendo el plásmido de expresión pAM97-MBI.

El plásmido de expresión pAM97-MevB fue derivado del plásmido de expresión pAM97 y pAM45 al reemplazar el operón de MBIS de pAM97 con el operón de MevB de pAM45. El operón MevB
10 fue amplificado por PCR de pAM45 utilizando los cebadores 9-70C (SEQ ID NO. 8) y 26-39A (SEQ ID NO: 10), la mezcla de reacción fue resuelta mediante electroforesis de gel, el fragmento de ADN de 3.9 Kb fue extraído por gel y el fragmento de ADN aislado fue sometido a digestión hasta la consumación
15 utilizando las enzimas de restricción *SacI* y *XhoI*. El plásmido de expresión pAM97 fue sometido a digestión al usar las enzimas de restricción *SacI* y *XhoI*, la mezcla de reacción fue resuelta mediante electroforesis de gel, el fragmento de 7.6 Kb fue extraído por gel y el fragmento de ADN aislado fue ligado con
20 el producto de PCR del operón de MevB, produciendo el plásmido de expresión pAM97-MevB.

El plásmido de expresión pAM128 fue generado al insertar los operones (*atoB(opt):mvaS:mvaA*) y MBIS del plásmido de expresión pAM97 en un vector que comprende el sistema de
25 replicación, segregación y mantenimiento del plásmido RK2, que

elimina la necesidad continua de selección antibiótica de transformantes de células huésped. El plásmido de RK2 fue sometido a digestión a la consumación utilizando la enzima de restricción de *PstI*, la mezcla de reacción fue resuelta
 5 mediante electroforesis de gel, el fragmento de ADN de aproximadamente 6.3 Kb que contiene todo el sitio de *par* fue extraído por gel y el fragmento de ADN aislado fue subclonado al sitio de enzimas de restricción de *PstI* del replicón mini RK2 pRR10 (Roberts et al. (1990) *J Bacteriol.* **172**(11): 6204-
 10 6216), produciendo el vector pAM132. El plásmido de expresión pAM9 fue sometido a digestión a consumación utilizando las enzimas de restricción *AscI* y *SacI*, la mezcla de reacción fue resuelta mediante electroforesis de gel, el fragmento de ADN de aproximadamente 9.4 Kb fue extraído por gel y el fragmento de
 15 ADN aislado fue ligado al sitio de enzima de restricción *MluI* *SacI* de pAM132, produciendo el plásmido de expresión pAM128.

Ejemplo 3

Este ejemplo describe métodos para elaborar vectores
 20 de expresión que codifican enzimas en las que se incluyen enzimas de la ruta de MEV de *Enterococcus faecalis* organizadas en operones.

El plásmido pAM16 fue generado al insertar la secuencia de codificación del gen *mvaE* de *Enterococcus faecalis*
 25 (GenBank No. de acceso AF290092 REGION: 1479.3890) (codifica

una acetil-CoA acetiltransferasa/HMG-CoA reductasa (HMGR)) en el vector pBlueScriptII-KS(+). La secuencia de codificación del gen de *mvaE* fue amplificada por PCR de ADn genómico de *Enterococcus faecalis* (ATCC 700802) utilizando cebadores 5' fosforilados 4-40 mvaEF BamHII (SEQ ID NO: 11) y 4-40 mvaERHindIII (SEQ ID NO: 12). (Nótese que el cebador 4-40 mvaEF BamHI cambia el codón de inicio del gen de *mvaE* de TTG a ATG en el producto de PCR amplificado). El producto de PCR resultante fue ligado al sitio de enzimas de restricción de *SmaI* de pBlueScriptII-KS(+) (Stratagene, La Jolla, CA), produciendo el plásmido de expresión pAM16.

El plásmido pAM18 fue generado al insertar la secuencia de codificación del gen *mvaS* de *Enterococcus faecalis* (GenBank No. de acceso AF290092 REGION: 142..1293) (codifica una HMG-CoA sintasa (HMGS)) al vector pBlueScriptII-KS(+). La secuencia de codificación del gen *mvaS* fue amplificado por PCR de ADN genómico de *Enterococcus faecalis* (ATCC 700802) utilizando cebadores 5' fosforilados 4-40 mvaSF BgIII (SEQ ID NO: 13 y 4-39 mvaSR BanHI (SEQ ID NO. 14) y el producto de PCR fue ligado al sitio de enzima de restricción de *SmaI* de pBlueScriptII-KS(+) (Stratagene, La Jolla, CA), produciendo el plásmido de expresión pAM18.

El plásmido de expresión pAM22 fue generado al insertar la secuencia de codificación del gen *mavE* del plásmido de expresión pAM16 en el vector pZE21-P_{L-lacO1}. El vector pZE21-

P_{L-lacO1} es un derivado del vector pZE21-MCS-1 en el cual el promotor tet fue reemplazado por el promotor pZE21-P_{L-lacO1} (Lutz y Bujard (1997) *Nucl Acid Res.* **25**: 1203-1210). El plásmido de expresión pAM16 fue sometido a digestión a consumo
 5 utilizando las enzimas de restricción *BamHI* y *HindIII*, la mezcla de reacción fue resuelta mediante electroforesis de gel, el fragmento de ADn de 2.4 Kb que contiene la secuencia de codificación *mvaE* fue extraída por gel y el fragmento de ADN fue insertado a la enzima de restricción *BamHI HindIII* de
 10 pZE21-P_{L-lacO1}, produciendo el plásmido de expresión pAM22.

El plásmido de expresión pAM33 fue generado al insertar la secuencia de codificación del gen *mvaS* del plásmido de expresión pAM18 en el plásmido de expresión pAM22. El plásmido de expresión pAM18 fue sometido a digestión a la
 15 consumación utilizando las enzimas de restricción *BgIII* y *BamHI*, la mezcla de reacción fue resuelta mediante electroforesis de gel, el fragmento de ADN de aproximadamente 1.2 Kb que contiene la secuencia de codificación del gen de *mvaS* fue extraída por gel y el fragmento de ADN aislado fue
 20 insertado al sitio de expresión *BamHI* del plásmido de expresión pAM22, produciendo el plásmido de expresión pAM33.

El plásmido de expresión pAM34 fue generado al insertar el operón *mvaS-mvaE* del plásmido de expresión pAM33 al vector pAM29. El operón *mvaS-mvaE* fue aislado al someter a
 25 digestión parcialmente pAM33 utilizando la enzima de

restricción *EcoRI*, sometiendo a digestión el fragmento de ADN lineal resultante utilizando la enzima de restricción *MluI*, resolviendo la mezcla de reacción mediante electroforesis de gel y extrayendo con gel el fragmento de ADN de aproximadamente 5 3.6 Kb. La cadena fundamental del vector de pAM29 fue obtenida al someter a digestión el vector de expresión a consumación pAM25 utilizando enzimas de restricción *MluI* y *EcoRI*, resolviendo la mezcla de reacción mediante electroforesis de gel y extrayendo por gel el fragmento de ADN de aproximadamente 10 2.1 Kb. Los dos fragmentos de ADN aislados fueron ligados, produciendo el plásmido de expresión pAM34.

Ejemplo 4

Este ejemplo describe métodos para elaborar plásmidos 15 de expresión que codifican enzimas, en las que se incluyen enzimas de la ruta de DXP de *Escherichia coli* organizadas en operones.

El plásmido de expresión pAM408 fue generado al insertar genes que codifican enzimas de la ruta de DXP 20 "superior" al vector de pAM29. Enzimas de la ruta de DXP "superior" incluyen 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa (codificada por el gen *dxs* de *Escherichia coli*), 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa (codificada por el gen *dxr* de *Escherichia coli*), 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol 25 sintasa (codificada por el gen *ispD* de *Escherichia coli*) y 4-

difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol sintasa (codificada por el gen *ispE* de *Escherichia coli*), que conjuntamente transforman piruvato y D-gliceraldehído-3-fosfato a 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol-2-fosfato. Los fragmentos de ADN comprenden

5 secuencias de nucleótidos que codifican enzimas de la ruta de DXP "superior" fueron generados mediante amplificación ed PCR de las secuencias de codificación de los genes *dxs* (GenBank No. de acceso U00096 REGION: 437539..439401), *dxr* (GenBank No. de acceso U00096 REGION: 193521..194717), *ispD* (GenBank No. de

10 acceso U00096 REGION: 2869803..2870512) e *ispE* (GenBank No. de acceso U00096 REGION: 1261249..1262100) de la cepa DH1 de *Escherichia coli* (ATCC #33849) con secuencias de Shine Dalgarno óptimas agregadas y sitios de enzimas de restricción 5' y 3' utilizando los cebadores PCR mostrados en las SEQ ID NOS: 15-

15 18. Los productos PCR fueron resueltos mediante electroforesis de gel, extraídos por gel utilizando un kit de purificación de gel de Qiagen (Valencia, CA), sometidos a digestión a consumación utilizando enzimas de restricción apropiadas (*XhoI* y *KpnI* para el producto de PCR que comprende el gen de *dxs*;

20 *KpnI* y *ApaI* para el producto de PCR que comprende el gen de *dxr*, *ApaI* y *NdeI* para el producto de PCR que comprende el gen de *ispD*, *NdeI* y *MluI* para el producto de PCR que comprende el gen de *ispE*) y purificados utilizando un kit de purificación de PCR de Qiagen (Valencia, CA). Cantidades aproximadamente

25 equimolares de cada producto de PCR fueron luego agregadas al

sitio de ligación para ensamblar los genes individuales a un operón. De esta reacción de ligación, 1 μ l de mezcla de reacción fueron usados para tanto PCR dos casetes de gen separados, es decir, los casetes genéticos *dxs-dxr* y el *ispD-ispE*. El casete genético *dxs-dxr* fue amplificado por PCR utilizando los cebadores 67-1A-C (SEQ ID NO: 15) y 64-1D-C (SEQ ID NO: 18) y el casete *ispD-ispE* fue amplificado por PCR utilizando los cebadores 67-1E-C (SEQ ID NO. 19) y 67-1H-C (SEQ ID NO: 22). Los dos productos PCR fueron resueltos mediante electroforesis de gel y extraídos por gel. El producto PCR que comprende el casete genético *dxs-dxr* fue sometido a digestión a la consumación utilizando enzimas de restricción *XhoI* y *ApaI* y el producto de PCR que comprende el casete genético de *ispD-ispE* fue sometido a digestión a la consumación utilizando las enzimas de restricción *ApaI* y *MluI* y los dos productos de PCR fueron purificados. El vector pAM29 fue sometido a digestión a la consumación utilizando enzimas de restricción *SalI* y *MluI* y los dos productos de PCR sometidos a digestión que contienen el operón DXP "superior" fueron ligados al sitio de enzima de restricción de *SalI MluI* del vector de pAM29, produciendo el plásmido de expresión pAM408 (véase Figura 4 para un mapa de plásmido).

El plásmido de expresión pAM409 fue generado al insertar genes que codifican enzimas para la ruta DXP "de fondo" al vector de pAM369. Las enzimas de la ruta de DXP "de

fondo" incluyen 2C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato sintasa (codificada por el gen *ispF* de *Escherichia coli*), 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil-4-difosfato sintasa (codificada por el gen *ispG* de *Escherichia coli*) e isopentenil/dimetilalil difosfato sintasa (codificada por el gen *ispH* de *Escherichia coli*) que
 5 conjuntamente transforman el-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol-2-fosfato isomerasa a IPP y DMAPP. IPP es también convertido a DMAPP por medio de la actividad de isopentil difosfato isomerasa (codificada por el gen *idi* de *Escherichia*
 10 *coli*). DMAPP puede ser convertido adicionalmente a FPP por medio de la actividad de farnesil difosfato sintasa (codificada por el gen *ispA* de *Escherichia coli*). Un operón que codifica enzimas de la ruta DXP "de fondo" también como una isopentil difosfato isomerasa y una farnesil difosfato sintasa fue
 15 generada al amplificar por PCR los genes *ispF* (GenBank No. de acceso U00096 REGION: 2638708..2639826), *ispH* (GenBank No. de acceso U00096 REGION: 26277..27227) *idi* (GenBank No. de acceso AF119715) e *ispA* (GenBank No. de acceso D00694 REGION: 484..1383) de la cepa DH1 de *Escherichia coli* (ATCC #33849) con
 20 secuencias de Shine Dalgarno óptimas agregadas y sitios de enzimas de restricción 5' y 3' utilizando los cebadores de PCR apropiados. Los productos PCR fueron resueltos mediante electroforesis de gel, extraídos por gel, sometidos a digestión con las enzimas de restricción apropiadas (*BamHI* y *ApaI* para el
 25 producto de PCR que comprende el gen de *ispF*; *KpnI* y *ApaI* para

el producto de PCR que comprende el gen de *ispG*; *SalI* y *KpnI*
 para el producto de PCR que comprende el gen de *ispH*, *SalI* y
HindIII para el producto de PCR que comprende el gen *idi*,
HindIII y *NcoI* para el producto de PCR que comprende el gen
 5 *ispA*) y purificados. Cantidades aproximadamente equimolares de
 cada producto de PCR fueron luego agregadas a una reacción de
 ligación para ensamblar los genes individuales a un operón. De
 esta reacción de ligación, 1 µl de mezcla de reacción fue usado
 para amplificar por PCR dos casetes genéticos separados, es
 10 decir, los casetes genéticos *ispF-ispG* e *ispH-ispA*. El casete
 genético de *ispF-ispG* fue amplificado mediante PCR utilizando
 los cebadores 67-2A-C (SEQ ID NO: 2) y 67-2D-C (SEQ ID NO: 26)
 y el casete genético *ispH-idi-ispA* fue amplificado mediante PCR
 utilizando los cebadores 67-2E-C (SEQ ID NO: 27) y 67-2J-C (SEQ
 15 ID NO: 32). Los dos productos de PCR fueron resueltos mediante
 electroforesis de gel y extraídos por gel. El producto de PCR
 comprende el casete genético de *ispF-ispG* fue sometido a
 digestión a consumación utilizando las enzimas de restricción
BamHI y *KpnI* y el producto de PXR comprende el casete genético
 20 de *ispH-idi-ispA* fue sometido a digestión a la consumación
 utilizando las enzimas de restricción *KpnI* y *NcoI* y los dos
 productos de PCR fueron purificados. El vector pAM369 fue
 generado al ensamblar el origen pl5A de replicación de pAM29 y
 el gen de beta-lactamasa de resistencia a ampicilina de pZE12-
 25 luc (Lutz y Nujard (1997) *Nucl Acid Res.* **25**: 1203-1210) con un

promotor de *lacUV5* oligonucleótido-generado. El vector pAM369 fue sometido a digestión a consumación utilizando las enzimas de restricción *BamHI* y *NcoI* y los dos productos de PCT aislados que contienen el operón de ruta DXP "de fondo" fueron ligados
 5 al sitio de enzima de restricción *BamHI* *NcoI* del vector pAM369, produciendo el plásmido de expresión pAM409.

El plásmido de expresión pAM424, un derivado del plásmido de expresión pAM409 que contiene el origen de replicación de RK2 de amplio intervalo de corte fue generado al
 10 transferir el promotor *lacUV5* y el operón *ispH-idi-ispA* de pAM409 al vector de pAM257. El vector pAM257 fue generado como sigue: el sitio *par* de RK2 fue amplificado por PCR de ADN de plásmido de RK2 (Meyer et al. (1975) *Science* **190**: 1226-1228) utilizando los vebadores 9-156A (SEQ ID NO: 33) y 9-156B (SEQ
 15 ID NO: 34), el producto de PCR de 2.6 Kb fue sometido a digestión a consumación utilizando las enzimas de restricción *AatII* y *XhoI* y el fragmento de ADN fue ligado a un plásmido que contiene el origen de replicación *p15* y el gen de resistencia a cloramfenicol del vector pZA31-luc (Lutz y Bujard (1997) *Nucl*
 20 *Acid Res.* **25**: 1203-1210), produciendo el plásmido pAM37-*par*; pAM37-*par* fue sometido a digestión a la conformación utilizando enzimas de restricción *SacI* y *HindIII*, la mezcla de reacción fue resuelta mediante electroforesis de gel, el fragmento de ADn que comprende el sitio de *par* de RK2 y el gen de
 25 resistencia a cloramfenicol fue extraído por gel y el fragmento

de ADN aislado fue ligado al sitio de *SacI* y *HindIII* del mini-RK2 replicón pRR10 (Roberts et al. (1990) *J Bacteriol.* **172**: 6204-6216), produciendo el vector pAM133; pAM133 fue sometido a digestión a la consumación utilizando enzimas de restricción

5 *BgIII* y *HindIII*, la mezcla de reacción fue resuelta mediante electroforesis de gel, el fragmento de ADN de solamente 6.4 Kb que carece del gen de resistencia de ampicilina y el origen conjugativo *oriT* fue extraído por gel y el fragmento de ADN aislado fue ligado con un fragmento de ADN sintéticamente

10 generado que comprende un sitio de clonación múltiple que contenía sitios de enzima de restricción *PciI* y *XhoI*, produciendo el vector pAM257. El plásmido de expresión pAM409 fue sometido a digestión a consumación utilizando las enzimas de restricción *XhoI* y *PciI*, la mezcla de reacción fue resuelta

15 mediante electroforesis de gel y el fragmento de ADN de aproximadamente 4.4 Kb fue extraído por gel. El vector pAM257 fue sometido a digestión a consumación utilizando las enzimas de restricción *XhoI* y *PciI* y el fragmento de ADN aislado que contiene el promotor *lacUV5* y el operón *ispFGH-idi-ispA* fue

20 ligado al sitio de enzima de restricción *XhoI PciI* del vector pAM257, produciendo el plásmido de expresión pAM424 (véase Figura 5 para un mapa de plásmido).

Ejemplo 5

25 Este ejemplo describe métodos para elaborar plásmidos

de expresión que codifican enzimas que convierten FPP o GPP.

El plásmido de expresión pTrc99A-ADS fue generado al insertar una secuencia de nucleótidos que codifica una amorfa-4,11-dieno sintasa ("ADS") al vector pTrc99A. La secuencia de amorfa-4,11-dieno sintasa fue generada sintéticamente, de tal manera que después de la traducción de la secuencia de aminoácidos será idéntica a la descrita por Merke et al. (2000) *Ach. Biochem. Biophys.* **381**: 173-180, de tal manera que la secuencia de nucleótidos que codifica la amorfa-4,11-dieno sintasa fue optimizada para la expresión en *Escherichia coli* y de tal manera que la secuencia de nucleótidos fue flanqueada por un sitio de enzima de restricción *NcoI* 5' y *XmaI* 3' (véase Patente Estadounidense No. 7,192,751). La secuencia de nucleótidos fue sometida a restricción a la consumación utilizando enzimas de restricción *NcoI* y *XmaI*, la mezcla de reacción fue resuelta mediante electroforesis de gel, el fragmento de ADN de aproximadamente 1.6 Kb fue extraído por gel y el fragmento de ADN aislado fue insertado al sitio de enzima de restricción *NcoI* *XmaI* del vector pTrc99A (Amman et al. (1985) *Gene* **40**: 183-190), produciendo el plásmido de expresión pTrc99A-ADS (véase Figura 6 para un mapa de plásmido).

El plásmido de expresión pAM113 es un derivado resistente a cloramfenicol de pTrc99A-ADS. Fue generado mediante amplificación de PCR del gen de resistencia a cloramfenicol del vector pZA31-luc (Lutz y Bujard (1997) *Nucl*

Acids Res. **25**: 1203-1210) utilizando cebadores 5'-fosforilados 19-137 cml-pAM37-AS (SEQ ID NO: 35) y 19-137 cml-pAM37-S (SEQ ID NO: 36) e insertar el producto de PCR de 920 pb al sitio de enzima de restricción *FspI* del plásmido de expresión pTrc99A-
 5 ADS, produciendo el plásmido de expresión pAM113.

El plásmido de expresión pC9 fue generado al insertar un fragmento de ADN genómico de *Bacillus subtilis* 6051 que comprende la secuencia de codificación del gen *nudF* y las secuencias genómicas corriente arriba (GenBank No. de acceso
 10 Z99116 REGION: 49364..48548) al vector pTrc99A (Amann et al. (1988) *Gene* **69**: 301-315). El plásmido de expresión pNudF-H fue generado al insertar la secuencia de codificación del gen *nudF* de *Bacillus subtilis* 6051 (GenBank número de acceso Z9916 REGION: 49105..48548) al vector pTrc99A. El plásmido de
 15 expresión pyhfR fue generado al insertar la secuencia de codificación del gen *yhfr* de *Bacillus subtilis* 6051 (GenBank No. de acceso Z99109 REGION: 97583..97002) al vector pTrc99A.

El plásmido de expresión pAM373 fue generado al insertar una secuencia de nucleótidos que codifica la β -
 20 farneseno sintasa ("FSB") de *Artemisia annua* (GenBank No. de acceso AY835398), optimizado por codón para la expresión de *Escherichia coli* en el vector de pTrc99A. La secuencia de nucleótidos que codifica la β -farneseno sintasa fue generada sintéticamente y fue amplificada mediante PCR desde su
 25 constructo de síntesis de ADN utilizando los cebadores

apropiados. para crear un sitio de enzima de *NcoI* líder al producto de PCR que comprende la secuencia de codificación de β -farneseno sintasa, el codón que codifica el segundo aminoácido en la secuencia de polipéptidos original (codificación de TCG para serina) fue reemplazado por un codón que codifica ácido aspártico (GAC) en el cebador de PCR 5' (SEQ ID NO: 37). El producto de PCR resultante fue sometido parcialmente a digestión utilizando la enzima de restricción *NcoI* y sometida a digestión a consumación utilizando la enzima de restricción *SacI*, la mezcla de reacción fue resuelta mediante electroforesis de gel, el fragmento de ADN de aproximadamente 1.7 Kb que comprende la secuencia de codificación de β -farneseno sintasa fue extraída por gel y el fragmento de ADN aislado fue ligado a sitios de enzima de restricción de *NcoI* *SacI* del vector pTrc99A, produciendo el plásmido de expresión pAM373 (véase Figura 6 para un mapa de plásmido).

Los plásmidos de expresión pTrc99A-FSA, pTrc99A-GTS, pTrc99A-TS fueron generados al insertar un fragmento de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una α -farneseno sintasa ("FSA"), una γ -terpineno sintasa ("GTS"), una α -pineno sintasa ("APS") o una terpinoleno sintasa ("RS") al vector pTrc99A. El inserto de fragmento de ADN fue generado sintéticamente, utilizando una plantilla por ejemplo, la

secuencia de codificación del gen de α -farneseno sintasa de
Picea abies (GenBank No. de acceso AY473627, REGION:
 24..1766), la secuencia de codificación del gen de β -farneseno
 sintasa de *Artemisia annua* (GenBank No. de acceso AY835398), la
 5 secuencia de codificación del gen de γ -terpineno sintasa de
Citrus limon (GenBank No. de acceso AF514286 REGION: 30..1832),
 la secuencia de codificación del gen de α -pineno sintasa de
Abies grandis (GenBank No. de acceso U87909, REGION: 6..1892) o
 de *Pinus taeda* (GenBank No. de acceso AF543530 REGION:
 10 1..1887), o la secuencia de codificación del gen de terpinoleno
 sintasa de *Ocimum basilicum* (GenBank No. de acceso AY693650) o
 de *Pseudotsuga menziensis* (GenBank No. de acceso AY906866
 REGION: 10..1887) o de *Abies grandis* (GenBank No. de acceso
 AF139206), todas las secuencias de nucleótidos son optimizadas
 15 por codón para expresión en *Escherichia coli*. Los fragmentos de
 ADN para FSA fueron amplificados mediante PCR de su constructo
 de síntesis de ADN utilizando las secuencias del cebador SEQ ID
 NO: 39 y SEQ ID NO: 40. El producto de PCR resultante fue
 sometido a digestión a la consumación utilizando las enzimas de
 20 restricción *NcoI* y *SacI*, la mezcla de reacción fue resuelta
 mediante electroforesis de gel, el fragmento de ADN de
 aproximadamente 1.7 Kb que comprende la secuencia de
 codificación de α -farneseno sintasa fue ligado al sitio de
 enzima de restricción de *NcoI* *SacI* del vector pTrc99A,

produciendo el plásmido de expresión pTrc99A-FSA (véase figura 6 para un mapa de plásmido). Los fragmentos de ADN para GTS, APS y TS fueron diseñados para ser flanqueados por un sitio de enzima de restricción *XmaI* líder y un sitio de enzima de restricción *XbaI* terminal y fueron clonados a los sitios de enzimas de restricción compatibles de un vector de clonación tal como un vector de origen pTC o pACYC estándar, del cual podría ser liberado otra vez para someter a digestión a consumación el constructo de síntesis de ADN utilizando las enzimas de restricción *XbaI* y *XmaI*, resolviendo la mezcla de reacción mediante electroforesis de gel y extrayendo por gel el fragmento de ADN de codificación de terpeno sintasa de 1.7 a 1.9. Los fragmentos de ADN aislados fueron usados al sitio de enzima de restricción *XmaI* *XbaI* del vector pTrc99A (Amman et al., *Gene* 40: 183-190 (1985)), produciendo plásmidos pTrc99A-GTS, pTrc99A-APS o pTrc99A-TS (véase Figura 6 para mapas de plásmidos).

Los plásmidos de expresión pRS425-FSA y pRS425-FSB fueron generados al insertar una secuencia de nucleótidos que codifica una α -farneseno sintasa ("FSB"), respectivamente, en el vector pRS425-Gall (Mumberg et al. (1994) *Nucl. Acids. Res.* **22**(25): 5767-5768). Los insertos de secuencias de nucleótidos fueron generados sintéticamente, utilizando una plantilla por ejemplo, la secuencia de codificación de gen de α -farneseno sintasa de *Picea abies* (GenBank No. de acceso AY473627, REGION:

24..1766) o del gen de β -farneseno sintasa de *Artemisia annua* (GenBank No. de acceso AY835398), optimizado por codón para expresión en *Saccharomyces cerevisiae*. La secuencia de nucleótidos generada sintéticamente fue flanqueada por un sitio de *BamHI* 5' y un sitio *XhoI* 3' y podría así ser clonada a sitios de enzima de restricción compatibles de un vector de clonación tal como un pUC estándar o vector de origen pACYC. La secuencia de nucleótidos generada sintéticamente fue aislada al someter a digestión a consumación la síntesis del constructo de ADN utilizando las enzimas de restricción *BamHI* y *XhoI*. La mezcla de reacción fue resuelta mediante electroforesis de gel, el fragmento de ADN de aproximadamente 1.7 Kb que comprende la secuencia de replicación de α -farneseno sintasa o β -farneseno sintasa fue extraída por gel y el fragmento de ADN aislado fue ligado al sitio de enzima de restricción de *BamHI* *XhoI* del vector pRS245-Gall, produciendo el plásmido de expresión pRS425-FSA o pRS425-FSB, respectivamente.

Los plásmidos de expresión pTrc99A-LLS, pTrc99A-LMS, pTrc99A-BPS, pTrc99A-PHS, pTrc99A-CS y pTrc99A-SS son generados al insertar una secuencia de nucleótidos que codifica una linalool sintasa ("LLS"), limoneno sintasa ("LMS"), β -pineno sintasa ("BPS"), β -felandreno ("PHS"), careno sintasa ("CS") o sabinina sintasa ("SS") al vector pTrc99A. Los insertos de secuencia de nucleótidos son generados sintéticamente,

utilizando como plantilla para el ejemplo la secuencia de codificación del gen de linalool sintasa de *Artemisia annua* (GenBank No. de acceso AF154124, REGION: 13..1764), la secuencia de codificación del gen de limoneno sintasa de *Abies grandis* (GenBank No. de acceso AF006193 REGION: 73..1986), la secuencia que codifica de β -pineno sintasa de *Artemisia annua* (GenBank No. de acceso AF276072 REGION: 1..1749), la secuencia de codificación del gen de β -felandreno sintasa de *Abies grandis* (GenBank No. de acceso AF139205 REGION: 34..1926), la secuencia de codificación del gen de careno sintasa de *Salvia stenophylla* (GenBank No. de acceso AF527416 REGION: 78..18711) o la secuencia de codificación del gen de sabineno sintasa de *Salvia officinalis* (GenBank No. de acceso AF051901 REGION: 26..1798). Las secuencias de nucleótidos que codifican las β -puneno, savinina y β -felandreno sintasas son flanqueadas por un sitio de enzima de restricción *XmaI* líder y un sitio de enzima de restricción *XbaI* terminal, las secuencias de nucleótidos que codifican la linalool y careno sintasas son flanqueadas por un sitio de enzima de restricción *NcoI* líder y un sitio de enzima de restricción *XmaI* terminal y la secuencia de nucleótidos que codifica la limoneno sintasa es flanqueada por un sitio de enzima de restricción *NcoI* líder y un sitio de enzima de restricción *PstI* terminal. Los constructos de síntesis de ADN son sometidos a digestión hasta consumación utilizando *XmaI* *XbaI*

(para constructos de β -pineno, sabinina y β -felandreno sintasa), enzimas de restricción *NcoI* *XmaI* (para constructos de linalool y careen sintasa) o enzimas de restricción de *XbaI* y *PstI* (para el constructo de limoneno sintasa). Las mezclas de
 5 reacción son resueltas mediante electroforesis de gel, los fragmentos de ADN de aproximadamente 1.7 a 1.9 Kb son extraídos por gel y los fragmentos de ADN aislados son ligados al sitio de enzima de restricción *XmaI* *XbaI* (para insertos de β -pineno, sabinina y β -felandreno sintasa), el sitio de enzima de
 10 restricción *NcoI* *XmaI* (para los insertos de linalool y careno sintasa) o el sitio de enzima de restricción *XbaI* *PstI* (para el inserto de limoneno sintasa) del vector pTrc99A, produciendo los plásmidos de expresión pTrc99A-LLS, pTrc99A-LMS, pTrc99A-BPS, pTrc99A-PHS, pTrc99A-CS y pTrc99A-SS (véase Figura 6 para
 15 mapas de plásmidos).

Ejemplo 6

Este ejemplo describe la generación de cepas huésped de *Escherichia coli* útiles en la invención.

20 Como se detalla en la Tabla 1, las cepas huésped fueron creadas al transformar células padre de *Escherichia coli* químicamente competentes con uno o más plásmidos de expresión del Ejemplo 1 a 15.

Tabla 1. Cepas huésped de E. coli

Cepa huésped	Cepa padre E. coli	Plásmidos de expresión	Selección de antibiótico
B32	DH1	pMevT	100 ug/mL carbenicilina
B292	B	pMBIS	5 ug/mL tetraciclina
B210	DP	pTrc99A-ADS	34 ug/mL cloranfenicol
B153	DH1	pAM97	100 ug/mL carbenicilina
B282	DP	pTrc99A-ADS	34 ug/mL cloranfenicol
B255	DH1	pAM128	100 ug/mL carbenicilina
B256	DP	pAM113	34 ug/mL cloranfenicol
B86	DH1	pAM52 pMBIS pTrc99A-ADS	50 ug/mL kanamicina 100 ug/mL carbenicilina 5 ug/mL tetraciclina
B61	DH1	pAM25 pBBR1MCS-3 pTrc99A	
B62		pAM34 pBBR1MCS-3 pTrc99A	
B003	DH10B	pTrc99A-ADS	100 µg/ml carbenicilina
B617		pAM408 pTrc99A-ADS	100 ug/mL carbenicilina 50 ug/mL kanamicina
B618		pAM424 pTrc99A-ADS	100 ug/mL carbenicilina 35 µg/ml cloranfenicol
B619		pAM408 pAM424 pTrc99A-ADS	100 µg/ml carbenicilina 50 µg/ml kanamicina 35 µg/ml cloranfenicol
B650	DH10B	pAM373	100 µg/ml carbenicilina
B651		pAM408 pAM373	100 µg/ml carbenicilina 50 µg/ml kanamicina
B652		pAM424 pAM373	100 µg/ml carbenicilina 35 µg/ml cloranfenicol
B653		pAM408 pAM424 pAM373	100 µg/ml carbenicilina 50 µg/ml kanamicina 35 µg/ml cloranfenicol
B286	DH1	pAM97-MevB pC9	100 ug/mL carbenicilina 34 ug/mL cloranfenicol
B287		pAM97-MevB pnudF-H	
B288		pAM97-MevB pyhR	
B291		pAM97-MBI pyhR	
B592	DH1	pMevT pMBIS pTrc99A-FSA	100 ug/mL carbenicilina 34 ug/mL cloranfenicol
B552		pMevT	5 ug/mL tetraciclina

Cepa huésped	Cepa padre E. coli	Plásmidos de expresión	Selección de antibiótico
		pMBIS pAM373	
Célula huésped Ejemplo 21 (producción de GTS, APS, TS)		pMevT pMBIS-gpps pTrc99A-GTS o - APS o -TS	
Célula huésped Ejemplo 21 (Producción de LLS, LMS, BPS, PHS, CS, CS)		pMevT pMBIS-gpps pTrc99A-LLS o - LMS o -BPS o - PHS o -CS o -SS	100 ug/mL carbenicilina 34 ug/mL cloranfenicol 5 ug/mL tetraciclina

Los transformantes de célula huésped fueron seleccionados sobre agar de Luria Bertoni (LB) que contiene
antibióticos como se detalla en la Tabla 1. Colonias
individuales fueron transferidas del agar LB a tubos de
cultivos que contienen 5 ml de medio líquido LB y antibiótico,
B003, B617, B618, B619, B650, B651, B652 y B653 y
transformantes de célula huésped fueron incubados a 30°C sobre
un agitador giratorio a 250 rpm durante 30 horas. Todos los
otros transformantes de célula huésped fueron incubados a 37°C
en un agitador giratorio a 250 rpm hasta que el crecimiento
alcanzó la fase estacionaria. Las células fueron adaptadas a
medios mínimos al hacerlas pasar a través de 4 a 5 rondas
sucesivas de medio M9-MOPS que contiene glucosa al 0.8% y
antibióticos (véase Tabla 2 para la composición del medio M9-
MOPS). Las células fueron almacenadas a -80°C en crio-frascos
en alícuotas concentradas de 1 ml compuestas de 400 ul de
glicerol al 50% estéril y 600 ul de cultivo líquido.

Tabla 2. Composición del medio de cultivo M9-MOPS

	Componente	Cantidad (por litro)
	Na2HPO4 7H2O	12.8 g
	KH2PO4	3 g
5	NaCl	0.5 g
	NH4Cl	1 g
	MgSO4	2 mmol
	CaCl2	0.1 mmol
	Tiamina	0.1 ug
	Solución reguladora del pH MOS pH 7.4	100 mmol
10	(NH3)6Mo7O24 4H2O	3.7 ug
	H3BO4	25 ug
	CoCl2	7.1 ug
	CuSO4	2.4 ug
	MnCl2	16 ug
	ZnSO4	2.9 ug
15	FeSO4	0.28 mg

Ejemplo 7

Este ejemplo demuestra la estabilidad de expresión
20 del plásmido de expresión en ausencia de antibióticos en una
cepa huésped de *Escherichia coli* que alberga un plásmido de
expresión que comprende el sistema de replicación, segregación
y mantenimiento del plásmido TK2.

Un cultivo de células de cepa huésped B255 fue
25 establecido al agregar una alícuota almacenada de la cepa a un

matraz de 125 ml que contiene 40 ml de Mp-MOPS, glucosa al 2%, extracto de levadura al 0.5% y antibióticos como se detalla en la Tabla 1 y al cultivar el cultivo durante toda la noche.

El cultivo de siembra fue usado para inocular a una
5 OD₆₀₀ inicial de aproximadamente 0.05, dos matraces de 250 ml que contienen cada uno 40 ml de medio M9-MOPS, glucosa al 2% y extracto de levadura al 0.5%. El cultivo #1 también contenía 100 ug/ml de carbenicilina y 34 ug/ml de cloramfenicol. El cultivo #2 no recibió ningún antibiótico. Ambos cultivos fueron
10 incubados a 37°C sobre un agitador giratorio a 250 rpm hasta que alcanzaron una OD₆₀₀ de aproximadamente 0.2, punto en el cual la producción de amorfa-4,11-dieno en las células huésped fue inducida al agregar 40 ul de IPTG 1M al medio de cultivo. Al tiempo de inducción, los cultivos fueron depositados con 8
15 ml de un tejido orgánico para capturar el amorfa-4,11-dieno. Se tomaron muestras periódicamente por un total de 72 horas. La producción de amorfa-4,11-dieno por la cepa huésped en los dos cultivos fue confirmada mediante GC/MS como se describe en el Ejemplo 10.

20 Para determinar la estabilidad del plásmido en los dos cultivos celulares, una muestra de cada cultivo fue removida a 72 horas y rayada con una placa de agar de LB (sin antibióticos). Después de incubación durante toda la noche a 37°C, 50 colonias individuales derivadas de cada cultivo fueron
25 replicadas sobre una placa de agar de LB - más antibióticos (34

ig/ml de cloramfenicol, 100 ug/ml de carbenicilina) y una placa de agar de LB de menos-antibiótico (sin antibiótico). Después de otra incubación durante toda la noche a 37°C, la placa de agar LB-más antibiótico y agar LB-menos antibiótico se encontró
 5 que cada una contenía aproximadamente 50 colonias, indicando que la retención del plásmido tanto en presencia como en ausencia de antibióticos en el medio de cultivo se había aproximado al 100%.

10 Ejemplo 8

Este ejemplo demuestra la actividad específica incrementada y estabilidad de HMGR de *Enterococcus faecalis* en comparación con tHMGR de *Saccharomyces cerevisiae* en una cepa huésped de *Escherichia coli*.

15 Cultivos de siembra de cepas huésped B62 y B62 fueron establecidos al agregar una alícuota almacenada de cada cepa a matraces de 125 ml que contienen 20 ml de medio M9-MOPS, glucosa al 0.8% y antibióticos como se detalla en la Tabla 5 y al cultivar los cultivos a saturación. Los cultivos de siembra
 20 fueron diluidos 1:100 a 140 ml de medio fresco con un matraz de 500 ml y cultivados otra vez a una OD₅₅₀ de aproximadamente 0.1, punto en el cual la producción de amorfa-4,11-dieno fue inducida al agregar 140 ul de IPTG 1 M a cada cultivo. A 4, 12, 20, 28, 36 y 49 horas pos-inducción, las muestras fueron
 25 removidas de cada cultivo y las células fueron aglomeradas

mediante centrifugación. Las perllillas celulares fueron congeladas sobre hielo seco y luego almacenadas a -80°C .

Para llevar a cabo los análisis de enzima, las perllillas de células fueron deshieladas sobre hielo y luego
5 sometidas a lisis utilizando Bugbuster (Novagen, Madison, WI) que contiene mezcla #3 inhibidor de proteasa (Calbiochem, San Diego, CA), benzonasa (20 μl de oer5 ml de bugbuster; Novagen, Madison, WI) y lisozima (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$). La actividad enzimática de tHMGR de *Saccharomyces cerevisiae* fue analizada en Tris HCl 50
10 mM (pH 7.5), NADPH 0.2 mM (Digma, San Luis, MO) y DL-3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMD-CoA) sal de sodio 0.3 mM (Sugma, San Luis, MO). El análisis fue iniciado al agregar un lisado celular y la desaparición de NADPH fue monitoreada mediante absorbancia a 340 nm. Para tomar en cuenta la
15 desaparición no específica de NADPH, los resultados obtenidos en un análisis de control que carece de HMG-CoA fueron restados de los resultados obtenidos en las muestras de prueba. La actividad enzimática de HMGR de *Enterococcus faecalis* fue medida similarmente excepto que la solución reguladora de
20 análisis contenía solución reguladora de fosfato de potasio 100 mM (pH 6.5), NADPH 0.4 mM, EDTA 1.0 mM y KCl 100 mM.

Los análisis de proteínas se realizaron por el método de Bradford ((1976) *Anal Biochem.* **72**: 248-254). Las actividades específicas fueron calculadas como $\Delta\text{nmol NADPH}/\text{min}/\text{mg}$ de
25 proteína.

Como se muestra en la Figura 8, el HMGR de *Enterococcus faecalis* exhibió actividad específica más alta y estabilidad incrementada en comparación con tHMGR de *Saccharomyces cerevisiae*.

5

Ejemplo 9

Este ejemplo describe la calibración de OD₆₀₀ con un peso de célula seco ("DCW").

Para obtener la relación entre DCW y OD₆₀₀, una cepa representativa, B32, fue cultivada en procesos de alta densidad similares a aquellos descritos en los Ejemplos 10-14. Las muestras fueron tomadas a través de las corridas y la OD₆₀₀ y DCW fueron medidas para cada muestra. Para determinar la DCW, las células fueron aglomeradas y el sobrenadante fue descartado. La pelotilla celular fue lavada una vez con agua y luego fue secada en un horno a 80°C por al menos 3 días. Los tubos que contienen pelotillas celulares fueron pesados, el peso del tubo fue restado de los pesos medidos y el peso restante fue dividido por el volumen inicial de cada muestra (0.0015 L) para obtener la DCW.

15
20

La Figura 9 muestra la relación entre DCW y OD₆₀₀ medidos en estos experimentos.

Ejemplo 10

Este ejemplo demuestra la producción incrementada de

25

amorfa-4,11-dieno en cepas huésped de *Escherichia coli* que expresan HMGR y HMGS de *Staphylococcus aureus* en comparación con cepas huésped que expresan el tHMGR y HMGS de *Sacharomyces cerevisiae*.

5 Cultivos de siembra de cepas huésped B32, B153, B282, B292, B86, B255 u B256 fueron establecidos al agregar una alícuota de entrada de cada cepa a matraces de 125 ml separados que contienen 25 ml de medio M9-MOPS, glucosa 0.8% y antibióticos como se detalla en la Tabla 1 y al cultivar los
10 cultivos durante toda la noche.

Los cultivos de siembra fueron usados para inocular una OD₆₀₀ inicial de aproximadamente matraves de 250 ml de 0.05 que contienen 40 ml de medio M9-MOPS, glucosa al 2% y antibióticos. Los cultivos fueron incubados a 30°C sobre un
15 agitador giratorio a 250 rpm hasta que alcanzaron una OD₆₀₀ de aproximadamente 0.2, punto en el cual la producción de amorfa-4,11--dieno en las células huésped fue inducida al agregar 40 ul de IPTG 1 M al medio de cultivo. Los cultivos fueron suministrados con 8 ml de un tejido orgánico (por ejemplo,
20 dodecano, oleato de metilo o miristato de isopropilo). Muestras de la capa de sobretejido orgánica y el caldo fueron tomados una vez al día por 72 horas. Las muestras de caldo fueron usadas para medir la OD₆₀₀. La concentración de amorfa-4,11-dieno fue medida al transferir 5 ul de la capa de sobretejido
25 orgánica a un frasco de vidrio limpio que contiene 500 ul de

acetato de etilo inyectado con beta- o trans-cariofileno como estándar interno.

Las muestras de sobretejido/acetato de etilo orgánicas fueron analizadas sobre un cromatógrafo de gases/espectrómetro de masas (GC/MS) Hewlett-Packard 6890 al
5 explorar solamente por dos iones, el ion molecular (204 m/z) y el ion 189 m/z como se describe en Martin et al. (2001) *Biotechnol. Bioeng.* **75**: 497-503. Para hacer expeditos los tiempos de corrida, los programas de temperatura y de matriz de
10 columna fueron modificados para obtener picos de resolución de proyección óptimas y el tiempo de corrida global más corto. una muestra de 1 ul fue separada sobre la GC utilizando una columna de DB-XLB (disponible de Agilent Technologies , Inc., Palo Alto, California) y el gas portador de helio. El programa de
15 temperatura para el análisis fue como sigue: 100°C por 0.75 minutos, incrementando la temperatura a 60°C/minuto a una temperatura de 300°C y mantenida a 300°C por 0.5 minutos. Las muestras resueltas fueron analizadas mediante un detector masa-selectivo modelo 5973 de Hewlett- Packard que monitoreó iones
20 189 y 204 m/z. Espectros de masas previos demostraron que el producto de amorfa-4,11-dieno sintasa era amorfa-4,11-dieno y que el amorfa-4,11-dieno tenía un tiempo de retención de 3.7 minutos utilizando este protocolo de GC. Se usó beta- o trans-cariofileno como estándar interno para cuantificación. El
25 título de amorfa-4,11-dieno fue calculado utilizando la

proporción del estándar interno a las áreas pico de amorfa-4,11-dieno en base a una curva de generación cuantitativa de amorfa-4,11-dieno purificado (0.63-10 mg/l de KJF17-109-13) en acetato de etilo proyectado en cariofileno.

5 Como se muestra en las Figuras 10A y 10B, las cepas B153 y B282, que expresaban el HMGR y HMGS de *Staphylococcus aureus* produjeron niveles elevados de amorfa-4,11-dieno en comparación con las cepas B32, B210, B255, B256 y B292, que expresaron el tHMGR y HMGS de *Saccharomyces cerevisiae*.

10

Ejemplo 11

Este ejemplo demuestra la producción incrementada de amorfa-4,11-dieno mediante una cepa huésped de *Escherichia coli* cultivada a una temperatura sub óptima.

15 Un cultivo de siembra de la cepa huésped de B32 fue establecido al agregar 0.5 ml de una alícuota concentrada de la cepa a un matraz de 250 ml que contiene 50 ml de medio M9-MOPS y antibióticos como se detalla en la Tabla 1 y al cultivar el cultivo durante toda la noche a 37° C sobre un aplicador
20 giratorio a 250 rpm.

El cultivo de siembra fue usado para inocular a una OD₆₀₀ de aproximadamente 0.05, 4 matraces de 250 ml, cada uno contiene 40 ml de medio de lote de fermentador (véase tabla 6 para composición del medio), solución reguladora del pH MOPS
25 100 ml, pH 7.1 y antibióticos. Los cultivos fueron incubados

sobre un agitador giratorio a 250 rpm ya sea a 30° C o 37° C hasta que llegaron a una OD₆₀₀ de 0.18 a 0.22, punto en el cual la producción amorfa-4,11-dieno en las células huésped fue inducida al agregar 40 ul de IPTG 1 M al medio de cultivo. Al
5 tiempo de inducción, los cultivos fueron recubiertos con un depósito superficial con 8 ml de un depósito superficial orgánico para capturar el amorfa-4,11-dieno. Se compararon muestras una vez al día y se analizaron como se describe en el ejemplo 10.

10 Como se muestra en las Figuras 11A y 11B, la fermentación a 30° C no afectó el crecimiento celular, pero condujo a un incremento de aproximadamente 50% en la producción específica de amorfa-4,11-dieno por la cepa huésped de *Escherichia coli*.

15

Ejemplo 12

Este ejemplo demuestra la producción incrementada de amorfa-4,11-dieno por una cepa huésped de *Escherichia coli* cultivada bajo condiciones de fuente de carbono restringidas.

20 Un cultivo de siembra de la cepa huésped B32 para corridas de fermentación 050608-1 y 050629-1 fue establecido al agregar 0.25 ul de una alícuota concentrada de la cepa a un matraz de 250 ml que contiene 50 ml del medio M9-MOPS y antibióticos como se detalla en la Tabla 1 y al incubar el

cultivo a 37° C sobre un agitador giratorio a 250 rpm hasta que llega a una OD₆₀₀ de 1 a 2.

Un cultivo de siembra de la cepa huésped B32 para la corrida de fermentación 060403-3 fue establecido al agregar una
5 alícuota concentrada de la cepa a un matraz de 250 ml que contiene 50 ml de medio M9-MOPS y antibióticos como se detalla en la Tabla 1 y al incubar el cultivo durante toda la noche a 37° C sobre un agitador giratorio a 250 rpm. El cultivo de siembra fue usado para inocular a una OD₆₀₀ de aproximadamente
10 1 a matraz de 250 ml que contiene 40 ml de medio M9-MOPS y antibióticos y el cultivo fue otra vez incubado a 37° C sobre un agitador giratorio a 250 rpm hasta que llegó a una OD₆₀₀ de 3 a 5.

Para todos los procesos de fermentación, el KH₂PO₄,
15 K₂HPO₄·3H₂O, EDTA, ácido cítrico y (NH₄)₂SO₄ fueron esterilizados térmicamente en un bioreactor (2L Applikon Bioconsole ADI 1025s con controladores ADI 1010, Applikon Biotechnology, Foster City, CA.). Los componentes del medio restantes fueron esterilizados por filtración como soluciones concentradas e
20 inyectados a través de la placa de cabezal. La Tabla 3 muestra la composición del medio final para las corridas de fermentación 050608-1 y 050629-1. La tabla 4 muestra la composición de medio final para la corrida de fermentación 060403-3. El volumen de partida para la corrida 050608-1 fue
25 de 0.8 l, el volumen de partida para 050629-1 fue de 1.2 l y el

volumen de partida para 060403-3 fue de 1 l. Todas las corridas fueron inoculadas al inyectar 50 ml del cultivo de siembra a través de la placa de cabezal.

5 **Tabla 3-Composición del medio de fermentación de las corridas de fermentación 050608-1 y 050629-1**

10

Componente	Medio de lote (por litro)	Solución alimentación (por litro)
Glucosa	5 g	590-650 g
KH ₂ PO ₄	4.2 g	-
K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O	15.7 g	-
Acido cítrico	1.7 g	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g	-
MgSO ₄ 7H ₂ O	1.2 g	12 g
EDTA	8.4 mg	13 g
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.25 mg	0.4 mg
MnCl ₂ 4H ₂ O	1.5 mg	2.35 mg
CuCl ₂ 2H ₂ O	0.15 mg	0.25 mg
H ₃ BO ₄	0.3 mg	0.5 mg
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.25 mg	0.4 mg
Zn(CH ₃ COO) ₂ 2H ₂ O	1.3 mg	1.6 mg
Citrato Fe(III) hidratado	10.0 mg	4.0 mg
Tiamina HCl	4.5 mg	-
Carbenicilina	100 ug	100 ug
Tetraciclina	5 ug	5 ug
Cloranfenicol	34 ug	34 ug

15

20

Tabla 4 - Composición del medio de fermentación de corrida de fermentación 060403-3

	Componente	Medio de lote (por litro)	Solución alimentación (por litro)
	Glucosa	15 g	650 g
5	KH ₂ PO ₄	4.2 g	-
	K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O	15.7 g	-
	Acido citrico	1.7 g	-
	(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g	-
	MgSO ₄ 7H ₂ O	1.2 g	12 g
	EDTA	8.4 mg	13 mg
	CoCl ₂ 6H ₂ O	2.5 mg	4 mg
10	MnCl ₂ 4H ₂ O	15 mg	23.5 mg
	CuCl ₂ 2H ₂ O	1.5 mg	2.5 mg
	H ₃ BO ₄	3 mg	5 mg
	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	2.5 mg	4 mg
	Zn(CH ₃ COO) ₂ 2H ₂ O	13 mg	16 mg
	Citrato Fe(III) hidratado	100 mg	40 mg
	Tiamina HCl	4.5 mg	-
15	Carbenicilina	100 ug	100 ug
	Tetraciclina	5 ug	5 ug
	Cloranfenicol	34 ug	34 ug

Para la corrida de fermentación 050608-1 (carbono en
20 exceso), la alimentación fue iniciada a inducción y las
velocidades de alimentación fueron ajustadas manualmente para
proporcionar glucosa en las concentraciones mostradas en la
Figura 12C. Para la corrida de fermentación 050629-1 (carbono-
restringida), la alimentación fue alimentada al fermentador de
25 acuerdo con el protocolo mostrado en la Tabla 5. Para la

corrida de fermentación 060403-3 (contenido más bajo de carbono), la alimentación fue iniciada automáticamente cuando el bolo de glucosa inicial (15 g) fue expulsado y el oxígeno disuelto proyectado. Hasta un máximo de 27.6 g/h, la velocidad de la alimentación fue calculada de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$m_s(t) = S(t_0)\mu e^{\mu(t-t_0)}$$

$$\mu = 0.12$$

$$S(t_0) = 15g$$

10

en donde t_0 es el tiempo al cual la glucosa inicial fue agotada. Después de alcanzar la velocidad máxima, la alimentación de glucosa fue restringida a una velocidad de 9.5 g/h y mantenida constante a esta velocidad por el resto de la corrida.

15

20

25

Tabla 5- Protocolo de alimentación para la corrida de fermentación 050629-1

	Tiempo de corrida (h)	Velocidad alimentación glucosa (g/h)
	0	0
5	7	0.37
	10	0.74
	12	1.11
	14	1.48
	16	2.22
10	18	2.96
	20	3.69
	22	4.80
	24	5.91
	31	7.39
	33	5.54
15	47	3.69

Las corridas 050608-1 y 050629-1 se llevaron a cabo a 37° C. El flujo de aire en el bioreactor fue ajustado a 1-2 l/minuto; el pH fue mantenido a 7 utilizando hidróxido de amonio y/o hidróxido de sodio; la agitación inicial fue de 500-600 rpm; la espuma fue controlada con antiespumante B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO); los niveles de oxígeno disuelto fueron mantenidos por encima de 30% utilizando una cascada de agitación. Después de 5-6 horas de cultivo, la producción de

amorfa-4,11-dieno por la célula huésped fue inducida al agregar 0.8 ml de IPTG 1 M a la corrida 050608-1 y 1.2 ml de IPTG a la corrida 050629-1. Después de la inducción, la temperatura del cultivo fue reducida a 30°C.

5 La corrida 060403-3 fue llevada a cabo a 30°C. El flujo de aire en el bioreactor fue ajustado a 1-2 l/min; el pH fue mantenido a 7 utilizando hidróxido de amonio. El oxígeno disuelto fue mantenido por encima de 30% mediante una cascada de agitación y enriquecimiento de oxígeno. A una OD₆₀₀ de
10 aproximadamente 28 (19 horas después de la inoculación), la producción de amorfa-4,11-dieno por las células huésped fue inducida al agregar 1 ml de IPTG 1 M.

 El amorfa-4,11-dieno fue capturado y extraído de acuerdo con dos protocolos diferentes. Para las corridas
15 050608-1 y 050629-1, el amorfa-4,11-dieno volátil presente en el gas de desprendimiento fue capturado al ventilar el gas de desprendimiento a través de un lavador de gas que contiene 200 ml de heptanol. El heptanol fue luego diluido en acetato de etilo hasta que la concentración de amorfa-4,11-dieno en la
20 muestra era de entre 0.63 mg/l y 20 mg/l. Para la corrida 060403-3, el amorfa-4,11-dieno fue capturado en el bioreactor al agregar 200 ml de un depósito superficial orgánico al fermentador al tiempo de inducción. La concentración del producto fue medida al combinar 25 ul del caldo más el depósito
25 superficial orgánico con 975 ul de acetonitrilo, agitando la

muestra a velocidad máxima sobre un mezclador Fisher Vortex Genie 2™ (Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY) por al menos 3 minutos, removiendo las células de la muestra mediante centrifugación y diluyendo la solución de acetonitrilo en 5 acetato de etilo hasta que la concentración de amorfa-4,11-dieno en la muestra era de entre 0.63 y 20 mg/l. Las muestras de acetato de etilo fueron analizadas mediante GC/MS como se describe en el Ejemplo 10.

Como se muestra en las Figuras 12A y 12B, la corrida 10 de fermentación 050608-1 (carbono en exceso) dio como resultado bajas densidades de células máximas y baja producción de amorfa-4,11-dieno, respectivamente, correlacionándose, por lo menos en parte, con el incremento relativamente rápido en niveles de acetato (Figura 12D). En comparación, la corrida de 15 fermentación 050629-1 (carbono-restringido) dio como resultado una producción incrementada de amorfa-4,11-dieno (Figura 12B) e inicio retardado de la producción de acetato. Estos resultados son consistentes con la hipótesis de que las alimentaciones de glucosa en exceso conducen a una producción rápida de acetato y 20 muerte celular prematura.

Una restricción de glucosa adicional, tal como se obtiene por la corrida de fermentación 060403-3 (contenido de carbono más bajo) dio como resultado una baja producción de acetato por más de 100 horas (Figura 12D) y una densidad

celular máxima significativamente más alta y producción de amorfa-4,11-dieno (Figuras 12A y 12B).

Ejemplo 13

5 Este ejemplo demuestra la producción de amorfa-4,11-dieno incrementada por una cepa huésped de *Escherichia coli* cultivada bajo condiciones de fuente de carbono restringida y a temperatura subóptima.

10 Un cultivo de siembra de la cepa huésped B153 fue establecido al agregar una alícuota concentrada de la cepa a un matraz de 250 ml que contiene 50 ml de medio M9-MOPS y antibióticos como se detalla en la Tabla 1 y cultivar el cultivo a 37° C sobre un agitador giratorio a 250 rpm a una OD₆₀₀ de 3.5 a 4.5.

15 Bioreactores de 2 litros (Biocontroller ADI 1010 con Bioconsole ADI 1025, Applikon Biotechnology, Foster City, CA) fueron montados y puestos en operación de la misma manera como se describe en el Ejemplo 12 para la corrida 060403-3, excepto que la cepa y tiempo de inducción fueron variados.

20 La producción de amorfa-4,11-dieno en las células huésped fue inducida al agregar 1 ml de IPTG 1 M al medio de cultivo. En la corrida de fermentación mostrada en la Figura 13 A, la síntesis de amorfa-4,11-dieno fue inducida a una OD₆₀₀ de aproximadamente 2, en tanto que el fermentador todavía
25 contenía glucosa en exceso. En la corrida de fermentación

mostrada en la figura 13B, la síntesis de amorfa-4,11-dieno fue inducida a una OD₆₀₀ de aproximadamente 33, que fue después que la alimentación de glucosa-restringida había iniciado.

El amorfa-4,11-dieno fue capturado y extraído de acuerdo con dos protocolos diferentes. Para la corrida de fermentación mostrada en la Figura 13A, el amorfa-4,11-dieno volátil presente en el gas de desprendimiento fue capturado al ventilar el gas de desprendimiento a través de un lavador de gas que contiene 200 ml de heptanol. El heptanol fue luego diluido en acetato de etilo hasta que la concentración de amorfa-4,11-dieno en la muestra era de entre 0.63 y 20 mg/l. Para la corrida de fermentación mostrada en la Figura 13B, el amorfa-4,11-dieno fue capturado al agregar 200 ml de un depósito superficial orgánico al fermentador al tiempo de la inducción.

El amorfa-4,11-dieno fue extraído del medio de cultivo al combinar 25 ul de caldo con 975 ul de acetonitrilo, agitando la muestra a velocidad máxima sobre un mezclador Fisher Vortex Genie 2™ (Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY) por lo menos 3 minutos, removiendo las células de la muestra mediante centrifugación y diluyendo la solución de acetonitrilo en acetato de etilo hasta que la concentración de amorfa-4,11-dieno en la muestra era de entre 0.63 y 20 mg/l. Las muestras de acetato de etilo fueron analizadas mediante GC/MS como se describe en el Ejemplo 10. Para la corrida de

fermentación mostrada en la figura 13A, la cantidad total de amorfa-4,11-dieno fue derivada al combinar las cantidades presentes en el gas de desprendimiento y en el medio de cultivo y dividir el total por el volumen del fermentador.

5 La fermentación mostrada en la figura 13A alcanzó una OD₆₀₀ máxima de 93 y una concentración de amorfa-4,11-dieno máxima de 3.2 g/l. En contraste, la fermentación mostrada en la figura 13B alcanzó una OD₆₀₀ de 245 y una concentración de amorfa-4,11-dieno máxima de 15 g/l. Una explicación probable
10 por las diferencias en el crecimiento del cultivo y niveles de producción de amorfa-4,11-dieno observados en los dos cultivos es que en la corrida de fermentación mostrada en la Figura 13A, la producción de amorfa-4,11-dieno fue inducida después que la glucosa en exceso fue consumida y que la disponibilidad sin
15 restricción de glucosa provocó muerte celular al permitir la acumulación de niveles tóxicos de intermediarios de la ruta de mevalonato. En la corrida de fermentación mostrada en la Figura 13B, la inducción ocurrió después que la administración de glucosa fue restringida, lo que impidió la acumulación de
20 intermediarios de ruta, conduciendo a una densidad celular más alta y niveles de producción de amorfa-4,11-dieno más alto.

Ejemplo 14

Este ejemplo demuestra la producción de amorfa-4,11-
25 dieno incrementada por una cepa huésped de Escherichia coli

cultivada bajo condiciones de fuente de carbono y nitrógeno restringidas y a temperatura subóptima.

Un cultivo de siembra de la cepa huésped B86 fue establecido al agregar una alícuota concentrada de la cepa a un
 5 matraz de 250 ml que contiene 50 ml de medio M9-MOPS y antibióticos como se detalla en la Tabla 1. El cultivo fue cultivado durante toda la noche a 37° C sobre un agitador giratorio a 250 rpm, sub-cultivado la siguiente mañana al mismo medio a una OD₆₀₀ de aproximadamente 1 y cultivado otra vez a
 10 37° C y 250 rpm a una OD₆₀₀ de 3 a 5.

Cuatro bioreactores de 2 litros (Biocontroller ADI 1010 con bioconsola ADI 1025, Applikon Biotechnology, Foster City, CA) fueron montados y puestos en operación de la misma manera como se describe en el Ejemplo 12 para la corrida
 15 060403-3, excepto que las corridas restringidas de nitrógeno no contenían sulfato de amonio en la alimentación .

Una alimentación de glucosa exponencial con un tiempo de duplicación de 6 horas fue iniciado automáticamente cuando el bolo de glucosa inicial (15 g) fue expulsado y el oxígeno
 20 disuelto proyectado. Hasta un máximo de 30.4 g/h la velocidad de alimentación fue calculada de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$m_s(t) = S_0 \mu e^{\mu(t-t_0)}$$

$$\mu = 0.12 \text{ min}^{-1}$$

$$S_0 = 15 \text{ g}$$

en donde μ es la velocidad de crecimiento específica y t_0 es el tiempo al cual el bolo de glucosa inicial fue agotado. Después de llegar a la velocidad máxima, la alimentación de glucosa fue reducida a una velocidad de 11.4 g/h y mantenida constante a esta velocidad por el resto de la corrida. En las corridas de fermentación 060710-4, 060724-5 y 060619-5 (carbono-y nitrógeno-restringidas), la alimentación de glucosa fue reducida adicionalmente cuando la restricción de amoníaco condujo a acumulación de glucosa en el medio.

La fermentación se llevó a cabo a temperaturas reducidas de 30°C. El flujo de aire en el bioreactor fue ajustado a 1 vvm; la agitación inicial fue a 700 rpm; la espuma fue controlada con antiespumante B (Sigma-Aldich, St. Louis, MO); y la tensión de oxígeno disuelto fue controlada a 40% utilizando una cascada de agitación (700-1,200 rpm) y enriquecimiento de oxígeno. En la corrida de fermentación 060327-3 (carbono-restringida), el pH fue mantenido a 7 utilizando NH_4OH al 20%; en las corridas de fermentación 060724-4, 060724-5 y 060619-5 (carbono- y nitrógeno-restringidas), el pH fue mantenido a 7 inicialmente usando NH_4OH , al 20% y agitando a 72 horas al usar una mezcla 50/50 de NaOH 2.5 N y NH_4OH 10 N para restringir adicionalmente la cantidad de amoníaco que avanza al fermentador.

La producción de amorfa-4,11-dieno en las células huésped fue inducida a una OD₆₀₀ de aproximadamente 30 al agregar 1 ml de IPTG 1 M al medio de cultivo.

El amorfa-4,11-dieno fue capturado mediante depósito superficial del medio con 10% (v/v) de un depósito superficial orgánico. Luego el amorfa-4,11-dieno fue extraído al combinar 25 ul de caldo con 975 ul de metanol, agitando la muestra a velocidad máxima sobre un mezclador Fisher Vortex Genie 2™ (Scientific Industries, Inc., Bohemia, N. Y.) por al menos 15 minutos, removiendo las células de la muestra mediante centrifugación y agregando 10 ul de la solución de metanol a 990 ul de acetato de etilo que contiene 10 ul/L de trans-cariofileno.

Las muestras fueron analizadas mediante GC/MS como se describe en el Ejemplo 10.

Las figuras 14A-E muestran datos de la corrida de fermentación 060327-3 (carbano-restringida). La fermentación produjo una concentración máxima de amorfa-4,11-dieno de 16 g/l (Figura 14A). La productividad volumétrica máxima de la cepa huésped fue de más de 200 mg/l/hora (Figura 14B). La productividad específica máxima de la cepa huésped fue de >2 mg/l/h/OD₆₀₀ (Figura 14C). La concentración de amoníaco en el medio de cultivo fue de aproximadamente 30 mM al inicio de la corrida de fermentación, se elevó a aproximadamente 76 mM después de la adición de la solución de alimentación durante la

fase de crecimiento exponencial y permaneció por encima de 60 mM por el resto de la corrida (Figura 14D). La OD₆₀₀ máxima llegó a aproximadamente 290 (Figura 14D) correspondiente a 116 g DCW/L. La concentración de glucosa en el medio de cultivo
5 cayó de 15 g/l a menos de 1 g/l en menos de 20 horas y permaneció baja (Figura 14E). Los niveles de acetato fueron bajos en toda la fermentación (Figura 14E).

Las Figuras 15A-E muestran datos de corridas de fermentación 060710-4, 060724-5 y 060619-5 (carbono- y
10 nitrógeno- restringidas). Las fermentaciones produjeron una concentración máxima de amorfa-4,11-dieno de aproximadamente 20 g/l a 30 g/l (Figura 15A). La productividad volumétrica máxima de la cepa huésped fue de más de 400 mg/l/h en todas las 3 corridas de fermentación (Figura 15B), que es
15 significativamente más alta que la productividad volumétrica máxima obtenida en la fermentación sin restricción de nitrógeno (Figura 14B). La productividad máxima específica de la cepa huésped fue de >2 mg/l/h/OD₆₀₀ para todas las corridas y seguía siendo alta en todas las corridas (Figura 15C). La
20 concentración de amoníaco en el medio de cultivo fue de aproximadamente 35 mM a 50 mM al inicio de las corridas de fermentación, cayó después de la adición de la solución de la alimentación durante el crecimiento exponencial y siguió siendo baja a menos de 10 mM por el resto de la corrida (Figura 15D).
25 (Los niveles de amoníaco disminuidos se compararon con la

corrida de fermentación 060327-3 (Figura 14D) son debidos a la carencia de amoniaco en la solución de la alimentación y amoniaco reducido en la base usada para mantener el pH. Las corridas de fermentación 060710-4 y 060619-5 mostraron una
 5 proyección en concentración de amoniaco al final de las corridas pero las proyecciones ocurrieron después del global de la producción de amorfa-4,11-dieno. La OD₆₀₀ alcanzada fue de 170 a 220 (Figura 15D), correspondiente a 68 g a 88 g DCW/l. La concentración de glucosa en el medio de cultivo cayó de 15 g/l
 10 a menos de 1 g/l en menos de 20 horas y siguió siendo baja (Figura 15E). Los niveles de acetato fueron bajos en todas las corridas de fermentación (Figura 15E).

Ejemplo 15

15 Este ejemplo describe la producción de amorfa-4,11-dieno vía la ruta de DXP en una cepa huésped de Escherichia coli.

Cultivos de siembra de la cepas huésped B003, B617, B618, fueron establecidos al agregar una alícuota concentrada
 20 de cada cepa a matraces de 125 ml separados que contienen 25 ml de M9-MOPS y antibióticos como se detallan en la Tabla 1 y al cultivar los cultivos durante toda la noche.

Los cultivos de siembra fueron usados para inocular a una OD₆₀₀ inicial de aproximadamente 0.05, matraces de 250 ml
 25 separados que contienen 40 ml de medio M9-MOPS, 45 ug/ml de

tiamina, micronutrientes, 1.00×10^{-5} mol/litro de FeSO_4 , 0 MOPS 1 M, extracto de levadura al 0.5%, 20 g/l de D-glucosa y antibióticos. Los cultivos fueron incubados a 30°C en un agitador de incubación humidificado a 250 rpm hasta que
5 alcanzaron una D_{600} de 0.2 a 0.3, punto en el cual la producción de amorfa-4,11-dieno en las células huésped fue inducida al agregar 40 μl de IPTG 1 M al medio de cultivo.

Al tiempo de inducción, los cultivos fueron recubiertos con 8 ml de un depósito superficial orgánico para
10 capturar el amorfa-4,11-dieno. Se tomaron muestras en varios puntos en el tiempo y el amorfa-4,11-dieno fue extraído y analizado mediante GC/MS como se describe en el Ejemplo 10. Se llevaron a cabo experimentos utilizando dos clones independientes de cada cepa huésped y los resultados fueron
15 promediados. Se encontró que la desviación entre las muestras era menor de 10%.

Como se muestra en la Figura 16, la cepa huésped de *Escherichia coli* B619, que comprende secuencias de nucleótidos que codifican enzimas de la ruta de DXP plenamente diseñada,
20 produjo aproximadamente 45 mg/g de DCW amorfa-4,11-dieno.

Ejemplo 16

Este ejemplo describe la producción de 3-metil-but-3-en-1-ol y 3-metil-but-2-en-1-ol en cepas huésped de *Escherichia coli*
25

Cultivos de siembra de cepas huésped B286, B287, B288 y B291 fueron establecidos mediante rallado de una alícuota concentrada de cada cepa sobre agar de LB que contiene antibióticos como se detallan en la Tabla 1. Tres colonias
5 independientes fueron proyectadas para cada cepa y cada colonia fue inoculada a 7 ml de LB que contiene antibióticos. Los cultivos fueron cultivados durante toda la noche a 37° C sobre un agitador giratorio a 250 rpm hasta tarde en la fase exponencial. Luego los cultivos fueron inoculados a una OD₆₀₀ de
10 aproximadamente 0.05 a un matraz de 250 ml que contiene 40 ml de M9-MOPS, glucosa al 2%, extracto de levadura al 0.5% y antibióticos. Los cultivos fueron cultivados durante toda la noche a 37° C sobre un agitador giratorio a 250 rpm hasta que llegaron a una OD₆₀₀ de aproximadamente 0.2, punto en el cual
15 fueron inducidos al agregar 40 ul de IPTG 1 M. Los cultivos fueron cultivados durante 72 horas a 30° C sobre un agitador giratorio a 250 rpm. De una a dos veces al día, la OD₆₀₀ de cada cultivo fue medido y una muestra de 700 ul fue removida. Para extraer el 3-metil-but-3-en-1-ol y 3-metil-but-2-en-1-ol del
20 caldo de cultivo, se agregaron 600 ul de acetato de etilo a 300 ul de cada muestra removida. Luego la muestra fue sometida a vértice durante 15 minutos y 400 ul de la fase de acetato de etilo superior fueron transferidos a un matraz de vidrio limpio para su análisis.

Las muestras fueron analizadas sobre un cromatógrafo de gases/espectrómetro de masas (GC/MS) Hewlett-Packard 6890. Una muestra de 1 μ l fue separada sobre el GC utilizando una columna de DB-5 (Agilent Technologies, Inc , Palo Alto, CA) y gas portador de helio. El programa de temperatura para el análisis fue como sigue: 60° C durante 3 minutos, incrementando la temperatura a 60° C/min a una temperatura de 300° C y mantenida a 300° C durante dos minutos. El tiempo de corrida total fue de 9 minutos. Las muestras resueltas fueron analizadas mediante un detector selectivo de masas Hewlett-Packard modelo 5973. Los espectros de masa previos demostraron que 3-metil-3-buten-1-ol y 3-metil-2-buten-1-ol tienen un tiempo de retención de 2.067 minutos utilizando este protocolo de GC. Para enfocar la detección sobre 3-metil-but-3-en-1-ol y 3-metil-but-2-en-1-ol, un método de monitoreo ion selectivo fue empleado que monitorea solamente iones 56 y 68 en 3-metil-but-3-en-1-ol y 3-metil-but-2-en-1-ol.

Ejemplo 17

Este ejemplo describe la producción de amorfa-4,11-dieno mediante una cepa huésped de *Saccharomyces cerevisiae*.

La generación de la cepa huésped EPY224 es descrita en Ro et al (Nature 440 940-943, 2006) y en la publicación de patente PCT WO2007/005604. La cepa huésped EPY224 fue curada del plásmido de expresión pRS425ADS mediante cultivo en medio

YPD (Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual, 2005 ed , ISBN 0-87969-728-8), deposición para colonias individuales sobre agar de YPD y luego parche de colonias individuales sobre agar de CSM-Met y agar de CSM-Met Leu. Los clones que crecieron sobre el agar CSM-Met His pero no sobre el agar CSM- Met Leu fueron curados (esto es, habían perdido el plásmido pRS425ADS). Uno de tales clones fue designado como EPY300. EPY300 fue transformado con el plásmido de expresión pRS425-ADS-LEU2d un plásmido idéntico a pRS425-ADS excepto que en lugar de LEU2 contiene un marcador de selección de LEU2d (Erhart and Hollenberg (1983) J Bactenol 156 625-635) produciendo la cepa huésped Y185.

Transformantes de célula huésped de Y185 fueron seleccionados sobre medios definidos sintéticos que contienen glucosa al 2% y todos los aminoácidos excepto histidina, leucina y metionina (CSM-glucose, MP Biomedicals, Solon, OH). La cepa huésped EPY300 es auxotrófica para la biosíntesis de leucina (leu2), pero el plásmido de expresión en Y185 restaura la prototrofia de leucina (LEU2). Colonias individuales fueron parchadas sobre medios selectivos (CSM-glucosa-histidina, leucina, metionina) y cultivados por dos días. Las células fueron raspadas de la placa y transferidas a 1 ml de glicerol al 25% (v/v) en un cri-otubo. La suspensión fue mezclada y luego almacenada a -80° C.

Matraces de siembra de la cepa huésped Y185 fueron establecidos al agregar una alícuota concentrada de la cepa a un matraz de 125 ml que contiene 25 ml de CSM-glucosa que carece de leucina y metionina y al cultivar los cultivos durante toda la noche. Los cultivos fueron usados para inocular a una OD₆₀₀ de aproximadamente 0.025 un matraz con deflectores de 250 ml que contiene 40 ml de medio definido sintético que carece de leucina y contiene glucosa al 0.2%, galactosa al 1.8% y metionina 1 mM. El cultivo fue mantenido a 30° C sobre un agitador giratorio a 200 rpm. Debido a que la presencia de glucosa en el medio impide la inducción del promotor de GAL1 mediante galactosa, la producción de amorfa-4,11-dieno no fue inducida hasta que las células habían usado la glucosa en el medio y habían cambiado a usar galactosa como su fuente de carbono principal. Al tiempo de inoculación, los cultivos fueron recubiertos con 8 ml de un depósito superficial orgánico para capturar el amorfa-4,11-dieno. Las muestras fueron tomadas a 72 horas al transferir 5 ul de la capa de solvente orgánico a un frasco de vidrio limpio que contiene 500 ul de acetato de etilo que contiene una concentración conocida de beta- o trans-cariofileno como un estándar interno.

Las muestras del depósito superficial/acetato de etilo fueron analizadas en un cromatógrafo de gases/espectrómetro de masas (GS/MS) Hewlett-Packard 6890 como se describe en el Ejemplo 10.

Después de 72 horas de cultivo, se encontró que 3 cultivos de levadura producen 60.68, 54.48 y 59.25 mg/l de amorfa-4,11-dieno.

5 **Ejemplo 18**

Este ejemplo describe la producción de amorfa-4,11-dieno en una cepa huésped de *Saccharomyces cerevisiae* en donde el huésped cepa incluye una ruta de mevalonato nativa también como la ruta de mevalonato heteróloga que está bajo control de
10 un control regulatorio heterólogo.

Las cepas huésped CEN.PK2-1C (Y002) (MATA; ura3-52; trp1-289; leu2-3,112; his3Δ1, MAL2-8C, SUC2) y CEN.PK2-1D (Y003) (MATα; ura3-52; trp1-289; leu2-3,112; his3Δ1; MAL2-8C; SUC2) (J. P. van Dijken et al, *Enzyme Microb Technol* 26,
15 706 (1 de junio de 2000) fueron cultivadas ya sea en medio rico estándar (YPD) o en medio sintético definido (. D. Rose, F. Winston, P. Heiter, *Methods in yeast genetics: a laboratory course manual*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1990) que carece de nutrientes apropiados
20 que permite la selección de transformantes integrativos, retención de plásmido y progenie meiótica.

Las transformaciones ADN-moderadas a *S cerevisiae* se llevaron a cabo utilizando el procedimiento de acetato de litio como se describe por R. H. Schiestl, R D. Gietz, *Curr Genet* 16,
25 339 (Diciembre 1989). Todas las disrupciones genéticas y

reemplazos fueron confirmados mediante análisis fenotípico, reacción en cadena de polimerasa de colonia ("PCR") y secuenciación de ADN genómico amplificado. Los plásmidos pAM489-pAM498 fueron contruidos utilizando el pCR 2.1 (Invitrogen, Carlsbad CA) y son descritos esquemáticamente por la Figura 7A-C y Tabla 6. Las secuencias de marcador de HISMX son descritas en M. S. Longtine et al, Yeast 14, 953 (julio de 1998). La propagación de ADN de plásmido fue efectuada en cepa DH5α de *Escherichia coli*.

Tabla 6

Cepa	5'HR	Gen #1	Promotor de Crack	Promotor de Watson	Gen #2	Marcador genético	3'HR
pAM489	TRP1	tHMGR	GAL1	GAL10	ERG20	TRP1	TRP1
pAM490	TRP1	tHMGR	CUP1	CUP1	ERG20	TRP1	TRP1
pAM491	URA3	tHMGR	GAL1	GAL10	ERG13	URA3	URA3
pAM492	URA3	ID11	CUP1	CUP1	tHMGR	URA3	URA3
pAM493	ADE1	tHMGR	GAL1	GAL10	ID11	ADE1	URA3
pAM494	ADE1	tHMGR	CUP1	CUP1	ID11	ADE1	ADE1
pAM495	HIS3	ERG12	GAL1	GAL10	ERG10	HISMX	HIS3
pAM496	HIS3	ERG12	CUP1	CUP1	ERG10	HISMX	HIS3
pAM497	LEU2	ERG19	GAL1	GAL1	ERG8	HISMX	LEU2
pAM498	LEU2	ERG19	CUP1	CUP1	ERG8	HISMX	LEU2

Las cepas de *S. cerevisiae* Y002 e Y003 fueron preparadas para introducción de genes de ruta de mevalonato inducibles mediante lo siguiente. El promotor de ERG9 fue

reemplazado con el promotor de MET3 de *S. cerevisiae* mediante
amplificación de PCR de la región de KanMX-PMET3 de pAM328 (SEQ
ID NO: 43) utilizando los cebadores 50-56-pw100-G (SEQ ID NO:
44) y 50-56-pw101-G (SEQ ID NO: 45) que contienen 25 pares de
5 bases de homología al promotor de *ERG9* natural. 10 µg del
producto de PCR resultante fueron transformados a cepas de Y002
e Y003 que crecen exponencialmente utilizando 40% peso/peso de
polietilenglicol 3350 (Sigma-Aldrich St. Louis, MO), acetato de
litio 100 mM (Sigma), ADN de esperma de salmón 10 µg
10 (Invitrogen) e incubación a 30°C durante 30 minutos seguido por
choque térmico a 42°C durante 30 minutos (como se describe por
by Schiestl & Gietz, *Curr. Genet.* 16: 339 (1989)). Los
recombinantes positivos fueron identificados por su habilidad
para crecer sobre medio rico que contiene 0.5 µg/ml de
15 Geneticina (Invitrogen Co, Carlsbad, CA) y confirmado mediante
PCR de diagnóstico. Se dio a los clones resultantes la
designación Y93 (MAT A) e Y94 (MAT alfa). Enseguida, el cuadro
de lectura abierta *ADE1* fue reemplazado con del gen *LEU2* de
Candida glabrata (CgLEU2). El sitio genómico de CgLEU2 de 3.5KB
20 fue amplificado de ADN genómico de *C. glabrata* (ATCC, Manassas,
VA) utilizando los cebadores 61-67-CPK066-G (SEQ ID NO: 46) y
61-67-CPK067-G (SEQ ID NO: 47) que contiene 50 pares de bases
de homología de flanqueo al cuadro de lectura abierta de *ADE1*
(ORF). 10 µg del producto de PCR resultante fueron
25 transformados a Y93 e Y94 que crecen exponencialmente como se

describe anteriormente. Las cepas *adel*- fueron seleccionadas para cultivo en ausencia de complementación de leucina y confirmadas mediante PCR de diagnóstico. Se dio a los clones resultantes la designación Y176 (MAT A) e Y177 (MAT alfa).

5 Para generar la cepa Y188 de *S. cerevisiae*, 2 µg de ADN de plásmido de pAM491 (SEQ ID NO: 48) y pAM495 (SEQ ID NO: 49), respectivamente, fueron sometidos a digestión durante toda la noche con *PmeI* (New England Biolabs, Beverly, MA) e introducido a Y176 que crece exponencialmente como se describe
10 anteriormente. Los recombinantes positivos fueron seleccionados para cultivo sobre medio que carece de uracilo e histidina. La integración al sitio genómico correcto fue confirmada mediante PCR de diagnóstico.

 Para generar la cepa Y189 de *S. cerevisiae*, 2 µg de
15 ADN de plásmido de pAM489 (SEQ ID NO: 50) y pAM497 (SEQ ID NO: 51), respectivamente, fueron sometidos a digestión durante toda la noche con *PmeI* e introducidos a Y177 que crece exponencialmente como se describe anteriormente. Los recombinantes positivos fueron seleccionados mediante cultivo
20 sobre medio que carece de triptófano e histidina. La integración al sitio genómico correcto fue confirmada mediante PCR de diagnóstico.

 Aproximadamente 1×10^7 células de Y188 e Y189 fueron mezcladas sobre una placa de medio de YPD durante 6 horas a
25 temperatura ambiente para permitir el acoplamiento. Luego el

cultivo celular mezclado fue depositado a un medio que carece de histidina, uracilo y triptófano para seleccionar para el cultivo células dipoloides. 2 µg de ADN de plásmido de pAM493 (SEQ ID NO: 52) fueron sometidos a digestión durante toda la
5 noche con PmeI e introducidos a células diploides que crecen exponencialmente como se describe anteriormente. Los recombinantes positivos fueron seleccionados para cultivo sobre medio que carece de adenina. La integración al sitio genómico correcto fue confirmada mediante PCR de diagnóstico. Se dio a
10 la cepa resultante la designación Y238.

Para generar cepas haploides que contienen el pleno complemento de genes introducidos, Y238 fue esporulado en acetato de potasio al 2% y medio líquido de rafinosa al 0.02%. Aproximadamente 200 tetrads genéticos (tetrads son productos
15 meióticos de cuatro esporas) fueron aislados utilizando un manipulador de Singer Instruments MSM300 serie (Singer Instrument Co, LTD. Somerset, UK). Aislados genéticos independientes que contienen el complemento apropiado de material genético introducido fueron identificados por su
20 habilidad para crecer en ausencia de adenina, histidina, uracilo y triptófano. La integración de todos los ADN introducidos fue confirmada mediante PCR de diagnóstico. Se dio a las cepas resultantes la designación Y210 (MAT A) e Y211 (MAT alfa).

2 µg de ADN de plásmido de pAM426 (SEQ ID NO: 53), que contiene amofadeína sintasa (ADS) optimizada de codón de *S. cerevisiae* expresado del promotor GAL1 de *S. cerevisiae*, fue introducido a Y210 e Y211 que crecen exponencialmente como se describe anteriormente. Las cepas de *S. cerevisiae* que 5 contenían el plásmido pAM426 fueron seleccionadas en cuando a su habilidad para hacer en la ausencia de complementación de leucina. Se dio a las cepas resultantes la designación Y225 (MAT A) y Y227 (MAT alfa).

10 2 µg del ADN de plásmido de pAM322 (SEQ ID NO: 54), que contiene la amorfadeína sintasa (ADS) optimizada por codón de *S. cerevisiae* y citocromo P450 monooxigenasa (AMO) expresada del GAL1 de *S. cerevisiae* y la citocromo P450 oxidoreductasa (CPR) expresada del promotor de GAL10 de *S. cerevisiae*, fue 15 introducida a Y210 e Y211 que crecen exponencialmente como se describe anteriormente. Las cepas de *S. cerevisiae* que contenían el plásmido pAM322 fueron seleccionadas en cuanto a su habilidad para hacer crecer en la ausencia de complementación de leucina. Se dio a las cepas resultantes la 20 designación Y222 (MAT A) y Y224 (MAT alfa).

Ejemplo 19

Este ejemplo describe la producción de α -farneseno o β -farneseno en cepas huésped de *Escherichia coli*.

Cultivos de siembra de cepas huésped B552 y B592 fueron establecidos al agregar una alícuota concentrada de cada cepa a un matraz de 125 ml que contiene 25 ml M9-MOPS, glucosa al 0.8%, extracto de levadura 0.5% y antibióticos como se
5 detalla en la Tabla 1 y al cultivar los cultivos durante toda la noche.

Los cultivos de siembra fueron usados para inocular a una OD₆₀₀ inicial de aproximadamente 0.05, matraces de 250 ml que contienen 40 ml de M9-MOPS, glucosa al 2%, extracto de
10 levadura al 0.5% y antibióticos. Los cultivos fueron incubados a 30°C sobre un agitador giratorio a 250 rpm hasta que alcanzaron una OD₆₀₀ de aproximadamente 0.2, punto en el cual la producción de α -farneseno o β -farneseno en las células huésped fue inducida al agregar 40 μ l de IPTG 1 M. Al tiempo de la
15 inducción, los cultivos fueron sobretendidos con 8 ml de un sobretendido orgánico para capturar el α -farneseno. Se tomaron muestras cada 24 horas hasta 120 horas (total de 5 puntos en el tiempo) al transferir 2 μ l a 10 μ l de la capa de sobretendido orgánica a un frasco de vidrio limpio que contiene 1 ml de
20 acetato de etilo proyectado con trans-cariofileno como estándar interno. Además, alícuotas de 1 ml de los cultivos fueron centrifugados, las pelotillas celulares fueron resuspendidas en 250 μ l de agua estéril y las suspensiones celulares fueron transferidas a un frasco de vidrio que contiene 1 ml de acetato
25 de etilo proyectado con trans-cariofileno como estándar

interno. Además, alícuotas de 0.5 ml de caldo de cultivo entero fueron agregadas a frascos de vidrio que contienen 1 ml de acetato de etilo proyectado con trans-cariofileno como estándar interno. Las muestras de caldo de cultivo enteras fueron
5 extraídas en acetato de etilo al someter a vórtice los frascos de vidrio durante 10 minutos, después de lo cual 600 μ l de la extracción de acetato de etilo fue transferida a un frasco de vidrio limpio.

Las muestras del depósito superficial
10 orgánico/acetato de etilo y las muestras de caldo de cultivo entero extraídas con acetato de etilo fueron analizadas sobre un cromatógrafo de gases Agilent 6890N equipado con un espectrómetro de masas Agilent 5975 (GC/MS) en un modo de pleno barrido (50-500 m/z). Para hacer expeditos los tiempos de
15 corrida, el programa de temperatura y matriz de columna fueron modificados para obtener una resolución de proyección óptima y el tiempo de corrida global más corto. Una muestra de 1 μ l fue separada utilizando una columna de HP-5MS (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA) y gas portador de helio. El
20 programa de temperatura para el análisis fue como sigue: 150°C mantenido durante 3 minutos, incrementando la temperatura a 25°C/minuto a una temperatura de 200°C, incrementando la temperatura a 60°C/minuto a una temperatura de 300°C y manteniendo a 300°C por 1 minuto. Los espectros de masas
25 previos demostraron que el producto de β -farneseno sintasa era

β -farneseno, y que el β -farneseno tenía un tiempo de retención de 4.33 minutos utilizando este protocolo de GC. Los títulos de farneseno fueron calculados al comparar las áreas pico generadas contra una curva de calibración cuantitativa de β -farneseno purificado (Sigma-Aldrich Chemical Company, St. Louis, MO) en acetato de etilo proyectado con trans-cariofileno.

La cepa huésped B592 produjo aproximadamente 400 mg/l de α -farneseno a 120 horas (promediadas en 3 clones independientes) y tuvo una productividad específica máxima de aproximadamente 46 mg/l/OD₆₀₀). La cepa huésped B552 produjo aproximadamente 1.1 g/L de β -farneseno a 120 horas (promediada en 3 clones independientes) y tuvo una productividad específica máxima de aproximadamente 96 mg/l/OD₆₀₀ (1 clon representativo).

15

Ejemplo 20

Este ejemplo describe la producción de β -farneseno vía la ruta DXP en una huésped cepa de *Escherichia coli*.

Cultivos de siembra de cepas huésped B650, B651, B652 y B653 fueron establecidos al agregar una alícuota concentrada de cada cepa a matraces de 125 ml separados que contienen 25 ml de M9-MOPS y antibióticos como se detalla en la Tabla 1 y al cultivar los cultivos durante toda la noche.

Los cultivos de siembra fueron usados para inocular a una OD₆₀₀ inicial de aproximadamente 0.05 matraces de 250 ml

separados que contienen 40 ml de medio mínimo de M9-MOPS, 45 ug/ml de tiamina, micronutrientes, FeSO_4 1.00×10^{-5} moles/L, MOPS 0.1 M, extracto de levadura al 0.5%, 20 g/L de D-glucosa y antibióticos. Los cultivos fueron incubados a 30°C en un
 5 agitador de incubación humidificado a 250 rpm hasta que alcanzaron una OD_{600} de 0.2 a 0.3, punto en el cual la producción de β -farneseno en las células huésped fue inducida al agregar 40 ul de IPTG 1 M al el medio de cultivo. Al tiempo de la inducción, los cultivos fueron recubiertos con 8 ml de un
 10 depósito superficial orgánico para capturar el β -farneseno. Se tomaron muestras en varios puntos en el tiempo al transferir muestras de 100 ul de la capa recubierta orgánica superior a un tubo limpio. El tubo fue centrifugado para separar cualesquier células o medio restantes y 10 ul de las muestras de
 15 sobretendido orgánico fueron transferidas a 500 ul de acetato de etilo proyectado con beta- o trans-cariofileno como estándar interno en frascos de GC de vidrio limpio. Las mezclas fueron sometidas a vórtice durante 30 segundos y luego analizadas como se describe en el Ejemplo 18. La cepa huésped de *Escherichia*
 20 *coli* B653 produjo aproximadamente 7 mg/g de DCW β -farneseno.

Ejemplo 21

Este ejemplo describe la producción de α -farneseno o β -farneseno en una cepa huésped de *Saccharomyces cerevisiae*.

La cepa EPY300 fue generada al remover el plásmido de expresión de la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* EPY224 (Ro et al (2006) Nature 440 940-943, publicación de patente PCT WO 2007/005604) al cultivar en un medio rico. Luego la cepa EPY300
5 fue transformada con los plásmidos de expresión pRS425-FSA o pR425-FSB, produciendo las cepas huésped Y166 e Y164, respectivamente.

Transformantes de célula huésped fueron seleccionados en medios definidos sintéticos, que contienen glucosa al 2% y
10 todos los aminoácidos excepto leucina (SM-glu). La cepa huésped EPY300 fue auxotrófica para la biosíntesis de leucina (leu2), pero el plásmido de expresión pRS425-FSA o pRS425-FSB restaura la prototrofia de leucina (LEU2). Colonias individuales fueron transferidas a frascos de cultivo que contienen 5 ml de SM-glu
15 líquido que carece de leucina. Los cultivos fueron incubados mediante agitación a 30°C hasta que el crecimiento llega a la fase estacionaria. Las células fueron almacenadas a -80°C en crio-frascos en 1 ml de alícuotas congeladas compuesta de 400 µL de glicerol al 50% y 600 µL de cultivo líquido.

20 Cultivos de siembra fueron establecidos al agregar una alícuota concentrada a un matraz de 125 ml que contiene 25 ml de SM-glu que carece de leucina y cultivo durante toda la noche. Los cultivos de siembra fueron usados para inocular a una OD₆₀₀ inicial de aproximadamente 0.05 matraces con
25 deflectores de 250 ml que contienen 40 ml de medio definido

sintético que carece de leucina, glucosa al 0.2% y galactosa al 1.8%. Los cultivos fueron incubados a 30°C sobre un agitador giratorio a 200 rpm. Debido a que la presencia de glucosa en el media impide la inducción del promotor de GalI mediante galactosa, la producción de farneseno no fue inducida hasta que las células usaron la glucosa en el medio y cambiaron a usar galactosa como su fuente de carbono principal. Los cultivos son recubiertos con 8 ml de oleato de metilo o miristato de isopropilo. Las muestras fueron tomadas una vez más cada 24 horas al transferir 2-10 ul de la capa de solvente orgánico a un frasco de vidrio limpio que contiene 500 ul de acetato de etilo que contiene una concentración conocida de beta- o trans-cariofileno como estándar interno. Además, alícuotas de 0.5 ml del caldo de cultivo entero fueron agregadas a frascos de vidrio que contienen 1 ml de acetato de etilo proyectado con trans-cariofileno como estándar interno. Las muestras de caldo de cultivo entero fueron extraídas en el acetato de etilo al someter a vórtice los frascos de vidrio durante 10 minutos, después de lo cual 600 ul de la extracción de acetato de etilo fue transferida a un frasco de vidrio limpio.

La cepa huésped Y166 produjo aproximadamente 9.8 mg/l de α -farneseno a 120 horas (promediada en 3 clones independientes) y tuvo una productividad específica máxima de aproximadamente 3 mg/l/OD₆₀₀ (1 clon representativo). La cepa huésped Y164 produjo aproximadamente 56 mg/l de β -farneseno a

120 horas (promediado en 3 clones independientes) y tuvo una productividad específica máxima de aproximadamente 20 mg/l/OD₆₀₀ (1 clon representativo).

5 Ejemplo 22

Este ejemplo describe la producción de γ -terpineno, α -pineno y terpinoleno en cepas huésped de *Escherichia coli*.

Cultivos de siembra para cepas huésped para producción de γ -terpineno (E. coli DH1-T1r [pMevT, pMevB-Gpps, pAM445]), α -pineno (E. coli DH1-T1r [pMevT, pMevB-Gpps, pAM443 ó pAM442]) o terpinoleno (E. coli DH1-T1r [pMevT, pMevB-Gpps, pAM444] fueron establecidos al agregar una alícuota concentrada de cada cepa a matraces de 125 ml separados que contienen 25 ml de M9-MOPS, glucosa al 2%, extracto de levadura al 0.5% y
15 antibióticos como se detalla en la Tabla 1 y al cultivar los cultivos durante toda la noche a la fase exponencial tardía.

Los cultivos de siembra fueron usados para inocular a una OD₆₀₀ inicial de aproximadamente 0.05, matraces de 250 ml que contienen 40 ml de M9-MOPS, glucosa al 2%, extracto de
20 levadura al 0.5% y antibióticos. Al tiempo de inoculación, los cultivos fueron también sobretendidos con 4 ml de hexadecano. Los cultivos fueron incubados a 30°C sobre un agitador giratorio a 200-250 rpm hasta que alcanzaron una OD₆₀₀ de aproximadamente 0.2, punto en el cual la producción del
25 compuesto de interés en las células huésped fue inducida al

agregar 40 μ l de IPTG 1 M. Las muestras fueron tomadas una vez por día durante 96 horas al transferir 200 μ l de la capa de hexadecano a un tubo de microfuga de 0.6 ml. Para el análisis, el sobretendido de hexadecano fue diluido 1:1 ó 1:10 con acetato de etilo proyectado con trans-cariofileno como estándar interno en un frasco GC de 1.8 ml. Además, alícuotas de 1 ml del cultivo fueron centrifugadas, las pelletillas celulares fueron resuspendidas en 250 μ l de agua estéril y las suspensiones celulares fueron transferidas a un frasco de vidrio que contiene 1 ml de acetato de etilo proyectado con trans-cariofileno como estándar interno. Las pelletillas celulares fueron extraídas en el acetato de etilo al someter a vórtice los frascos de vidrio durante 15 minutos, después de lo cualquier 500 μ l de la extracción de acetato de etilo fueron transferidos a un frasco de vidrio limpio.

Las muestras de hexadecano/acetato de etilo y las muestras de pelletillas celulares extraídas con acetato de etilo fueron analizadas en un cromatógrafo de gases Agilent 6890N equipado con un espectrómetro de masas (GC/MS) Agilent 5975 en modo de barrido pleno (50 - 500 m/z). Para hacer expeditos los tiempos de corrida, el programa de temperatura y la matriz de columna fue modificado para obtener óptima resolución de pico y el tiempo de corrida global más corto. Una muestra de 1 μ l fue dividida (una proporción entre 1:2 y 1:50 fue seleccionada en base a la concentración de la muestra) y luego separada usando

una columna de HP-5MS (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA) y gas portador de helio. El programa de temperatura para el análisis fue como sigue: retención a 75°C por 5 minutos, incremento de temperatura a 20°C/minuto a una temperatura de 115°C, incremento de temperatura a 60°C/minuto a una temperatura de 300°C y retención a 300°C durante 0.5 minutos. Los varios productos, γ -terpineno, α -pineno y terpinoleno fueron observados a 5.4, 4.1, 5.4 y 5.9 minutos respectivamente. Los títulos fueron calculados al comparar las áreas de pico generadas contra una curva de calibración cuantitativa de estándares purificados en acetato de etilo proyectado con trans-cariofileno.

Ejemplo 23

Este ejemplo describe la producción de linalool, limoneno, β -pineno, β -felandreno, careno o sabinina en cepas huésped de *Escherichia coli*.

Los cultivos de siembra son establecidos al agregar una alícuota concentrada de cada sepa a matraces de 125 ml separados que contienen 25 ml de M9-MOPS, extracto de levadura al 0.5%, glucosa al 2% y antibióticos como se detalla en la tabla 1 y al cultivar los cultivos durante toda la noche.

Los cultivos de siembra son usados para inocular a una OD₆₀₀ inicial de aproximadamente 0.05 matraces con deflectores de 250 ml que contienen 40 ml de M9-MOPS, extracto

de levadura al 2%, glucosa al 2% y antibióticos. Los cultivos son incubados a 30°C en un agitador giratorio a 250 rpm hasta que alcanzan un OD₆₀₀ de aproximadamente 0.2, punto en el cual se induce la producción del compuesto de interés en las células huésped al agregar 50 ul de IPTG 1 M al medio de cultivo. El compuesto de interés es separado del medio de cultivo por medio de extracción de solvente-solvente o mediante asentamiento y decantación si el título del compuesto de interés es lo suficientemente grande para saturar el medio y formar una segunda fase.

15

20

25

LISTADO DE SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1

Operón *MevT66*

GAATTCAAAGGAGGAAAAATAAAATGAAGAACTGTGTGATTGTTTCTGCGGTCCGCACGGCGATCGGC
AGCTTTAACGGCTCTTTAGCGAGCACCTCTGCAATCGATCTGGGTGCGACGGTCATTAAGGCCGCCATT
GAACGCGCCAAAATCGACAGCCAGCACGTTGATGAGGTGATCATGGGCAATGTGTTACAAGCCGGCC
TGGGTCAAAACCCAGCGCGTCAAGCACTGTAAAAATCTGGTCTGGCCGAGACCGTGTGTGGCTTCACC
5 GTCAATAAGGTTTTCGGCTCTGGCCTGAAGAGCGTGGCCCTGGCAGCACAAAGCGATTCAAGCCGGTCA
GGCACAAAGCATCGTTGCGGGTGGCATGGAGAACATGTCTCTGGCGCCGTACTTATTAGATGCCAAAG
CCCGCAGCGGTTATCGCCTGGGCGATGGTCAGGTGTACGACGTCATCTTACGCGATGGCTTAATGTGC
GCGACCCACGGTTACCACATGGGTATTACGGCCGAAAAACGTGGCGAAAGAATACGGCATTACGCGCG
AGATGCAGGATGAATTAGCACTGCACTCTCAGCGCAAAGCAGCAGCCGCGATCGAGTCTGGTGCCTTT
ACGGCGGAAATCGTGCCAGTTAACGTGGTCACGCGCAAGAAGACGTTTCGTTTTTCAGCCAGGACGAGTT
CCCGAAGGCAAAACAGCACCGCGGAGGCCTTAGGTGCCTTACGCCCAGCCTTTGACAAAGCGGGCACG
GTCACCGCCGGTAATGCGAGCGGCATCAATGATGGTGCAGCGGCACTGGTCATCATGGAAGAGAGCG
10 CCGCATTAGCAGCGGGTCTGACCCCATTAGCGCGCATTAAATCTTATGCCAGCGGCGGCGTCCACCA
GCCCTGATGGGCATGGGTCCGGTCCCAGCCACGAAAAAGCCCTGCAATTAGCGGGCCTGCAACTGGC
CGACATTGATCTGATCGAGGCGAACGAGGCGTTTGACGCGCAGTTTCTGGCGGTGGGTAAGAATCTGG
GCTTCGACAGCGAGAAAGTCAATGTGAACGGTGGCGCGATTGCGTTAGGCCATCCGATTGGTGCAAGC
GGCGCACGCATCTTAGTGACGTTACTGCACGCCATGCAGGCACGCGACAAGACCTTAGGCCTGGCGAC
CTTATGTATTGGTGGCGGTCAAGGTATCGCCATGGTGATCGAACGCCTGAACTGAAGATCTAGGAGGA
AAGCAAAATGAAACTGAGCACCAAGCTGTGCTGGTGTGGCATCAAGGGTGCCTGCGCCACAAAAAG
CAGCAACAGCTGCACAACACGAACCTGCAAATGACCGAGCTGAAAAAGCAGAAGACGGCCGAGCAA
AAGACCCGCCCCGAGAACGTTGGCATCAAGGGCATCCAGATTTATATCCCGACGCAGTGTGTCAACCA
ATCTGAGCTGGAGAAATTGATGGCGTCAGCCAGGGTAAGTACACCATCGGCCTGGGCCAGACCAAC
15 ATGAGCTTCGTGAACGACCGTGAGGACATCTATTCTATGAGCCTGACGGTGTCTGTCTAAGCTGATCAA
GAGCTACAACATCGACACGAATAAGATCGGTCTGTGGAGGTGGGTACGGAGACGCTGATTGACAAG
AGCAAAAGCGTGAAAGTCTGTCTTAATGCAGCTGTTCCGGCGAGAACACGGATGTGCGAGGGTATCGACAC
CCTGAACGCGTGTTACGGCGGCACCAACGCACTGTTCAATAGCCTGAACTGGATTGAGAGCAACGCCT
GGGATGGCCGCGATGCGATCGTCTGTGCGGCGATATCGCCATCTATGACAAGGGTGGCGCACGTCCG
ACCGGCGGTGCAGGCACCGTTGCGATGTGGATTGGCCCGGACGCACCAATTGTCTTCGATTCTGTCCG
CGCGTCTTACATGGAGCACGCCTACGACTTTTACAAGCCGGACTTCACGAGCGAATACCCGTACGTGG
ACGGCCACTTCTCTCTGACCTGCTATGTGAAGGCGCTGGACCAGGTTTATAAGTCTTATAGCAAAAAAG
GCGATTTCTAAGGGCCTGGTCAGCGACCCGGCAGGCAGCGACGCCCTGAACGTGCTGAAGTATTTTGA
20 CTACAACGTGTTCCATGTCCCGACCTGCAAATTAGTGACCAAATCTTATGGCCGCCTGTTATATAATGA
TTTCCGTGCCAACCCGAGCTGTTCCCGGAGGTTGACGCCGAGCTGGCGACGCGTGATTACGACGAGA
GCCTGACCGACAAGAACATCGAGAAGACCTTCGTCAACGTCGCGAAGCCGTTCCACAAAGAGCGTGT
GGCCCAAAGCCTGATCGTCCCACCAACACGGGCAACATGTATACCGCGTCTGTCTACGCGGCATTTCG
CGAGCCTGCTGAATTACGTGCGTTCTGACGACCTGCAGGGCAAGCGCGTTGGCCTGTTACGCTACGGT
AGCGGCTTAGCGGCCAGCCTGTATAGCTGCAAAATTGTGCGCGACGTCCAGCACATCATCAAGGAGCT

25

TGGTCACCTGGCAAAACGACGATCTTCTTAGGGGACAGACATTACAATGGTATATCCCTTGAAATATATA
 TAAAAAAAGGCGCCTTAGACCGCTCGGCCAAACAACCAATTACTTGTGAGAAATAGAGTATAATTAT
 CCTATAAATATAACGTTTTTTGAACACACATGAACAAGGAAGTACAGGACAATTGATTTTGAAGAGAAT
 GTGGATTTTGATGTAATTGTTGGGATTCATTTTTAATAAGGCAATAATATTAGGTATGTGGATATACT
 AGAAGTTCTCCTCGACCGTCGATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGC
 ATCAGGAAATTGTAAACGTTAATATTTTGTAAAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATTTTT
 TAACCAATAGGCCGAAATCGGCCAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGT
 GTTGTTCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAAC
 5 CGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGGAAGATCCGAGGCCTAGCTTTAACGAACGCAGAATTTTC
 GAGTTATTAACCTTAATAACGCTGAACCCGAACATAGAAATATCGAATGGGAAAAAAAACCTGCAT
 AAAGGCATTAAAAAGAGGAGCGAAATTTTTTTTTAATAAAAAATCTTAATAATCATTAAAAGATAAATAAT
 AGTCTATATATACGTATATAAATAAAAAATATTCAAAAAATAAAAAAACTATTATTTIAGCGTAAAG
 GATGGGGAAAGAGAAAAAGAAAAAAATTGATCTATCGATTTCATTCAATTCAAATTTATTTCTTTTCGG
 ATAAGAAAGCAACACCTGGCAATTCCTTACCTTCCAATAATTCCAAAGAAGCACCACCAGTAGAG
 ACATGGGAGACCCGGGCCATGGTTAGATAGACATAGGGTAACTAGCAATGATTTGATCAAATGCTTG
 TATTCATCTCCCATCTCGTAAATTTGTCTTTACCTGCATATTGGACCTCTAAAAATGGCAAGATAT
 10 ATAACAGCCATAAGTAAAGGTCTTGGGATATTCTTTGTTGTTAAATACTCTCTGTTTATGTCTTTCCAA
 ACGTCTCTCACTTCTTATAAATCAGTGTCTGAGCATATTCTTCGTTGACATTGTATTCCTTCATGTAAG
 ATTCTAAAGAGCTTGAACATATGTTTTCTCTCCTGTTCGCTTTATGAGTCATCAGGTCATTAAATCTCCT
 ACCCAGAATACCACTGTAACGGAATAAAGCGGGAGCAGATACAGCCCACTCAACTGATTCCTTAGTGA
 AAATATCGCTCATTCTAGATAACAGGTAGTTGTAGCAAGTTTGCAACCACCAAGTATAAATACTACG
 GGATCGTGCTCTTCAGTTGTGCGGTATGTGTCTTCATTAGCCCATTTTCGCTTCTACCATTAGATTCCTTA
 CGAATTCCTTAACGAACTCCTTCCCACAGTTGAATAAATCAGTTCTACCTTCTTTGGCCAGAACTCCT
 CCATTTCTGTGTAGGTATCCATGAATAATTTGTAAATAGGCTTCATGTATTCGGGCAACGTGTCTAAGC
 AGGTGATCGACCATCTTCCACGGCTTCAGTGAAAAATCTTTAACTCCTCGTAAGTTCCATATGCGTCAT
 ACGTGTCTCATCAATAAGTGTATCACAGCAACTGCCTTAGTGAAAAAACTCTAGCTCTTGAATACTGG
 15 GGTTCGTAACCAGAACCTAAACCCCAAAAAATAGCATCAACGATACGATCTCTCAGACATGGGGCATT
 TTCTTAATATCAAAATGCCTTCCACCACTTGATACGTGACTCAACTCTTCTTATGTAGGCTCTGCAAT
 AGATTGAACTCCAGTTTAGCTAACITTAGCAGAGTTTTATTATGGGAGTCTTGTGCTGATAGAAGGGT
 ATGTACTGGGCGGCCTCGATCCTTGGCAATCTCTTCCACAATGGTTGCTTTAAAGCTCTCTGGATTICA
 GTGAATAAAGCGGGTTTGTACTAAACGCGTCTTTGTGATAATCGATAGCCTTGATCTTGTGAATCCC
 AGGGCATCTTCAAGAATTATTTGCCCCGGAACCTCATGGACGTAGCCTCATATAATTCCAACAATCCT
 TCAACATCATTGCTAACGATTGTTTAAAAAGCACCATTCTTGTCTTTATAGTTATTAAACACATCACAC
 GTGACATAGTATCCTTGTTACGCATCAGCCTAAACCATAAGCTAGACCTGTGCGCCATTCCAATTATCA
 CCATAGGTCTCGTAAATACATTGCAATGCATGATCAATTTACGTTCAAAAATGATACGGAATACCTAA
 ACGTTGAATCTCGTCAATCAGCTTCAACAAATTTGCATGTTTCATAGGAATATCCAATGCTTCCTTTAA
 20 CAACTGTCTTACTTCCCTCTTTAGATCGTTTACTATTGTCTCCACACCTGTTCAACTTGTCTCTCATAA
 ATCAAAAATTGATCGCCCCAAATAGAAGGTGGGAAATTTGCAATTGGCCTTATAGGTTCCTCTTCAGTC
 AAGGCCATTGTTTTCTGCAGATCCGGGGTTTTTTCTCCTTGACGTTAAAGTATAGAGGTATATTAACAA
 TTTTTGTTGATACITTTTATACATTTGAATAAGAAGTAATACAAACCGAAAAATGTTGAAAGTATTAGT
 TAAAGTGGTTATGCAGTTTTTGCATTTATATCTGTTAATAGATCAAAAATCATCGCTTCGCTGATTA
 ATTACCCAGAAATAAGGCTAAAAAACTAATCGCATTATCATCCTATGGTTGTTAATTTGATTCTGTTCA

TTTGAAGGTTTGTGGGGCCAGGTTACTGCCAATTTTTCCTCTTCATAAUCATAAAAAGCTAGTATTGTAG
 AATCTTTATTGTTCCGAGCAGTGCGGCGCGAGGCACATCTGCGTTTCAGGAACGCGACCGGTGAAGAC
 GAGGACGCACGGAGGAGAGTCTTCTTCGGAGGGCTGTACCCGCTCGGCGGCTTCTAATCCGTAATA
 AGATCTGCTTTAATTTGGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGC
 GCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCAACACACCCGCCGCTTAATGCGCC
 GCTACAGGGCGCGTCGCGCCATTTCGCCATTGAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGG
 CCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGCGTATT
 5 GGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCA
 GCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAG
 CAAAAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTCATAGGCTCCG
 CCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAA
 AGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCTTCCGCTTACCGGA
 TACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTT
 CGGTGTAGGTGCTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTAGCCCGACCGCTGCGCC
 TTATCCGGTAAGTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCAC
 TGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACT
 10 ACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGA
 GTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAG
 ATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTG
 GAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTT
 TAAATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAA
 TGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTGCTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCC
 GTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGA
 CCCACGCTACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAAGT
 GGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTTCG
 CCAGTTAATAGTTTGGCGAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGT
 15 ATGGCTTCATTACGCTCCGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAA
 AGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCACTCATGGT
 TATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTGATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTA
 CTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGG
 ATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAGTGCTCATCATTGGAAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAA
 CTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCAACTGATCTTCA
 GCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGG
 AATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCA
 GGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTGGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCGCG
 20 GCACATTTCCCCGAAAAAGTGCCACCTGAACGAAGCATCTGTGCTTCATTTTGTAGAACAAAAATGCAA
 CGCGAGAGCGCTAATTTTCAAACAAAGAATCTGAGCTGCATTTTACAGAACAGAAATGCAACGCGA
 AAGCGCTATTTTACCAACGAAGAATCTGTGCTTCATTTTGTAAAACAAAAAATGCAACGCGAGAGCGC
 TAATTTTCAAACAAAGAATCTGAGCTGCATTTTACAGAACAGAAATGCAACGCGAGAGCGCTATTT
 TACCAACAAAGAATCTATACCTTTTTTTGTTCTACAAAAATGCATCCCGAGAGCGCTATTTTCTAAC
 AAAGCATCTTAGATTACTTTTTTCTCTTTGTGCGCTCTATAATGCAGTCTCTTGATAACTTTTTGCAC
 TGTAGGTCCGTTAAGGTTAGAAGAAGGCTACTTTGGTGTCTATTTCTCTTCCATAAAAAAAGCCTGAC

TCCACTTCCCGCGTTTACTGATTACTAGCGAAGCTGCGGGTGCATTTTTC AAGATAAAAGGCATCCCG
ATTATATTCTATACCGATGTGGATTGCGCATACTTTGTGAACAGAAAGTGATAGCGTTGATGATTCTTC
ATTGGTCAGAAAAATTATGAACGGTTTCTTCTATTTTGTCTCTATATACTACGTATAGGAAATGTTTACA
TTTTCGTATTGTTTTCGATTCACTCTATGAATAGTTCTTACTACAATTTTTTTGTCTAAAGAGTAATACT
AGAGATAAACATAAAAAATGTAGAGGTCGAGTTTAGATGCAAGTTCAAGGAGCGAAAGGTGGATGGG
TAGGTTATATAGGGATATAGCACAGAGATATATAGCAAAGAGATACTTTTGAGCAATGTTTGTGGAAG
CGGTATTCGCAATATTTIAGTAGCTCGTTACAGTCCGGTGCCTTTTIGGTTTTTGAAGTGCGTCTTCA
GAGCGCTTTTGGTTTTCAAAAGCGCTCTGAAGTTCTTACTTTCTAGAGAATAGGAACCTCGGAATAG
5 GAACTTCAAAGCGTTTCCGAAAACGAGCGCTTCCGAAAATGCAACGCGAGCTGCGCACATACAGCTCA
CTGTTACGTCGCACCTATATCTGCGTGTGCTGTATATATATACATGAGAAGAACGGCATAAGTGC
GTGTTTATGCTTAAATGCGTACTTATATGCGTCTATTTATGTAGGATGAAAGGTAGTCTAGTACCTCCT
GTGATATTATCCCATTCATGCGGGGTATCGTATGCTTCCCTCAGCACTACCCCTTAGCTGTTCTATATG
CTGCCACTCCTCAATTGGATTAGTCTCATCCITCAATGCTATCATTTCCCTTGATATTGGATCATACTAA
GAAACCATTAATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTC

SEQ ID NO: 54

sequence in pAM322

10 TCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGT
CTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTCCGG
GCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGACCATATCGACTACGTCGTAAGG
CCGTTTCTGACAGAGTAAAAATCTTGAGGGAACITTCACCATATGGGAAATGCTTCAAGAAGGTATT
GACTTAAACTCCATCAAATGGTCAGGTCAATTGAGTGTTTTTTATTTGTGTATTTTTTTTTTTAGAGA
AAATCCTCCAATATCAAATTAGGAATCGTAGTTTCATGATTTTCTGTTACACCTAACCTTTTGTGTGGTG
CCCTCCTCCTTGTCATATTAATGTAAAGTGCAATTCCTTTTCCCTATCACGTTGAGCCATTAGTATCA
ATTTGCTTACCTGTATTCTTTACTATCCTCCTTTTTCTCCTTCTTGATAAATGTATGTAGATTGCGTATA
TAGTTTCGTCTACCCTATGAACATATTCCATTTTGTAAATTCGTGTGCTTTCTATTATGAATTTCTATTAT
15 AAAGTTTATGTACAAATATCATAAAAAAAGAGAATCTTTTAAAGCAAGGATTTTCTTAACTTCTTCGGC
GACAGCATCACCGACTTCGGTGGTACTGTTGGAACCACTAAATCACCAGTTCTGATACCTGCATCCA
AAACCTTTTTAACTGCATCTTCAATGGCCTTACCTTCTTCAGGCAAGTTCAATGACAATTTCAACATCA
TTGCAGCAGACAAGATAGTGGCGATAGGGTCAACCTTATTCTTTGGCAAATCTGGAGCAGAACCGTGG
CATGGTTCGTACAAACCAAATGCGGTGTTCTTGTCTGGCAAAGAGGCCAAGGACGCAGATGGCAACA
AACCCAAGGAACCTGGGATAACGGAGGCTTCATCGGAGATGATATCACCAAACATGTTGCTGGTGATT
ATAATACCATTTAGGTGGGTGGGTTCTTAACTAGGATCATGGCGGCAGAATCAATCAATTGATGTTG
AACCTTCAATGTAGGGAAITCGTTCTTGATGGTTTCCTCCACAGTTTTTCTCCATAATCTTGAAGAGGC
CAAAAGATTAGCTTTATCCAAGGACCAAATAGGCAATGGTGGCTCATGTTGTAGGGCCATGAAAGCGG
20 CCATTCTTGTGATTCTTTGCACTTCTGGAACGGTGTATTGTTCACTATCCCAAGCGACACCATCACCAT
CGTCITCCTTTCTCTTACCAAAGTAAATACCTCCCACTAATTCTCTGACAACAACGAAGTCAGTACCTT
TAGCAAATTTGTGGCTTGATTGGAGATAAGTCTAAAAGAGAGTCGGATGCAAAGTTACATGGTCTTAAG
TTGGCGTACAATTGAAGTTCTTTACGGATTTTATAGTAAACCTTGTTCAAGTCTAACACTACCGGTACCC
CATTTAGGACCAGCCACAGCACCTAACAAAACGGCATCAACCTTCTTGGAGGCTTCCAGCGCCTCATC
TGGAAGTGGGACACCTGTAGCATCGATAGCAGCACCACCAATTAAATGATTTTCGAAATCGAACTTGA
CATTGGAACGAACATCAGAAATAGCTTTAAGAACCTTAATGGCTTCGGCTGTGATTCTTGACCAACG

25

TGGTCACCTGGCAAAACGACGATCTTCTTAGGGGCAGACATTACAATGGTATATCTTGAAGATATATA
TAAAAAAAGGCGCCTTAGACCGCTCGGCCAAACAACCAATTACTTGTGAGAAATAGAGTATAATTAT
CCTATAAATATAACGTTTTTGAACACACATGAACAAGGAAGTACAGGACAATTGATTTTGAAGAGAAT
GTGGATTTTGATGTAATTGTTGGGATTCCATTTTAAATAAGGCAATAATATTAGGTATGTGGATATACT
AGAAGTTCTCCTCGACCGTCGATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGC
ATCAGGAAATTGTAAACGTTAATATTTTGTAAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTAAATCAGCTCATTTTT
TAACCAATAGGCCGAAATCGGCCAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGT
GTTGTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAGAAGCGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAAC
5 CGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGGAAGATCCGAGGCCTAGCTTTAACGAACGCAGAATTTTC
GAGTTATTAACCTTAAATACGCTGAACCCGAACATAGAAATATCGAATGGGAAAAAAACTGCAT
AAAGGCATTAAAGAGGAGCGAATTTTTTTTAAATAAAAAATCTTAATAATCATTAAGATAAATAAT
AGTCTATATACGTATATAAATAAAAAATATTCAAAAAATAAAATAAACTATTATTTAGCGTAAAG
GATGGGGAAAGAGAAAAAGAAAAAATTGATCTATCGATTTCAATTCAATTCAATTTATTCTTTTCGG
ATAAGAAAGCAACACCTGGCAATTCCTTACCTTCCAATAATTCCAAAGAAGCACCACCACAGTAGAG
ACATGGGAGACCCGGGCCATGGTTAGATAGACATAGGGTAAACTAGCAATGATTTGATCAAAATGCTTG
TATTCATCTCCCATCTCGTAAAAATTGTCTTACCTGCATATTGGACCTCTAAAAATTGGCAAAGATAT
ATAACAGCCATAAGTAAAGGTCTTGGGATATCTTTGTTGTTAAATACTCTCTGTTTATGTCTTTCCAA
10 ACGTCCTCCACTTCTTATAAATCAGTGTCTGAGCATAITCTTCGTTGACATTGTATTCTTCATGTAAG
ATTCTAAAGAGCTTGAACATATGTTTTCTCTCCTGTTCCGCTTTATGAGTCATCAGGTCAATTAATCTCCT
ACCCAGAATACCACTGTAAACGGAATAAAGGCGGAGCAGATACAGCCCACTCAACTGATTCTTAGTGA
AAATATCGCTCATTCTAGATAACAGGTAGTTGTTAGCAAGTTTGCACCACCAGTGATAATAACTACG
GGATCGTGCTCTTCAGTTGTGGTATGTGTCTTCATTAGCCCAATTCGCTTCTACCATTAGATTCTTA
CGAATTTCTTAACGAACCTCTCCACAGTTGAATAAATCAGTTCTACCTTCTTTGGCCAGAAACTCCT
CCATTTCTGTGTAGGTATCCATGAATAATTTGTAAATAGGCTTCATGTATTCGGGCAACGTGTCTAAGC
AGGTGATCGACCATCTTTCCACGGCTTCAGTGAAAAATCTTTAACTCCTCGTAAGTTCCATATGCGTCAT
ACGTGTCATCAATAAGTGTTATCACAGCAACTGCCTTAGTGAAAAAACTCTAGCTCTTGAATACTGG
15 GGTTCGTAACCAGAACCTAAACCCCAAAAAATAGCATTCAACGATACGATCTCTCAGACATGGGGCATT
TTTCTTAATATCAAAATGCCTTCCACCACTTGCATACGTGACTCAACTCTTCCTTATGTAGGCTCTGCAAT
AGATTGAACTCCAGTTTAGCTAACTTTAGCAGAGTTTTATTATGGGAGTCTTGTGCTGATAGAAGGGT
ATGTACTGGGCGCCTCGATCCTTGGCAATCTCTTCCACAATGGTTGCTTTAAAGCTCTCTGGATTTC
GTGAATAAAGCGGGGTTTGTACTAAACGCGTCCTTTGTATAATCGATAGCCTTGATCTTGTGAATCCC
AGGGCATCTTCAAGAAATTATTCGCCCCGGAACCTCATGGACGTAGCCTCATATAATTCCAACAATCCT
TCAACATCATTCGCTAACGATTGTTTAAAAAGCACCATTCTGTCTTTATAGTTATTAAACACATCACAC
GTGACATAGTATCCTTGTTTACGCATCAGCCTAAACCATAAGCTAGACCTGTGCGCAATTCGAATTATCA
CCATAGGTCTCGTAAATACATTGCAATGCATGATCAATTTACGTTCAAAATGATACGGAATACCTAA
20 ACGTTGAATCTCGTCAATCAGCTTCAACAAATTTGCATGTTTCATAGGAATATCCAATGCTTCCTTTAA
CAACTGTCTTACTTCTTTAGATCGTTTACTATTTGCTCCACACCCTGTTCAACTTGTTTTCTCATAA
ATCAAAAATTGATCGCCCCAAATAGAAGGTGGGAAATTTGCAATTGGCCTTATAGGTTTCTCTCAGTC
AAGGCCATTGTTTTCTGCAGATCCGGGGTTTTTCTCCTTGACGTTAAAGTATAGAGGTATATTAACAA
TTTTTGTGATACTTTTATTACATTTGAATAAGAAGTAATACAAACCGAAAATGTTGAAAGTATTAGT
TAAAGTGGTTATGCAGTTTTTGCAATTTATATCTGTTAATAGATCAAAAATCATCGCTTCGCTGATTA
ATTACCCAGAAAAAAGGCTAAAAAACTAATCGCATTATCATCCTATGGTTGTTAATTTGATTGCTTCA

TTTGAAGGTTTGTGGGGCCAGGTTACTGCCAATTTTTCCTCTTCATAACCATAAAAAGCTAGTATTGTAG
 AATCTTTIATTGTTTCGGAGCAGTGCGGCGCGAGGCACATCTGCGTTTCAGGAACCGGACCGGTGAAGAC
 GAGGACGCACGGAGGAGAGTCTTCCTTCGGAGGGCTGTACCCGCTCGGCGGCTTCTAATCCGTACTA
 AGATCTGCTTTAATTTGGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGC
 GCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCGCGCTTAATGCGCC
 GCTACAGGGCGCGTTCGCGCCATTGCGCCATTGAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGG
 CCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGAATTGGAGCGACCTCATGCTATACCTGAGAAAGCAACCTGACCTA
 CAGGAAAGAGTTACTCAAGAATAAGAATTTTCGTTTTAAAACCTAAGAGTCACTTTAAAAATITGTATA
 5 CACTTATTTTTTTATAACTTATTTAATAATAAAAAATCATAAATCATAAGAAATTCGCTTATTTAGAAG
 TGCAACAACGTATCTACCAACGATTGACCCTTTTCCATCTTTTCGTAAATTTCTGGCAAGGTAGACA
 AGCCGACAACCTTGATTGGAGACTTGACCAAACCTCTGGCGAAGAATTGTTAATTAAGAGTCAGTCGA
 CTTAAAACTAGGGACCAATAGCAATTCGTGTTTACGTTGCATTGTTGCACCTGAACCTTCCGTCATGT
 CAATITGATCATATGAAACTCCATTGGGCAACTTCCAGTTGAAATGATAAAGAATGTTGGCTAGTGGC
 AGTTGAACATTGGCCAAACCTAACGCAGCGCCAGGACACATACGACGTCCAGCCCCAAATGGTAAAT
 ATTCATATTCGGCGCCCATCACTGTTGCCGAAGAGTTTTCAAATCTTTCAGGTATAAACGCTTCTGCAT
 CCTTCCAGTATTGAGGATCTCTATTGATCGCAAACACATTAAACGATTAATTTGTTTTGTTAGGGATAT
 10 TATAACCAGCCAAGTTTACTGGCTGACGACATTCTCTAGGTAGCACTAACGGCAAGGGTGGGTGTAGT
 CTAAGAGTCTCTTTGATGACCATATTCAAGTAGGACAATTCTTGTATATCTTCTTCATGTATTTTTCTT
 TCCCATTCAAGGCCTTACGTAATTCAGCCTGAACCTTTTCCATTGCTTTCGGACATTATTATTAGCTCGCT
 TATAGCCCATTTCTATGGTAGAACTTGAAGTGTGCGTCCCTGCACCGAACATGTCCAAAATTATTGCTTT
 GATATTATCCGAAGTCAGAGGAAACTCAGCAGAATCCTTTAATCTAAGTAATACATCTAATAGGGTTT
 CGTTGGTTTTGGATGACGTATTTACGGTATGTTTCAGTACCAAATTGTCAATTAAGTTATCAATCTTTTT
 ACGTAGGGCTAGTTAATCTTGCTCTCTTACCGCTCAAGTGATGCAAGAACTTTTTAGATGGGAAAATATC
 GGCAACATCGAAACCGCCTGTTTGTCTCAGTATTTCTTTAAACAATTCAGTAAGTTCCTTTTGATCTITA
 ATTCCCTTACCAAACGCAGCACGGGATAGTATAGTGGAATTAGTTTAAAAACGTTTTCACTTAAATTT
 15 ACTGGTCTACCACTACCTGAAGCCTTTATTTCTGGACTAAATTCCAACATTCTTCTTCCCTCAACGATT
 GAAATGACTTAACTTTTTTACAGACAACAATTCAAGAGTACAAATCTTCTTAATTTGCTCCAGTATT
 CCCCATATGGAGCAAGGACAACATCAGTGTTATGATATAAAACTATTTCCCCAGTTAAAGTTTCGGGT
 CTATTAGCGAAAGTAATATCGTAGGTTGTAAGAATTTTCTTAGCCCACTTAGGACTCGACACGACTATT
 GTGGGTACCTCTCCCAATTGAAGGTGCATTAGCGAACCATATTTTCTCGCTAAATCCCTTACACCCCTG
 TGTGGTGTGGTTCCGATCAAATGGTGCATGTGACCAATGATGGGTAGCCTCCAAGGTTCCGGCAAGGA
 CTTTTTAGTTGACTTACTTCTAGTGGCAAATTTGTACACGAACAACAAAATAGTTGCTAAAGCAATTGA
 TGTAGTTAAAGATAGTGCCATAGCCTTTAAAAATTGACTTCATTGTTTTCTTAGGCCCTTAGTGAGGGTT
 GAATTCGAATTTTCAAAAATTCTTACTTTTTTTTTGGATGGACGCAAAGAAGTTTAATAATCATATTAC
 ATGGCATTACCACCATATACATATCCATATACATATCCATATCTAATCTTACTTATATGTTGTGGAAAT
 20 GTAAAGAGCCCCATTATCTTAGCCTAAAAAAACCTTCTCTTIGGAACTTTCAGTAATACGCTTAACTGC
 TCAITGCTATATTGAAGTACGGATTAGAAGCCGCGAGCGGGTGACAGCCCTCCGAAGGAAGACTCTC
 CTCGGTGCCTCCTCGTCTTACCGGTGCGGTTCTGAAACGCAGATGTGCCTCGCGCCGCACTGCTCCG
 AACAATAAAGATTCTACAATACTAGCTTTTATGGTTATGAAGAGGAAAAATTGGCAGTAACCTGGCCC
 CACAAACCTTCAAATGAACGAATCAAATTAACAACCATAGGATGATAATGCGATTAGTTTTTTAGCCT
 TATTTCTGGGGTAATTAATCAGCGAAGCGATGATTTTTGATCTATTAACAGATATATAAATGCAAAAA
 CTGCATAACCACTTAACTAATACTTTCAACATTTCGGTTTGTATTACTTCTTATTCAAATGTAATAAA

AGTATCAACAAAAAATTGTTAATATAACCTCTATACTTTAACTGCAAGGAGAAAAAACCCTCAAGCTTCC
CGGGAAAAACAATGCAATCGACAACCTCCGTTAACTATCACCTTTTCGATCTTATGACTGCCTTGTAAAA
TGGTAAAGTTAGTTTCGACACGTCCAATACTTCCGATACAAATATACCACTGGCGGTTTTTCATGGAAA
ACAGGGAATTGCTTATGATATTAACAACCAGTGTGGCCGTTTTAATTGGTTGTGTGGTTGTATTGGTAT
GGAGAAGATCATCAAGTGCCGCTAAGAAGGCCCGCAATCACCAGTCATTGTCGTCCCAAAGAAAGT
CACTGAAGATGAGGTTGATGACGGCAGAAAGAAAGTACTGTATTTTTCGGGACACAAACGGGGACT
GCGGAAGGTTTTGCGAAAGCTCTAGTTGAAGAAGCCAAGGCAAGGTACGAAAAAGCAGTATTCAAAG
TTATTGATTTAGATGACTACGCCGAGAAAGATGATGAATACGAAGAAAAGCTAAAGAAAGAATCTTTG
5 GCATTCTCTTTTTAGCTACCTATGGTGACGGAGAACCAACAGATAACGCCGCTAGATTCTATAAATGG
TTTACTGAAGGAGAAGAAAAAGGTGAGTGGTTAGATAAGTTACAATACGCTGTCTTTGGATTGGGAAA
TCGTCAATATGAACACTTCAATAAGATTGCAAAAGTGGTCGATGAAAAATTAGTTGAGCAGGGGGCTA
AAAGGTTAGTGCCTGTCGGTATGGGTGATGACGATCAATGTATCGAAGATGATTTTACTGCTTGGAAAG
GAATTGGTTTGGCCAGAATTAGATCAGCTATTGAGGGACGAAGATGACACAAGTGTGCTACTCCGTA
CACCGCCGCTGTTGGCGAATATCGTGTGTTTTTCACGATAAACCTGAAACTTACGATCAAGATCAATT
GACCAACGGACACGCAGTTCACGACGCCCCAACCCCATGCAGATCGAACGTTGCGGTCAAGAAAGAA
TTACACAGTCCCTTATCCGATAGGAGTTGTACTCATTTAGAATTTGATATTTCCAATACTGGACTATCG
10 TATGAAACTGGCGACCATGTGCGTGTATATGTGAAAAACCTGTCTGAAGTTGTAGATGAAGCCGAAAA
ATTGATTGGGCTTCCTCCACATACATACTTTTCTGTGCATACAGATAATGAAGATGGTACTCCACTTGG
CGGAGCCTCGTTACCACCTCCCTTTCCACCATGTACACTTAGAAAAAGCTCTTGCATCTTATGCAGATGT
ACTTTCTTACCAAAGAAAAAGTGCAATTACTAGCTCTAGCCGCCCATGCTACCGACTCTACTGAAGCTGA
CCGTTTGAAATCTTTGCTTCACTGCTGGCAAAGACGAGTACGCACAGTGGATTGTGGCATCTCACAG
ATCATTGCTGGAAGTGATGGAAGCCTTCCCATCGGCAAAGCCACCATTAGGCGTGTTTTTCGCATCTGT
TGCCCCACGTTTACAGCCTAGATACTATTCCATATCTTCTAGCCCCAAATTTGCCCCCAATCGTATTCA
TGTGACGTGTGCGCTGGTGTATGAACAACTCCATCAGGAAGGGTACATAAAGGTGTCTGTAGTACAT
GGATGAAAAACGCGGTGCCAATGACTGAATCTCAAGATTGTTGCTGGGCACCAATTTATGTTGCTACT
15 TCTAATTTTAGACTACCTAGTGACCCTAAAGTACCAGTGATTATGATCGGGCCTGGGACAGGACTAGC
GCCATTGAGAGGTTTCTTACAAGAAAGATTGGCCCCAAAGGAAGCAGGTACGGAATTAGGAACCGCA
ATTCTATTCTTTGGTTGTCGTAATAGAAAAGTTGACTTTATATACGAAGATGAGTTAAACAACCTTCGTT
GAAACTGGAGCGTTATCAGAATTAGTGACAGCATTTCTAGGGAAGGTGCAACAAAAGAATACGTCC
AACATAAAATGACCCAAAAGGCCAGCGATATATGGAATTTGCTGTCCGAGGGTGCCTATTTGTACGTT
TGTGGTGATGCAAAGGGAATGGCTAAAGATGTTACAGGACATTGCATACAATTGTTTCAGGAACAAG
GTTCTTGGATTCTCTAAGGCAGAACTTTATGTTAAAAACCTTCAGATGGCTGGTAGATATTTGCGTG
ATGTTTGGTGAGCTAGCTAAGATCCGCTCTAACCGAAAAGGAAGGAGTTAGACAACCTGAAGTCTAGG
TCCCTATTTATTTTATAGTTATGTTAGTATTAAGAACGTTATTTATATTTCAAATTTTCTTTTTTTT
20 CTGTACAGACGCGTGTACGCATGTAACATTATACTGAAAACCTTGCTTGAGAAAGGTTTTGGGACGCTC
GAAGATCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGAGAGGCGGTTTTCGTTATTGGGCGCTCTT
CCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTCGCTCGGTCGTTCCGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAA
AGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCA
GCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCCGCTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACG
AGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGC
GTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGC
CTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGT

CGTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCAAGAACCCCCCGTTACGCCCCGACCCGCTGCGCTTATCCGGTAA
CTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGA
TTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACT
AGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTC
TTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCA
GAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAAAC
TCACGTAAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAA
TGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGT
5 GAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATA
ACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACC
GGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAAGTGGTCCTGCAACT
TTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGT
TTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTC
AGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTC
CTTCGGTCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACT
GCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTC
ATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGCGTCAATACGGGATAATACCGCGC
10 CACATAGCAGAACTTTAAAAGTGTCTCATCTTGAAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATC
TTACCCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACT
TTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGA
CACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATIGTCT
CATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCC
GAAAAGTGCCACCTGAACGAAGCATCTGTGCTTCATTTTGTAGAACAAAAATGCAACGCGAGAGCGCT
AATTTTTCAACAAAGAATCTGAGCTGCATTTTACAGAACAGAAATGCAACGCGAAAGCGCTATTTT
ACCAACGAAGAATCTGTGCTTCATTTTGTAAAAACAAAAATGCAACGCGAGAGCGCTAATTTTTCAA
CAAAGAATCTGAGCTGCATTTTACAGAACAGAAATGCAACGCGAGAGCGCTATTTTACCAACAAAGA
15 ATCTATACTTCTTTTTTGTCTACAAAAATGCATCCCGAGAGCGCTATTTTCTAACAAAGCATCTTAG
ATTACTTTTTTCTCCTTTGTGCGCTCTATAATGCAGTCTCTTGATAACTTTTTGCACTGTAGGTCCGTTA
AGGTTAGAAGAAGGCTACTTTGGTGTCTATTTTCTCTCCATAAAAAAGCCTGACTCCACTTCCCGCG
TTTACTGATTACTAGCGAAGCTGCGGGTGCATTTTTTCAAGATAAAGGCATCCCCGATTATATTCTATA
CCGATGTGGATTGCGCATACTTTGTGAACAGAAAGTGATAGCGTTGATGATTCTTCATTGGTCAGAAA
ATTATGAACGGTTTCTTCTATTTTGTCTCTATATACTACGTATAGGAAATGTTTACATTTTCGTATTGTT
TTCGATTCACCTATGAATAGTTCCTTACTACAATTTTTTGTCTAAAGAGTAATACTAGAGATAAACAT
AAAAAATGTAGAGGTCGAGTTTATGATGCAAGTTCAAGGAGCGAAAGGTGGATGGGTAGGTTATATAG
GGATATAGCACAGAGATATATAGCAAAGAGATACTTTTGAGCAATGTTTGTGGAAGCGGTATTTCGAA
20 TATTTTAGTAGCTCGTTACAGTCCGGTGCGTTTTTGGTTTTTTGAAAAGTGGCTCTTCAGAGCGCTTTTGG
TTTTCAAAAGCGCTCTGAAGTTCTTACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTTCAAAG
CGTTTCCGAAAACGAGCGCTTCCGAAAATGCAACGCGAGCTGCGCACATACAGCTCACTGTTACGTC
GCACCTATATCTGCGTGTGCTGTATATATATATACATGAGAAAGAACGGCATAGTGCGTGTATATGCT
TAAATGCGTACTTATATGCGTCTATTTATGTAGGATGAAAGGTAGTCTAGTACCTCCTGTGATATTATC
CCATTCCATGCGGGGTATCGTATGCTTCCTTCAGCACTACCCTTTAGCTGTCTATATGCTGCCACTCCT
CAATTGGATTAGTCTCATCCTCAATGCTATCATTTCCCTTTGATATTGGATCATACAAAGAAACCATTAT
TATCATGACATTAACTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTC

5 GGACATCACCAACAAGCTGGUGAAGUGCATCACCGAGACGCGGAAAAGATTACGAGGCAGCGATCGAG
TTACGCGAGAATGCGCATCTGAAGAAGAACTTCAAGCCGCAAGGTAGCATCGAGCACCTGCAGAGCG
GCGTCTACTACCTGACGAACATTGACGACAAGTTCCGCCGTTCTTATGACGTCAAAAAGTAACTAGTA
GGAGGAAAAACATCATGGTGCTGACGAACAAAACCGTCATTAGCGGCAGCAAGGTGAAGTCTCTGAGC
AGCGCCCAAAGCTCTAGCAGCGGCCCGTCTAGCAGCAGCGAGGAGGACGACAGCCGTGACATTGAGT
CTCTGGACAAGAAGATCCGCCCGCTGGAGGAGTTAGAGGCCCTGCTGAGCAGCGGCAACACCAAGCA
GCTGAAGAACAAGGAAGTTGCAGCGCTGGTGATCCACGGTAAGCTGCCACTGTATGCGCTGGAAAAG
AAACTGGGCGATACGACGCGTGCGGTGCGGTGCGTCGCAAAAGCCTTAAGCATCTTAGCGGAGGCCCC
GGTGTTAGCCAGCGACCGCCTGCCGTACAAGAACTACGACTACGACCGCGTGTGTTGGCGCGTGCTGCG
10 AGAATGTCATTGGCTACATGCCGTTACCGGTTGGTGTGATCGGCCCGCTGGTCATTGATGGCACGAGC
TATCACATTCCAATGGCGACCACGGAAGGTTGCTTAGTCGCCAGCGCCATGCGTGGCTGTAAGGCGAT
TAACGCCGGCGGTGGCGCGACGACCGTGTTAACCAAGGATGGTATGACGCGCGGTCCGGTCTGCCGCT
TCCCAACGCTGAAGCGCAGCGGCGCGTGTAAGATTTGGCTGGATTCTGAGGAGGGCCAAAACGCGAT
CAAGAAAGCCTTCAACTCTACGAGCCGTTTCGCGCGTTTACAGCATATCCAGACCTGCCTGGCCGGCG
ACCTGCTGTTTCATGCGCTTCCGCACCACCACGGGCGATGCGATGGGCATGAACATGATCAGCAAGGGC
GTCGAATATAGCCTGAAACAAATGGTGGAAGAATATGGCTGGGAGGACATGGAGGTTGTCTCTGTGA
GCGGCAACTATTGCACCGACAAGAAGCCGGCAGCCATTAAGTGGATTGAGGGTCGCGGCAAAAAGCGT
CGTGGCAGAAGCGACCATCCAGGCGACGTGGTCCGTAAGGTTCTGAAGAGCGACGTCAGCGCCCTG
15 GTTGAGTTAAATATCGCGAAAAACCTGGTCGGCAGCGCGATGGCGGGCAGCGTGGGTGGCTTTAACGC
ACATGCAGCGAATCTGTTACGGCGGTTTCTTAGCCTTAGGTGAGGACCCAGCCAAAAATGTCGAGA
GCAGCAACTGCATTACCTTAATGAAAGAGGTTGACGGTGACCTGCGCATCAGCGTTTCTATGCCGTCT
ATCGAGGTGCGCACGATCGGCGGCGGCACCGTTTATAGAACCAGCAAGGTGCGATGCTGGATCTGCTGGG
CGTGCGCGGGCCACATGCAACGGCCCCAGGCACCAATGCCCGCCAAGTGGCCCGTATCGTGGCCTGCG
CGGTTCTGGCGGGTGAGCTGAGCCTGTGCGCCGATTAGCCGCGGGCCATTTAGTTCAATCTCACATG
ACCCACAACCGCAAGCCGGCAGAACCAACCAAGCCAAATAACCTGGACGCAACCGACATTAACCGTC
TGAAGGATGGCAGCGTCACGTGCATTAAAAGCTGAGCATGCTACTAAGCTT

15 **SEQ ID NO: 2**
Cebador 4-49 mvaA SpeI
5'-GCTACTAGTAGGAGGAAAACATCATGCAAAGTTTAGATAAGAATTTCCG-3'

SEQ ID NO: 3
Cebador 4-49 mvaAR XbaI
5'-GCTTCTAGACTATTGTTGTCTAATTTCTTGTAATAATGCG-3'

20 **SEQ ID NO: 4**
Cebador HMGS 5' Sa mvaS-S
5'-GAACTGAAGATCTAGGAGGAAAAGCAAAATGACAATAGGTATCGACAAAATAAACT-3'

SEQ ID NO: 5
Cebador HMGS 3' Sa mvaS-AS
5'-TTGCATGATGTTTTCTCCTACTAGTTACTCTGGTCTGTGATATTCGCGAAC-3'

SEQ ID NO: 6

Cebador 19-25 atoB SfiI-S

5'-GCTAGGCCATCCTGGCCATGAAGAACTGTGTGATTGTTTCTG-3'

SEQ ID NO: 7

Cebador 19-25 mvaA-AsiSI-AS

5'-GCTTGCGATCGCCGGCGGATTTGTCCTACTCAG-3'

5

SEQ ID NO: 8

Cebador 9-70C

5'-CCACCTCGAGATGTCATTACCGTTCTTAACTTCTG-3'

SEQ ID NO: 9

Cebador 26-39B

5'-TGGTGGAGCTCTTATTTAAGCTGGGTAAATGCAGATAATCG-3'

SEQ ID NO: 10

Cebador 26-39A

10

5'-TTCTTGAGCTCTTATTCCTTTGGTAGACCAGTCTTTGCG-3'

SEQ ID NO: 11

Cebadores 4-40 mvaEF BamHI

5' – TATGGATCCTAAGGAGGATATTTAGATGAAAACAGTAGTTATTATTGATGC – 3'

SEQ ID NO: 12

Cebador 4-40 mvaER HindIII

15

5'- AGCTAAGCTTTTATTGTTTTCTTAAATCATTTAAAATAGC – 3'

SEQ ID NO: 13

Cebador 4-40 mvaSF BglII

5' – TATAGATCTTAAGGAGGATATTTAGATGACAATTGGGATTGATAAAATTAG – 3'

SEQ ID NO: 14

Cebador 4-39 mvaSR BamHI

5' – TTTGGATCCTTAGTTTCGATAAGAGCGAACGG – 3'

20

SEQ ID NO: 15

Cebador 67-1A-C for PCR amplification of the coding sequence of the dxs gene

5'- ACA CTC GAG GAG GAA TAA ATG AGT TTT GAT ATT GCC AAA TAC CCG -3'

SEQ ID NO: 16

25

Cebador 67-1B-C para amplificación PCR de la codificación de secuencia del gen dxs
5'- TGA TGG TAC CTT ATG CCA GCC AGG CCT TGA TTT TGG C -3'

SEQ ID NO: 17

Cebador 67-1C-C para amplificación PCR de la codificación de secuencia del gen dxr
5'- ACT AGG TAC CAG GAG GAA TAA ATG AAG CAA CTC ACC ATT CTG GGC -3'

SEQ ID NO: 18

5 Cebador 67-1D-C para amplificación PCR de la codificación de secuencia del gen dxr
5'- AAT TGA TGG GCC CTC AGC TTG CGA GAC GCA TCA CCT C -3'

SEQ ID NO: 19

Cebador 67-1E-C para amplificación PCR de la codificación de secuencia del gen ispD
5'- CAT AAA GGG CCC AGG AGG AAT AAA TGG CAA CCA CTC ATT TGG ATG -3'

SEQ ID NO: 20

10 Cebador 67-1F-C para amplificación PCR de la codificación de secuencia del gen ispD
5'- TAT TGT TCA TAT GTT ATG TAT TCT CCT GAT GGA TGG TTC G -3'

SEQ ID NO: 21

Cebador 67-1G-C para amplificación PCR de la codificación de secuencia del gen ispE
5'- AAC TAA CAC ATA TGA GGA GGA ATA AAT GCG GAC ACA GTG GCC CTC -3'

SEQ ID NO: 22

15 Cebador 67-1H-C para amplificación PCR de la codificación de secuencia del gen ispE
5'- TGT TAG TTA CGC GTT TAA AGC ATG GCT CTG TGC AAT GG -3'

SEQ ID NO: 23

Cebador 67-2A-C para amplificación PCR de la codificación de secuencia del gen ispF
5'- ACG GGA TCC AGG AGG AAT AAA TGC GAA TTG GAC ACG GTT TTG ACG -3'

SEQ ID NO: 24

20 Cebador 67-2B-C para amplificación PCR de la codificación de secuencia del gen ispF
5'- TTT AGT TGG GCC CTC ATT TTG TTG CCT TAA TGA GTA GCG CC -3'

SEQ ID NO: 25

Cebador 67-2C-C para amplificación PCR de la codificación de secuencia del gen ispG
5'- TAC TAA GGG CCC AGG AGG AAA TAA TGC ATA ACC AGG CTC CAA TTC AAC G -3'

SEQ ID NO: 26

25 Cebador 67-2D-C para amplificación PCR de la codificación de secuencia del gen ispG
5'- TCC GGG TAC CTT ATT TTT CAA CCT GCT GAA CGT CAA TTC G -3'

SEQ ID NO: 27Cebador 67-2E-C para amplificación de PCR de la secuencia de codificación del gen *ispH*

5'- AAC AGG TAC CAG GAG GAA ATA ATG CAG ATC CTG TTG GCC AAC C -3'

SEQ ID NO: 28Cebador 67-2F-C para amplificación de PCR de la secuencia de codificación del gen *ispH*

5'- TGG ATG AAG TCG ACT TAA TCG ACT TCA CGA ATA TCG ACA CGC AGC -3'

5

SEQ ID NO: 29Cebador 67-2G-C para amplificación de PCR de la secuencia de codificación del gen *idi*

5'- CAT CAA GTC GAC AGG AGG AAA TAA TGC AAA CGG AAC ACG TCA TTT TAT TG -3'

SEQ ID NO: 30Cebador 67-2H-C para amplificación de PCR de la secuencia de codificación del gen *idi*

5'- TAA TGC AAG CTT ATT TAA GCT GGG TAA ATG CAG ATA ATC G -3'

10

SEQ ID NO: 31Cebador 67-2I-C para amplificación de PCR de la secuencia de codificación del gen *ispA*

5'- CAG TAA AGC TTA GGA GGA AAT AAT GGA CTT TCC GCA GCA ACT CG -3'

SEQ ID NO: 32Cebador 67-2J-C para amplificación de PCR de la secuencia de codificación del gen *ispA*

5'- TAG TTC CAT GGT TAT TTA TTA CGC TGG ATG ATG TAG TCC GC -3'

SEQ ID NO: 33

15

Cebador 9-156A para amplificación de PCR del locus *RK2 par*

5'- ACATAGACGTCGGGAAAGCGAGGATCTAGGTAGGG -3'

SEQ ID NO: 34Cebador 9-156B para amplificación de PCR del locus *RK2 par*

5'- TTCCCGCTCGAGGTGGCGGACCATATAGGCAGATCAG -3'

SEQ ID NO: 35

20

Cebador 19-137 *cml-pAM37-AS*

5' – GACGTCGATATCTGGCGAAAATG – 3'

SEQ ID NO: 36Cebador 19-137 *cml-pAM37-S*

5' – TACTAGTGCTTGGATTCTCACC – 3'

25

SEQ ID NO: 37

Cebador de amplificación PCR de una secuencia de nucleótidos que codifica para un beta-farneseno sintasa
5'-CCATGGACACTCTGCCGATCTCTCCGTAAGC-3'

SEQ ID NO: 38

Cebador de amplificación PCR de una secuencia de nucleótidos que codifica para un beta-farneseno sintasa
5'-GAGCTCTCATACGACCATAGGGTGTACG-3'

5

SEQ ID NO: 39

Cebador de amplificación PCR de una secuencia de nucleótidos que codifica para un α-farneseno sintasa
5'-CCATGGACCTGGCAGTAGAAATTGC-3'

SEQ ID NO: 40

Cebador de amplificación PCR de una secuencia de nucleótidos que codifica para un α-farneseno sintasa
5'-GAGCTCTTACATCGGTACCGGCTCCAG-3'

10

SEQ ID NO: 41

operón *atoB*(opt):*HMGS*(opt):*mvaA*

15

20

25

ATGAAGAACTGTGTGATTGTTTCTGCGGTCCGCACGGCGATCGGCAGCTTTAACGGCTCTTTAGCGAG
CACCTCTGCAATCGATCTGGGTGCGACGGTCATTAAGGCCGCCATTGAACGCGCCAAAATCGACAGCC
AGCACGTTGATGAGGTGATCATGGGCAATGTGTTACAAGCCGGCCTGGGTCAAACCCAGCGCGTCAA
GCACTGTTAAAATCTGGTCTGGCCGAGACCGTGTGTGGCTTCACCGTCAATAAGGTTTTCGGGCTCTGGC
CTGAAGAGCGTGGCCCTGGCAGCACAAGCGATTCAAGCCGGTCAGGCACAAAGCATCGTTGCGGGTG
GCATGGAGAACATGTCTCTGGCGCCGTACTTATTAGATGCCAAAGCCCGCAGCGGTTATCGCCTGGGC
GATGGTCAGGTGTACGACGTCATCTTACGCGATGGCTTAATGTGCGCGACCCACGGTTACCACATGGG
TATTACGGCCGAAAACGTGGCGAAAGAATACGGCATTACGCGCGAGATGCAGGATGAATTAGCACTG
CACTCTCAGCGCAAAGCAGCAGCCGCGATCGAGTCTGGTGCCTTACGGCGGAAAATCGTGCCAGTTAA
CGTGGTCACGCGCAAGAAGACGTTCTGTTTTCAGCCAGGACGAGTTCCCGAAGGCAACAGCACCCGG
GAGGCCTTAGGTGCCTTACGCCCAGCCTTTGACAAAGCGGGCACGGTCACCGCCGGTAATGCGAGCGG
CATCAATGATGGTGCAGCGGCACTGGTCATCATGGAAGAGAGCGCCGCATTAGCAGCGGGTCTGACCC
CATTAGCGCGCATTAAATCTTATGCCAGCGGGCGGTCCCAACAGCCCTGATGGGCATGGGTCCGGTC
CCAGCCACGCAAAAAGCCCTGCAATTAGCGGGCCTGCAACTGGCCGACATTGATCTGATCGAGGCGA
ACGAGGCGTTTGCAGCGCAGTTCCTGGCGGTGGGTAAGAATCTGGGCTTCGACAGCGAGAAAAGTCAAT
GTGAACGGTGGCGCGATTGCGTTAGGCCATCCGATTGGTGCAAGCGGCGCACGCATCTTAGTGACGTT
ACTGCACGCCATGCAGGCACGCGACAAGACCTTAGGCCTGGCGACCTTATGTATTGGTGGCGGTCAAG
GTATCGCCATGGTGATCGAACGCCTGAACTGAAGATCTAGGAGGAAAGCAAAATGAAACTGAGCACC
AAGCTGTGCTGGTGTGGCATCAAGGGTCGCCTGCGCCACAAAAGCAGCAACAGCTGCACAACACGA
ACCTGCAAAATGACCGAGCTGAAAAGCAGAAGACGGCCGAGCAAAAGACCCGCCCGCAGAACGTTGG
CATCAAGGGCATCCAGATTTATATCCCGACGCAAGTGTGTCAACCAATCTGAGCTGGAGAAATTCGATG
GCGTCAGCCAGGGTAAGTACACCATCGGCCTGGGCCAGACCAACATGAGCTTCGTGAACGACCGTGA
GGACATCTATTCTATGAGCCTGACGGTGTGTCTAAGCTGATCAAGAGCTACAACATCGACACGAATA
AGATCGGTGCTCTGGAGGTGGGTACGGAGACGCTGATTGACAAGAGCAAAAGCGTGAAGTCTGTCTT

5 AATGCAGCTGTTCCGGCGAGAACACGGATGTCGAGGGTATCGACACCCCTGAACCGCTGTTACGGCGGC
ACCAACGCACTGTTCAATAGCCTGAACTGGATTGAGAGCAACGCCTGGGATGGCCGCGATGCGATCGT
CGTGTGCGGCGATATCGCCATCTATGACAAGGGTGCGGCACGTCCGACCGGCGGTGCAGGCACCGTTG
CGATGTGGATTGGCCCGGACGCACCAATTGTCTTCGATTCTGTCCGCGCGTCTTACATGGAGCACGCCT
ACGACTTTTACAAGCCGGACTTCACGAGCGAATACCCGTACGTGGACGGCCACTTCTCTCTGACCTGCT
ATGTGAAGGCGCTGGACCAGGTTTATAAGTCTTATAGCAAAAAAGGCGATTTCTAAGGGCCTGGTCAGC
GACCCGGCAGGCAGCGACGCCCTGAACGTGCTGAAGTATTTGACTACAACGTGTTCCATGTCCCGAC
CTGCAAATTAGTGACCAAACTTTATGGCCGCTGTTATATAATGATTTCCGTGCCAACCCGAGCTGTT
10 CCGGAGGTTGACGCCGAGCTGGCGACGCGTGATTACGACGAGAGCCTGACCGACAAGAACATCGAG
AAGACCTTCGTCAACGTGCGGAAGCCGTTCCACAAAGAGCGTGTGCCCCAAAGCCTGATCGTCCCGAC
CAACACGGGCAACATGTATACCGCGTCTGTCTACGCGGCATTGCGGAGCCTGCTGAATTACGTCCGTT
CTGACGACCTGCAGGGCAAGCGCGTTGGCCTGTTCACTACGGTAGCGGCTTAGCGGCCAGCCTGTAT
AGCTGCAAAATTTGCGGCGACGTCCAGCACATCATCAAGGAGCTGGACATCACCACAAGCTGGCGA
AGCGCATCACCGAGACGCCGAAAGATTACGAGGCAGCGATCGAGTTACGCGAGAATGCGCATCTGAA
GAAGAATTTCAAGCCGCAAGGTAGCATCGAGCACCTGCAGAGCGGCGTCTACTACCTGACGAACATT
GACGACAAGTTCCGCCGTTCTTATGACGTCAAAAAAGTAACTAGTAGGAGGAAAAACATCATGCAAAGTT
TAGATAAGAATTTCCGACATTTATCTCGTCAACAAAAAGTTACAACAATTGGTAGATAAGCAATGGTTA
15 TCAGAAGATCAATTTCGACATTTTATTGAATCATCCATTAATTGATGAGGAAGTAGCAAAATAGTTTAATT
GAAAATGTCATCGCGCAAGGTGCATTACCCGTTGGATTATTACCGAATATCATTGTGGACGATAAGGC
ATATGTTGTACCTATGATGGTGGAAGAGCCTTCAGTTGTGCTGCAGCTAGTTATGGTGCAAAGCTAGT
GAATCAGACTGGCGGATTTAAAACGGTATCTTCTGAACGTATTATGATAGGTCAAATCGTCTTTGATG
GCGTTGACGATACTGAAAAATTATCAGCAGACATTAAGCTTTAGAAAAAGCAAAATTCATAAAATTGCG
GATGAGGCATATCCTTCTATTAAAGCGCGTGGTGGTGGTTACCAACGTATAGCTATTGATACATTTCTT
GAGCAACAGTTACTATCTTTAAAAGTATTTGTTGATACGAAAGATGCTATGGGCGCTAATATGCTTAAT
ACGATTTTAGAGGCCATAACTGCATTTTAAAAAATGAATCTCCACAAAGCGACATTTTAATGAGTATT
TTATCCAATCATGCAACAGCGTCCGTTGTTAAAGTTCAAGGCGAAATTGACGTAAAGATTTAGCAAG
20 GGGCGAGAGAACTGGAGAAGAGGTTGCCAAACGAATGGAACGTGCTTCTGTATTGGCACAAGTTGAT
ATTCATCGTGCTGCAACACATAATAAAGGTGTTATGAATGGCATAACATGCCGTTGTTTAGCAACAGG
AAATGATACGCGTGGTGCAAGCAAGTGCGCATGCATACGCGAGTCGTGACCGACAGTATCGTGGT
ATTGCAACATGGAGATACGATCAAAAACGTCAACGTTTAATTGGTACAATAGAAGTGCCTATGACATT
GGCAATCGTTGGCGGTGGTACAAAAGTATTACCAATTGCTAAAGCTTCTTTAGAATTGCTAAATGTAG
ATTCAGCACAAGAATTAGGTGATGTAGTTGCTGCCGTTGGTTTAGCACAGAACTTTGCAGCATGTCCG
GCGCTCGTTCCGAAGGTATCCAGCAAGGCCATATGAGCTTGCAATATAAATCTTTAGCTATTGTTGTA
GGTGCAAAAGGTGATGAAATTGCGCAAGTAGCTGAAGCATTGAAGCAAGAACCCCGTGCGAATACAC
AAGTAGCTGAACGCATTTTACAAGAAATTAGACAACAATAG

25

SEQ ID NO: 42
operon *atoB*(opt):*mvaS*(opt):*mvaA*
ATGAAGAACTGTGTGATTGTTCTGCGGTCCGCACGGCGATCGGCAGCTTTAACGGCTCTTTAGCGAG
CACCTCTGCAATCGATCTGGGTGCGACGGTCATTAAGGCCGCCATTGAACGCGCCAAAATCGACAGCC
AGCACGTTGATGAGGTGATCATGGGCAATGTGTTACAAGCCGGCCTGGGTCAAAACCCAGCGCGTCAA
GCACTGTTAAAATCTGGTCTGGCCGAGACCGTGTGTGGCTTACCCGTCAATAAGGTTTGCGGCTCTGGC

CTGAAGAGCGTGGCCCTGGCAGCACAAAGCGATTCAAGCCGGTCAGGCACAAAGCATCGTTGCGGGTG
 GCATGGAGAACATGTCTCTGGCGCCGTACTTATTAGATGCCAAAGCCCGCAGCGGTTATCGCCTGGGC
 GATGGTCAGGTGTACGACGTCATCTTACGCGATGGCTTAATGTGCGCGACCCACGGTTACCACATGGG
 TATTACGGCCGAAAAACGTGGCGAAAGAATACGGCATTACGCGCGAGATGCAGGATGAATTAGCACTG
 CACTCTCAGCGCAAAGCAGCAGCCGCGATCGAGTCTGGTGCCTTACGGCGGAAATCGTGCCAGTTAA
 CGTGGTCACGCGCAAGAAGACGTTCTGTTTTAGCCAGGACGAGTTCCCGAAGGCAAACAGCACCCGG
 GAGGCCCTTAGGTGCCTTACGCCCAGCCTTTGACAAAGCGGGCACGGTCACCGCCGGTAATGCGAGCGG
 CATCAATGATGGTGCAGCGGCACTGGTCATCATGGAAGAGAGCGCCGATTAGCAGCGGGTCTGACCC
 5 CATTAGCGCGCATTAATCTTATGCCAGCGCGGCGTCCACCAGCCCTGATGGGCATGGGTCCGGTC
 CCAGCCACGCAAAAAGCCCTGCAATTAGCGGGCCTGCAACTGGCCGACATTGATCTGATCGAGGCGA
 ACGAGGCCGTTTGCAGCGCAGTTCCTGGCGGTGGGTAAGAATCTGGGCTTCGACAGCGAGAAAAGTCAAT
 GTGAACGGTGGCGCGATTGCGTTAGGCCATCCGATTGGTGCAAGCGCGCGCACGCATCTTAGTGACGTT
 ACTGCACGCCATGCAGGCACGCGACAAGACCTTAGGCCTGGCGACCTTATGTATTGGTGGCGGTCAAG
 GTATCGCCATGGTGATCGAACGCTGAAGTCTAGGAGGAAAGCAAAATGACAATAGGTATC
 GACAAAATAAACTTTTACGTTCCAAAGTACTATGTAGACATGGCTAAATTAGCAGAAGCACGCCAAGT
 AGACCCAAAACAAATTTTTAATTGGAATTGGTCAAACCTGAAATGGCTGTTAGTCTGTAAACCAAGACA
 TCGTTTCAATGGGCGCTAACGCTGCTAAGGACATTATAACAGACGAAGATAAAAAGAAAATTGGTATG
 10 GTAATTGTGGCAACTGAATCAGCAGTTGATGCTGCTAAAAGCAGCCGCTGTTCAAATTCACAACTTATT
 AGGTATTCAACCTTTTGCACGTTGCTTTGAAATGAAAGAAGCTTGTTATGCTGCAACACCAGCAATTCA
 ATTAGCTAAAGATTATTTAGCAACTAGACCGAATGAAAAAGTATTAGTTATTGCTACAGATACAGCAC
 GTTATGGATTGAATTCAGGCGCGAGCCAACACAAGGTGCTGGCGCAGTTGCGATGGTTATTGCACAT
 AATCCAAGCATTTTGGCATTAAATGAAGATGCTGTTGCTTACACTGAAGACGTTTATGATTTCTGCGT
 CCAACTGGACATAAATATCCATTAGTTGATGGTGCAATTATCTAAAGATGCTTATATCCGCTCATTTCAA
 CAAAGCTGGAATGAATACGCAAAACGTCAAGGTAAAGTCGCTAGCTGACTTCGCATCTCTATGCTTCCA
 TGTTCATTTACAAAAATGGGTAAAAAGGCATTAGAGTCAATCATTGATAACGCTGATGAAACAACCTC
 AAGAGCGTTTACGTTTACAGGATATGAAGATGCTGTAGATTATAACCGTTATGTGCGTAATATTTTACTG
 15 GATCATTATATTTAAGCCTAATATCATTACTTGAAAATCGTGATTATCAAGCTGGTGAAACAATCGGTT
 TATTCAGTTATGGCTCAGGTTGAGTTGGTGAATTTTATAGTGCAGCATTAGTTGAAGGCTACAAAAGATC
 ATTTAGATCAAGCTGCACATAAAGCATTATTAATAACCGTACTGAAGTATCTGTTGATGCATATGAA
 ACATTCCTTCAAACGTTTTGATGACGTTGAATTTGACGAAGAACAAGATGCTGTTGATGAAGATCGTCAT
 ATTTTCTACTTATCAAATATTGAAAATAACGTTGCGGAATATCACAGACCAGAGTAACTAGTAGGAGG
 AAAACATCATGCAAAGTTTAGATAAGAATTTCCGACATTTATCTCGTCAACAAAAGTTACAACAATTG
 GTAGATAAGCAATGGTTATCAGAAGATCAATTCGACATTTTATTGAATCATCCATTAATTGATGAGGA
 AGTAGCAAATAGTTTAATTGAAAATGTCATCGCGCAAGGTGCATTACCCGTTGGATTATTACCGAATA
 TCATTGTGGACGATAAGGCATATGTTGTACCTATGATGGTGGAAGAGCCTTCAGTTGTGCTGCAGCT
 20 AGTTATGGTGCAAAGCTAGTGAATCAGACTGGCGGATTTAAAACGGTATCTTCTGAACGTATTATGAT
 AGGTCAAAATCGTCTTTGATGGCGTTGACGATACTGAAAAATTATCAGCAGACATTAAAGCTTTAGAAA
 AGCAAATTCATAAAATTGCGGATGAGGCATATCCTTCTATTAAGCGCGTGGTGGTGGTTACCAACGT
 ATAGCTATTGATACATTTCTGAGCAACAGTTACTATCTTTAAAAGTATTTGTTGATACGAAAAGATGCT
 ATGGGCGCTAATATGCTTAATACGATTTTAGAGGCCATAACTGCATTTTAAAAAATGAATCTCCACA
 AAGCGACATTTTAATGAGTATTTTATCCAATCATGCAACAGCGTCCGTTGTAAAGTTCAAGGCGAAA
 TTGACGTTAAAGATTTAGCAAGGGGCGAGAGAACTGGAGAAGAGGTTGCCAAACGAATGGAACGTGC

5

pAM328 – ERG9-KANMX-MET3promotor-ERG9 (excluyendo el vector de la cadena principal)

25

TGTGATCTCTAGCTTGGGTCTCTCTCTGTCGTAACAGTTGTGATATCGGCTGCCCTTCATCTCGACCGGAT
GCAATGCCAATTGTAATAGCTTTCCCATGTTAATTATACTTTATTCTT

SEQ ID NO: 44
GAGTGAACCTGCTGCCTGGCGTGCTCTGACTCAGTACATTTCATAGTGGATGGCGGCGTTAGTATC

SEQ ID NO: 45
CGTGTATACGTTTTCCGCTTCTGCTCTTCGTCCTTTCTCTTCTCCGATATCACAACTGTTACGA

5 **SEQ ID NO: 46**
GGTAAGACGTTGGGTTTTATCTTTTGCAGTTGGTACTATTAAGAACAATCACAGGAAACAGCTATGA
CC

SEQ ID NO: 47
TTGCGTTTTGTACTTTGGTTCGCTCAATTTTGCAGGTAGATAATCGAAAAGTTGTAAAACGACGGCCAG
T

10 **SEQ ID NO: 48**
secuencia de pAM491 (excluyendo el vector de la cadena principal)
GTTTAAACITGCTAAATTCGAGTGAAACACAGGAAGACCAGAAAAATCCTCATTTCATCCATATTAACA
ATAATTTCAAATGTTTATTTGCATTATTTGAACTAGGGAAGACAAGCAACGAAACGTTTTGAAAATTT
TGAGTATTTTCAATAAAATTTGTAGAGGACTCAGATATTGAAAAAAGCTACAGCAATTAATACTTGAT
AAGAAGAGTATTGAGAAGGGCAACGGTTCATCATCTCATGGATCTGCACATGAACAAACACCAGAGT
CAAACGACGTTGAAATTGAGGCTACTGCGCCAATTGATGACAATACAGACGATGATAACAAACCGAA
GTTATCTGATGTAGAAAAGGATTAAGATGCTAAGAGATAGTGATGATATITCATAAATAATGTAATT
CTATATATGTTAATTACCTTTTTTGCAGGCATATTTATGGTGAAGGATAAGTTTTGACCATCAAAGAA
GGTTAATGTGGCTGTGGTTTCAGGGTCCATACCCGGGAGTTATGACAATTACAACAACAGAATTCCTTC
15 TATATATGCACGAACCTGTAATATGGAAGAAATTATGACGTACAACTATAAAGTAAATATTTTACGT
AACACATGGTGCTGTTGTGCTTCTTCTTCAAGAGAATACCAATGACGTATGACTAAGTTTAGGATTTAA
TGCAGGTGACGGACCCATCTTCAAACGATTTATATCAGTGGCGTCCAAATTGTTAGGTTTTGTTGGTT
CAGCAGGTTTCCTGTTGTGGGTTCATATGACTTTGAACCAAATGGCCGGCTGCTAGGGCAGCACATAAG
GATAATTCACCTGCCAAGACGGCACAGGCAACTATTCCTTGCTAATTGACGTGCGTTGGTACCAGGAGC
GGTAGCATGTGGGCCTCTTACACCTAATAAGTCCAACATGGCACCTTGTGGTTCTAGAACAGTACCAC
CACCGATGGTACCTACTTCGATGGATGGCATGGATACGGAAATTCCTCAAATCACCGTCCACTTCTTTCA
TCAATGTTATACAGTTGGAACCTTTCGACATTTTGTGCAGGATCTTGTCTAATGCCAAGAAAACAGCTG
TCACTAAATTAGCTGCATGTGCGTTAAATCCACCAACAGACCCAGCCATTGCAGATCCAACCAAATTC
20 TTAGCAATGTTCAACTCAACCAATGCGGAAACATCACTTTTTAACACTTTTCTGACAACATCACCAGGA
ATAGTAGCTTCTGCGACGACACTCTTACCACGACCTTCGATCCAGTTGATGGCAGCTGGTTTTTTGTGCG
GTACAGTAGTTACCAGAAACGGAGACAACCTCCATATCTTCCCAGCCATACTCTTCTACCAATTTGCTTT
AATGAGTATTCGACACCCTTAGAAATCATATTATACCCATTGCGTCACCAGTAGTTGTCTAAATCTC
ATGAAGAGTAAATCTCCTGCTAGACAAGTTTGAATATGTTGCAGACGTGCAAACTCTTGATGTAGAGTT
AAAAGCTTTTTTAATTGCGTTTTGTCCCTCTCTGAGTCTAACCATATCTTACAGGCACCAGATCTTTTC

25

5
10
15
20
25

AAAGTTGGGAAACGGACTACTGGGCUCTGTGTCATAUCCATCCTTAGTTAAAACAGTTGTTCACCAAC
GCCAGCATTGATTGCCTTACAGCCACGCATGGCAGAAGCTACCAAACAACCCCTCTGTAGTTGCCATTG
GTATATGATAAGATGTACCATCGATAACCAAGGGGCTATAACACCAACGGGCAAAGGCATGTAACC
TATAACATTTTCAACAACAGCGCCAAATACGCGGTTCGTAGTCATAATTTTTATATGGTAAACGATCAG
ATGCTAATACAGGAGCTTCTGCCAAAATTGAAAGAGCCTTCCTACGTACCGCAACCGCTCTCGTAGTA
TCACCTAATTTTCTCCTCAAAGCGTACAAAGGTAACCTTACCGTGAATAACCAAGGCAGCGACCTCTTG
TTCTTCAATTGTTTTGTATTTCCACTACTTAATAATGCTTCTAATTCCTTCTAAAGGACGTATTTCTTATC
CAAGCTTTCAATATCGCGGGAATCATCTTCCTCACTAGATGATGAAGGTCCTGATGAGCTCGATTGCGC
AGATGATAAACTTTTGACTTTCGATCCAGAAATGACTGTTTTATTGGTTAAAACCTGGTGTAGAAGCCTT
TTGTACAGGAGCAGTAAAAGACTTCTTGGTGACTTCAGTCTTCACCAATTGGTCTCGAGCCATTATAGT
TTTTTCTCCTTGACGTTAAAGTATAGAGGTATATTAACAATTTTGTGATGACTTTTATGACATTTGAA
TAAGAAGTAATACAAACCGAAAAATGTTGAAAGTATTAGTTAAAGTGGTTATGCAGCTTTTGCATTTAT
ATATCTGTTAATAGATCAAAAATCATCGCTTCGCTGATTAATTACCCAGAAAATAAGGCTAAAAAACT
AATCGCATTATTATCCTATGGTTGTTAATTTGATTGCTTGAAGGTTTGTGGGGCCAGGTTACTG
CCAATTTTCTCCTTCATAACCATAAAAAGCTAGTATTGTAGAATCTTTATTGTTCCGAGCAGTGCGGCG
CGAGGCACATCTGCGTTTCAGGAACGCGACCGGTGAAGACCAGGACGCACGGAGGAGAGTCTTCGGT
CGGAGGGCTGTGCGCCGCTCGGCGGCTTCTAATCCGTACTTCAATATAGCAATGAGCAGTTAAGCGTA
TTACTGAAAGTTCCAAAGAGAAGGTTTTTTTAGGCTAAGATAATGGGGCTCTTTACATTTCCACAACAT
ATAAGTAAGATTAGATATGGATATGTATATGGTGGTATTGCCATGTAATATGATTATTAACCTTCTTTG
CGTCCATCCAAAAAAAAGTAAGAATTTTTGAAAAATCAATATAAAATGAACTCTCAACTAAACCTTG
TTGGTGTGGTATTAAAGGAAGACTTAGGCCGCAAAAAGCAACAACAATTACACAATACAACTTGCAA
ATGACTGAACTAAAAAAACAAAAGACCGCTGAACAAAAAACAGACCTCAAAATGTGCGTATTAAAG
GTATCCAAATTTACATCCCAACTCAATGTGTCAACCAATCTGAGCTAGAGAAATTTGATGGCGTTTCTC
AAGGTAAATACACAATTGGTCTGGGCCAAACCAACATGTCTTTGTCAATGACAGAGAAGATATCTAC
TCGATGTCCCTAACTGTTTTGTCTAAGTTGATCAAGAGTTACAACATCGACACCAACAAAATTGGTAG
ATTAGAAGTCGGTACTGAACTCTGATTGACAAGTCCAAGTCTGTCAAGTCTGTCTTGATGCAATTGTT
TGGTGAAAACTGACGTCGAAGGTATTGACACGCTTAATGCCTGTTACGGTGGTACCAACGCGTGT
TCAACTCTTTGAACTGGATTGAATCTAACGCATGGGATGGTAGAGACGCCATTGTAGTTTGCGGTGAT
ATTGCCATCTACGATAAGGGTGCCGCAAGACCAACCGGTGGTGCCGTTACTGTTGCTATGTGGATCGG
TCCTGATGCTCCAATTGTATTTGACTCTGTAAAGAGCTTCTTACATGGAACACGCCTACGATTTTACAA
GCCAGATTTCACCAGCGAATATCCTTACGTCGATGGTCATTTTTCATTAACTTGTTACGTCAAGGCTCT
TGATCAAGTTTACAAGAGTTATTCCAAGAAGGCTATTTCTAAAGGGTTGGTTAGCGATCCCGCTGGTTC
GGATGCTTTGAACGTTTTGAAATATTTGACTACAACGTTTTCCATGTTCCAACCTGTAAATTGGTCAC
AAAATCATACGGTAGATTACTATATAACGATTTTACAGGCCAATCCTCAATTGTTCCAGAAAGTTGACG
CCGAATTAGCTACTCGCGATTATGACGAATCTTTAACCGATAAAGAACATTGAAAAAACTTTTGTTAAT
GTTGCTAAGCCATTCCACAAAGAGAGAGTTGCCCAATCTTTGATTGTTCCAACAAACACAGGTAACAT
GTACACCGCATCTGTTTATGCCGCCTTTGCATCTCTATTAACTATGTTGGATCTGACGACTTACAAGG
CAAGCGTGTGGTTTATTTCTTACGGTTCCGGTTTAGCTGCATCTCTATATTCTTGCAAAATTTGTGGT
GACGTCCAACATATTATCAAGGAATTAGATATTACTAACAAATTAGCCAAGAGAATCACCGAACTCC
AAAGGATTACGAAGCTGCCATCGAATTGAGAGAAAAATGCCCATTTGAAGAAGAACTTCAAAACCTCAA
GGTTCATTGAGCATTTGCAAAGTGGTGTACTACTTGACCAACATCGATGACAAATTTAGAAGATCT
TACGATGTTAAAAAATAATCTTCCCCCATCGATTGCATCTTGCTGAACCCCTTCATAAATGCTTTATTT

TTTTGGCAGCCTGCTTTTITTAGCTCTCATTTAATAGAGTAGTTTTTAATCTATATACTAGGAAAAC1C
TTTATTTAATAACAATGATATATATATACCCGGAAGCTTTTCAATTCATCTTTTTTTTTTTTGTCTTTT
TTTTGATTCGGTTTCTTTGAAATTTTITGATTGCGTAATCTCCGAGCAGAAGGAAGAACGAAGGAAG
GAGCACAGACTTAGATTGGTATATATACGCATATGTGGTGTGAAGAAACATGAAATTGCCCAGTATT
CTTAACCCAACTGCACAGAACAAAAACCTGCAGGAAACGAAGATAAATCATGTGCGAAAGCTACATAT
AAGGAACGTGCTGCTACTCATCCTAGTCCTGTTGCTGCCAAGCTATTTAATATCATGCACGAAAAGCA
AACAAACTTGTGTGCTTCATTGGATGTTTCGTACCACCAAGGAATTACTGGAGTTAGTTGAAGCATTAG
GTCCCAAAATTTGTTTACTAAAAACACATGTGGATATCTTGACTGATTTTTCCATGGAGGGCACAGTTA
5 AGCCGCTAAAGGCATTATCCGCCAAGTACAATTTTTTACTCTTCGAAGACAGAAAATTTGCTGACATTG
GTAATACAGTCAAATTGCAGTACTCTGCGGGTGTATACAGAATAGCAGAATGGGCAGACATTACGAAT
GCACACGGTGTGGTGGGCCCAGGTATTGTTAGCGGTTTGAAGCAGGCGGCGGAAGAAGTAACAAAGG
AACCTAGAGGCCCTTTGATGTTAGCAGAATTGTCTATGCAAGGGCTCCCTAGCTACTGGAGAATATACT
AAGGGTACTGTTGACATTGCGAAGAGCGACAAAGATTTTGTTATCGGCTTTATTGCTCAAAGAGACAT
GGGTGGAAGAGATGAAGGTTACGATTGGTTGATTATGACACCCGGTGTGGGTTAGATGACAAGGGA
GACGCATTGGGTCAACAGTATAGAACCGTGGATGATGTGGTCTCTACAGGATCTGACATTATTATTGTT
GGGTTTAAAC

10 **SEQ ID NO: 49**

secuencia de pAM492 (excluyendo el vector de la cadena principal)

GTTTAAACTTGCTAAATTCGAGTGAAACACAGGAAGACCAGAAAATCCTCATTTTCATCCATATTAACA
ATAATTTCAAATGTTTATTTGCATTATTTGAACTAGGGAAGACAAGCAACGAAACGTTTTTGAAAATT
TTGAGTATTTTCAATAAATTTGTAGAGGACTCAGATATTGAAAAAAGCTACAGCAATTAATACTTGA
TAAGAAGAGTATTGAGAAGGGCAACGGTTTCATCATCTCATGGATCTGCACATGAACAAACACCAGAG
TCAAACGACGTTGAAATTGAGGCTACTGCGCCAATTGATGACAATACAGACGATGATAACAAACCGA
AGTTATCTGATGTAGAAAAGGATTAAAGATGCTAAGAGATAGTGATGATATTTCATAAATAATGTAAT
TCTATATATGTTAATTACCTTTTTTGGCAGGCATATTTATGGTGAAGGATAAGTTTGGACCATCAAAGA
15 AGGTAAATGTGGCTGTGGTTTCAGGGTCCATACCCGGGTATATATATCATTTGTTATTAATAAAGAG
TTTTCTAGTATATAGATTAAAAAACTACTCTATTAAATGAGAGCTAAAAAAGCAGGCTGCCAAAAA
AATAAAGCATTTATGAAGGGGGTTCAGCAAGATGCAATCGATGGGGGAAGATTATTTTTTAACATCGT
AAGATCTTCTAAATTTGTCATCGATGTTGGTCAAGTAGTAAACACCACTTTGCAAATGCTCAATGGAAC
CTTGAGGTTTGAAAGTCTTCTTCAAATGGGCATTTTCTCTCAATTCGATGGCAGCTTCGTAATCCTTTGG
AGTTTCGGTGATTCTCTTGGCTAATTTGTTAGTAATATCTAATTCCTTGATAATATGTTGGACGTCACCA
ACAATTTTGCAAGAATATAGAGATGCAGCTAAACCGGAACCGTAAGAAAAATAAACCAACACGCTTGC
CTTGTAAGTCGTCAGATCCAACATAGTTTAATAGAGATGCAAAGGCGGCATAAACAGATGCGGTGTAC
ATGTTACCTGTGTTTGTGGAACAATCAAAGATTGGGCAACTCTCTCTTTGTGGAATGGCTTAGCAACA
20 TTAACAAAAGTTTTTCAATGTTCTTATCGGTTAAAGATTGTCATAATCGCGAGTAGCTAATTCGGCG
TCAACTTCTGGGAACAATTGAGGATTGGCTCTGAAATCGTTATATAGTAATCTACCGTATGATTTTGTG
ACCAATTTACAGGTTGGAACATGGAACACGTTGTAGTCGAAATATTTCAAACGTTCAAAGCATCCGA
ACCAGCGGGATCGCTAACCAACCCCTTTAGAAATAGCCTTCTTGGAATAACTCTTGTAACCTTGATCAA
GAGCCTTGACGTAACAAGTTAATGAAAAATGACCATCGACGTAAGGATATTCGCTGGTGAAATCTGGC
TTGTAAAAATCGTAGGCGTGTCCATGTAAGAAAGCTCTTACAGAGTCAAAATACAATTGGAGCATCAGG
ACCGATCCACATAGCAACAGTACCGGCACCACCGTTTGGTCTTGCGGCACCCCTTATCGTAGATGGCAA

25

TATCACCGCAAACTACAATGGCGTCTCTACCATUCCATGCGTTAGATTCAATCCAGTTCAAAGAGTTGA
ACAACGCGTTGGTACCACCGTAACAGGCATTAAGCGTGTCAATACCTTCGACGTCAGTGTTCACCA
AACAAATTGCATCAAGACAGACTTGACAGACTTGGACTTGTCAATCAGAGTTTCAGTACCGACTTCTAA
TCTACCAATTTTGTGGTGTGATGTTGTAACCTTGATCAACTTAGACAAAACAGTTAGGGACATCGA
GTAGATATCTTCTCTGTCATTGACAAAAGACATGTTGGTTTGGCCCAGACCAATTGTGTATTTACCTTG
AGAAACGCCATCAAATTTCTCTAGCTCAGATTGGTTGACACATTGAGTTGGGATGTAAATTTGGATAC
CTTTAATACCGACATTTTGAGGTCTGGTTTTTTGTTTCAGCGGTCTTTTGTTTTTTTAGTTCAGTCATTTGC
AAGTTTGTATTGTGTAATTGTTGTTGCTTTTGGCGGCTAAGTCTTCCTTTAATACCACACCAACAAAGTT
5 TAGTTGAGAGTTTCATTTTATGTGATGATTGATTGATTGTACAGTTTGTTCCTTAATATCTATT
TCGATGACTTCTATATGATATTGCACTAACAGAAGATATTATAATGCAATTGATACAAGACAAGGAG
TTATTTGCTTCTCTTTTATATGATTCTGACAATCCATATTGCGTTGGTAGTCTTTTGTCTGGAACGGTT
CAGCGGAAAAGACGCATCGCTCTTTTGTCTAGAAAGAAATGCCAGCAAAAAGAAATCTCTGACAGTG
ACTGACAGCAAAAAATGTCCTTTTCTAACTAGTAACAAGGCTAAGATATCAGCCTGAAATAAAGGGTGG
TGAAGTAATAATTAATCATCCGTATAAACCTATACACATATATGAGGAAAAATAATACAAAAGTGTT
TTAAATACAGATACATACATGAACATATGCACGTATAGCGCCCAATGTCGGTAATGGGATCGGCTTA
CTAATTATAAAATGCATCATAGAAATCGTTGAAGTTGACGCAGCGACTCGAGATCCATAGGAGCAACT
CATGTCTGAACCTCAACGATTTCTATGATGCATTTTATAATTAGTAAGCCGATCCCATTACCGACATTT
10 GGGCGCTATACGTGCATATGTTTCATGTATGTATCTGTATTTAAACACTTTTGTATTATTTTCTCATA
TATGTGTATAGGTTTATACGGATGATTTAATTATTACITCACCACCCTTATTTTCAGGCTGATATCTTAG
CCTTGTTACTAGTTAGAAAAAGACATTTTGTCTGTCAGTCACTGTCAAGAGATTCTTTTGTCTGGCATTT
CTTCTAGAAGCAAAAAGAGCGATGCGTCTTTTCCGCTGAACCGTTCCAGCAAAAAGACTACCAACGC
AATATGGATTGTCAGAATCATATAAAAGAGAAGCAATAACTCCTTGTCTTGTATCAATTGCATTATA
ATATCTTCTTGTAGTGCAATATCATATAGAAATCATCGAAATAGATATTAAGAAAAACAACTGTAC
AATCAATCAATCAATCATCACATAAAATGGCTGCAGACCAATTGGTGAAGACTGAAGTCACCAAGAA
GTCTTTTACTGCTCCTGTACAAAAGGCTTCTACACCAGTTTAAACCAATAAAACAGTCATTTCTGGATC
GAAAGTCAAAAGTTTATCATCTGCGCAATCGAGCTCATCAGGACCTTCATCATCTAGTGAGGAAGATG
ATTCCCGGATATTGAAAGCTTGGATAAGAAAATACGTCCTTTAGAAGAATTAGAAGCATTATTAAGT
15 AGTGGAATACAAAACAAATTGAAGAACAAAGAGGTCGCTGCCTTGGTTATTACCGGTAAGTTACCTTT
GTACGCTTTGGAGAAAAAATTAGGTGATACTACGAGAGCGGTTGCGGTACGTAGGAAGGCTCTTTCAA
TTTTGGCAGAAGCTCCTGTATTAGCATCTGATCGTTTACCATATAAAAAATTAGACTACGACCGCGTAT
TTGGCGCTTGTGTGAAAATGTTATAGGTTACATGCCTTTGCCGTTGGTGTATAGGCCCTTGGTTAT
CGATGGTACATCTTATCATATACCAATGGCAACTACAGAGGGTTGTTGGTAGCTTCTGCCATGCGTGG
CTGTAAGGCAATCAATGCTGGCGGTGGTGCAACAACTGTTTAACTAAGGATGGTATGACAAGAGGCC
CAGTAGTCCGTTTCCCAACTTTGAAAAGATCTGGTGCCTGTAAGATATGGTTAGACTCAGAAGAGGGA
CAAAACGCAATTAAAAAGCTTTTAACTCTACATCAAGATTTGCACGCTGCAACATATTCAAACTTGT
CTAGCAGGAGATTTACTCTTCATGAGATTTAGAACAACCTACTGGTGACGCAATGGGTATGAATATGAT
20 TTCTAAGGGTGTGGAATACTCATTTAAAGCAAATGGTAGAAGAGTATGGCTGGGAAGATATGGAGGTTG
TCTCCGTTTCTGGTAACTACTGTACCGACAAAAAACAGCTGCCATCAACTGGATCGAAGGTCGTGGT
AAGAGTGTGTCGCGAGAAGCTACTATTCCTGGTGTGTTGTGCAAAAAGTGTTAAAAAGTGATGTTTC
CGCATTTGGTTGAGTTGAACATTGCTAAGAATTTGGTTGGATCTGCAATGGCTGGGTCTGTTGGTGGATT
TAACGCACATGCAGCTAATTTAGTGACAGCTGTTTCTTGGCATTAGGACAAGATCCTGCACAAAATG
TCGAAAGTTCCAACTGTATAACATTGATGAAAGAAGTGGACGGTGATTTGAGAATTTCCGTATCCATG

CCATCCATCGAAGTAGGTACCATCGGTGGTGGTACTGTCTAGAACCAACAAGGTGCCATGTGGACTT
ATTAGGTGTAAGAGGCCACATGCTACCGCTCCTGGTACCAACGCACGTCAATTAGCAAGAATAGTTG
CCTGTGCCGTCTTGGCAGGTGAATTATCCTTATGTGCTGCCCTAGCAGCCGGCCATTGGTTCAAAGTC
ATATGACCCACAACAGGAAACCTGCTGAACCAACAAAACCTAACAATTTGGACGCCACTGATATAAAT
CGTTTGAAAGATGGGTCCGTACCTGCATTAAATCCTAAACTTAGTCATACGTCAATTGGTATTCTCTTG
AAAAAGAAGCACAACAGCACCATGTGTTACGTAAATATTTACTTTATAGTTTGTACGTACATAATTTCT
TCCATATTACAAGTTCGTGCATATATAGAAAGAATTCTGTTGTTGTAATTGTCATAACTCCCGGGAAGC
TTTTCAATTCATCTTTTTTTTTTTTGTTCCTTTTTTTTGATTCCGGTTTCTTTGAAATTTTTTTGATTCCGTA
5 ATCTCCGAGCAGAAGGAAGAACGAAGGAAGGAGCACAGACTTAGATTGGTATATATACGCATATGTG
GTGTTGAAGAAACATGAAATTGCCAGTATTCTTAACCCAACTGCACAGAACAAAAACCTGCAGGAA
ACGAAGATAAATCATGTGCGAAAGCTACATATAAGGAACGTGCTGCTACTCATCCTAGTCTGTGCTG
CCAAGCTATTTAATATCATGCACGAAAAGCAAACAACTTGTGTGCTTCATTGGATGTTGTAACCACC
AAGGAATTACTGGAGTTAGTTGAAGCATTAGGTCCCAAAATTTGTTTACTAAAAACACATGTGGATAT
CTTGACTGATTTTTCCATGGAGGGCACAGTTAAGCCGCTAAAGGCATTATCCGCCAAGTACAATTTTT
ACTCTTCGAAGACAGAAAATTTGCTGACATTGGTAATACAGTCAAATTGCAGTACTCTGCGGGTGTAT
ACAGAATAGCAGAATGGGCAGACATTACGAATGCACACGGTGTGGTGGGCCAGGTATTGTTAGCGG
TTTGAAGCAGGCGGCGGAAGAAGTAACAAAGGAACCTAGAGGCCTTTTGATGTTAGCAGAATTGTCAT
10 GCAAGGGCTCCCTAGCTACTGGAGAATATACTAAGGGTACTGTTGACATTGCGAAGAGCGACAAAGA
TTTTGTTATCGGCCTTTATTGCTCAAAGAGACATGGGTGGAAGAGATGAAGGTTACGATTGGTTGATTAT
GACACCCGGTGTGGGTTTAGATGACAAGGGAGACGCATTTGGGTCAACAGTATAGAACCGTGGATGAT
GTGGTCTCTACAGGATCTGACATTATTATTGTTGGGTTTAAAC

SEQ ID NO: 50

secuencia pAM489 (excluyendo el vector de la cadena principal)

GTTTAAACTACTATTAGCTGAATTGCCACTGCTATCGTTGTTAGTGCGGTTAGTGCTTGCATTCAAAGA
CATGGAGGGCGTTATTACGCCGGAGCTCCTCGACAGCAGATCTGATGACTGGTCAATATATTTTTGCAT
15 TGAGGCTCTGTTTGAATTATATTTTGAGATGACCCATCTAATGTACTGGTATCACCAGATTTTCATGTC
GTTTTTTAAAGCGGCTGCTTGAGTCTTAGCAATAGCGTCACCATCTGGTGAATCCTTTGAAGGAACCAC
TGACGAAGGTTTGGACAGTGACGAAGAGGATCTTTCCTGCTTTGAATTAGTCGCGCTGGGAGCAGATG
ACGAGTTGGTGGAGCTGGGGGCAGGATTGCTGGCCGTCGTGGGTCTGAATGGGTCTTGGCTGGTCC
ATCTCTATTCTGAAAACGGAAGAGGAGTAGGGAATTAAGTGGCTGAAAAATAAGTCTTGAATGAACGT
ATACGCGTATATTTCTACCAATCTCTCAACACTGAGTAATGGTAGTTATAAGAAAGAGACCGAGTTAG
GGACAGTTAGAGGCGGTGGAGATATTCCTTATGGCATGTCTGGCGATGATAAACTTTTCAAACGGCA
GCCCCGATCTAAAAGAGCTGACACCCGGGAGTTATGACAATTACAACAACAGAATTCTTTCTATATAT
GCACGAACTTGTAATATGGAAGAAATTATGACGTACAACTATAAAGTAAATATTTTACGTAACACAT
20 GGTGCTGTTGTGCTTCTTTTCAAGAGAATACCAATGACGTATGACTAAGTTTAGGATTTAATGCAGGT
GACGGACCCATCTTTCAAACGATTTATATCAGTGGCGTCCAAATTGTTAGGTTTTGTTGGTTCAGCAGG
TTTCTGTTGTGGGTGATATGACTTTGAACCAAATGGCCGGCTGCTAGGGCAGCACATAAGGATAATT
CACCTGCCAAGACGGCACAGGCAACTATTCTTGCTAATTGACGTGCGTTGGTACCAGGAGCGGTAGCA
TGTTGGGCTCTTACACCTAATAAGTCCAACATGGCACCTTGTGGTTCTAGAACAGTACCACCACCGAT
GGTACCTACTTCGATGGATGGCATGGATACGGAATTTCTCAAATCACCGTCCACTTCTTTTCATCAATGT
TATACAGTTGGAACCTTCGACATTTTGTGCAGGATCTTGTCTAATGCCAAGAAAACAGCTGTCATAA

25

ATTAGCTGCATGTGCGTTAAATCCACCAACAGACUAGUATTCAGATCCAAUCAAATTCCTAGUAA
 TGTTCAACTCAACCAATGCCGAAACATCACTTTTAAACACTTTTCTGACAACATCACCAGGAATAGTAG
 CTTCTGCGACGACACTCTTACCACGACCTTCGATCCAGTTGATGGCAGCTGGTTTTTGTGGTACAGT
 AGTTACCAGAAAACGGAGACAACCTCCATATCTTCCCAGCCATACTCTTCTACCATTGCTTTAATGAGT
 ATTCGACACCCCTTAGAAATCATATTCATACCCATTGCGTCACCAGTAGTTGTTCTAAATCTCATGAAGA
 GTAAATCTCCTGCTAGACAAGTTTGAATATGTTGCAGACGTGCAAATCTTGATGTAGAGTTAAAAGCT
 TTTTAATTGCGTTTGTCCCTCTTCTGAGTCTAACCATATCTTACAGGCACCAGATCTTTCAAAGTTG
 GGAAACGGACTACTGGGCCTCTTGTCAATACCATCCTIAGTTAAAACAGTTGTTGCACCACCGCCAGCA
 5 TTGATTGCCTTACAGCCACGCATGGCAGAAGCTACCAAACAACCCCTCTGTAGTTGCCATTGGTATATG
 ATAAGATGTACCATCGATAACCAAGGGGCCCTATAACACCAACGGGCAAAGGCATGTAACCTATAACA
 TTTTCACAACAAGCGCCAAATACGCGGTGCTAGTCATAATTTTATATGGTAAACGATCAGATGCTAAT
 ACAGGAGCTTCTGCCAAAATTGAAAGAGCCITCCTACGTACCGCAACCGCTCTCGTAGTATCACCTAA
 TTTTTCTCCAAAGCGTACAAAGGTAACCTACCGTGAATAACCAAGGCAGCGACCTCTTGTCTTCAA
 TTGTTTTGTATTTCCACTACTTAATAATGCTTCTAATTCCTTAAAGGACGTATTTCTTATCCAAGCTTT
 CAATATCGCGGAATCATCTTCTCACTAGATGATGAAGGTCTGATGAGCTCGATTGCGCAGATGAT
 AAACITTTGACTTTTCGATCCAGAAATGACTGTTTTATTGGTTAAAACTGGTGTAGAAGCCTTTTGTACA
 10 GGAGCAGTAAAAGACTTCTTGGTGACTTCAGTCTTCACCAATTGGTCTGCAGCCATTATAGTTTTTCT
 CCTTGACGTTAAAGTATAGAGGTATATTAACAATTTTTTGTGATACTTTTATGACATTTGAATAAGAA
 GTAATACAAACCGAAAATGTTGAAAGTATTAGTTAAAGTGGTTATGCAGCTTTTGCATTTATATATCTG
 TTAATAGATCAAAAATCATCGCTTCGCTGATTAATTACCCAGAAATAAGGCTAAAAAACTAATCGCA
 TTATATCCTATGGTGTAAATTGATTGCTTGAAGTTTGTGGGGCCAGGTTACTGCCAATTTT
 TCCTCTTCATAACCATAAAAAGCTAGTATTGTAGAATCTTTATIGTTCCGAGCAGTGCGGCCGAGGGCAC
 ATCTGCGTTTTAGGAACGCGACCGGTGAAGACCAGGACGCACGGAGGAGAGTCTTCCGTCGGAGGGC
 TGTCGCCCCGCTCGGCGGCTTCTAATCCGTACTTCAATATAGCAATGAGCAGTTAAGCGTATTACTGAAA
 GTTCCAAAGAGAAAGGTTTTTTAGGCTAAGATAATGGGGCTCTTTACATTTCCACAACATATAAGTAA
 GATTAGATATGGATATGTATATGGTGGTATTGCCATGTAATATGATTATTAACCTCTTTGCGTCCATC
 15 CAAAAAAGTAAGAATTTTTGAAAATTCATATAAATGGCTTCAGAAAAAGAAATTAGGAGAGAG
 AGATTCTTGAACGTTTTCCCTAAATTAGTAGAGGAATTGAACGCATCGCTTTTGGCTTACGGTATGCCT
 AAGGAAGCATGTGACTGGTATGCCCCACTCATTGAACTACAACACTCCAGGCGGTAAGCTAAATAGAG
 GTTTGTCCGTTGTGGACACGTATGCTATTCTCTCCAACAAGACCGTTGAACAATTGGGGCAAGAAGAA
 TACGAAAAGGTTGCCATTCTAGGTTGGTGCATTGAGTTGTTGCAGGCTTACTTCTTGGTCCCGATGAT
 ATGATGGACAAGTCCATTACCAGAAGAGGCCAACCATGTTGGTACAAGGTTCTGAAGTTGGGGAAAT
 TGCCATCAATGACGCATTCTGTTAGAGGCTGCTATCTACAAGCTTTTGAAATCTCACTTCAGAAACGA
 AAAATACTACATAGATATCACCGAATTGTTCCATGAGGTACCTTCCAAACCGAATTGGGCCAATTGA
 TGGACTTAATCACTGCACCTGAAGACAAAGTCGACTTGAGTAAGTTCTCCCTAAAGAAGCACTCCITC
 20 ATAGTTACTTICAAGACTGCTTACTATTCTTTCTACTTGCTGTCCATTGGCCATGTACGTTGCCGGTA
 TCACGGATGAAAAGGATTTGAAACAAGCCAGAGATGTCTTGATTCCATTGGGTGAATACTTCCAAATT
 CAAGATGACTACTTAGACTGCTTCGGTACCCAGAACAGATCGGTAAGATCGGTACAGATATCCAAGA
 TAACAAATGTTCTTGGGTAATCAACAAGGCATTGGAACCTTGCTTCCGCAGAACAAAGAAAGACTTTAG
 ACGAAAATTACGGTAAGAAGGACTCAGTCGCAGAAAGCCAAATGCAAAAAGATTTTCAATGACTTGAA
 AATTGAACAGCTATACCACGAATATGAAGAGTCTATTGCCAAGGATTTGAAGGCCAAAATTTCTCAGG
 TCGATGAGTCTCGTGGCTTCAAAGCTGATGTCTTAAGTGGCTTCTGAACAAAGTTTACAAGAGAAGC

AAATAGAACTAACGCTAAICGATAAAACATTAGATTTCAAACTAGATAAGGACCATGTATAAGAACIA
TATACTTCCAATATAATATAGTATAAGCTTTAAGATAGTATCTCTCGATCTACCGTTCCACGTGACTAG
TCCAAGGATTTTTTTTAACCCGGGATATATGTGTACTTTGCAGTTATGACGCCAGATGGCAGTAGTGGA
AGATATTCTTTATTGAAAAATAGCTTGTACCTTACGTACAATCTTGATCCGGAGCTTTTCTTTTTTGC
CGATTAAGAATTTCGGTCGAAAAAGAAAAGGAGAGGGCCAAGAGGGAGGGCATTGGTGACTATTGAG
CACGTGAGTATACGTGATTAAGCACACAAAGGCAGCTTGGAGTATGTCTGTTATTAATTTACAGGTA
GTCTGGTCCATTGGTGAAAGTTTGCGGCTTGACAGACACAGAGGCCGAGAATGTGCTCTAGATTCC
GATGCTGACTTGCTGGGTATTATATGTGTGCCCAATAGAAAAGAGAACAATTGACCCGGTTATTGCAAG
5 GAAAAATTTCAAGTCTTGTAAGCATATAAAAATAGTTTCAGGCACTCCGAAATACTTGGTGGCGTGT
TTCGTAATCAACCTAAGGAGGATGTTTTGGCTCTGGTCAATGATTACGGCATTGATATCGTCCAACGTC
ATGGAGATGAGTCGTGGCAAGAATACCAAGAGTTCCTCGGTTTGCCAGTTATTAAGAACTCGTATTT
CCAAAAGACTGCAACATACTACTCAGTGCAGCTTCACAGAAACCTCATTCGTTTATCCCTTGTTTGAT
TCAGAAGCAGGTGGGACAGGTGAACCTTTGGATTGGAACTCGATTCTGACTGGGTGGGAAGGCAAGA
GAGCCCCGAAAGCTTACATTTTATGTTAGCTGGTGGACTGACGCCGTTTAAAC

SEQ ID NO: 51

pAM497 (excluyendo el vector de la cadena principal)

10 GTTTAAACTTTTCCAATAGGTGGTTAGCAATCGTCTTACTTTCTAACITTTCTTACCTTTTACATTTTACG
CAATATATATATATATATTTCAAGGATATACCATTTCTAATGTCTGCCCTAAGAAGATCGTCGTTTGC
CAGGTGACCACGTTGGTCAAGAAATCACAGCCGAAGCCATTAAGGTTCTTAAAGCTATTTCTGATGTT
CGTTCCAATGTCAAGTTCGATTTGAAAAATCATTTAATTGGTGGTGCTGCTATCGATGCTACAGGTGTT
CCACTTCCAGATGAGGCGCTGGAAGCCTCCAAGAAGGCTGATGCCGTTTGTAGGTGCTGTGGGTGG
TCCTAAATGGGGTACCGGTAGTGTTAGACCTGAACAAGGTTTACTAAAAATCCGTAAGAAGCTTCAAT
TGTACGCCAACTTAAGACCATGTAACCTTGCATCCGACTCTCTTTAGACTTATCTCCAATCAAGCCAC
AATTTGCTAAAGGTACTGACTTCGTTGTTGTGACAGAAATAGTGGGAGGTATTTACTTTGGTAAGAGA
AAGGAAGACGTTTAGCTTGCCTCGTCCCGCGGGTCACCCGCCAGCGACATGGAGGCCAGAATAC
15 CCTCCTTGACAGTCTTGACGTGCGCAGCTCAGGGGCATGATGTGACTGTCGCCCCGTACATTTAGCCCAT
ACATCCCCATGTATAATCATTTGCATCCATACATTTTGATGGCCGCACGGCGCGAAGCAAAAAATTACG
GCTCCTCGCTGCAGACCTGCGAGCAGGGAAACGCTCCCCTCACAGACGCGTTGAATTGTCCCACGCC
GCGCCCCGTAGAGAAATATAAAAGGTTAGGATTTGCCACTGAGGTTCTTCTTTCATATACTTCCCTTT
AAAATCTTGCTAGGATACAGTTCTCACATCACATCCGAACATAAAACAACCATGGCAGAACCAGCCCCAA
AAAAAGCAAAAACAAACCTGTTCCAGGAGCGCAAGGCGTTTATCTCCCGTATCACTAATGAAACTAAAT
TCAAAATCGCTATTTGCTGAATGGTGGTTATATTCAAATAAAAGATTGATTCCTTCTGCAAAGAAGGA
TGACGATGTAGCTTCCCAAGCTACTCAGTCACAGGTCATCGATATTCACACAGGTGTTGGCTTTTGGGA
TCATATGATCCATGCGTTGGCAAAACACTCTGGTTGGTCTCTTATTGTTGAATGTATTGGTGACCTGCA
20 CATTGACGATCACCATACTACCGAAGATTGCGGTATCGCATTAGGGCAAGCGTTCAAAGAAGCAATGG
GTGCTGTCCGTGGTGTAAGAAAGATTTCGGTACTGGGTTCCGACCATTGGATGAGGCGCTATCACGTGCC
GTAGTCGATTTATCTAGTAGACCATTTGCTGTAATCGACCTTGGATTGAAGAGAGAGATGATTGGTGA
TTTATCCACTGAAATGATTCCACACITTTTGAAAGTTTCGCGGAGGCGGCCAGAATTACTTTGCATGT
TGATTGCTGAGAGGTTTCAACGATCACCACAGAAGTGAGAGTGCGTTCAAGGCTTTGGCTGTTGCCA
TAAGAGAAGCTATTTCTAGCAATGGCACCAATGACGTTCCCTCAACCAAAGGTGTTTTGATGTGAAGT
ACTGACAATAAAAAGATTCTTGTTTTCAAGAAGTTGTCATTTGTATAGTTTTTTTATATTGTAGTTGTTG

25

TATTTTAATCAAATGTTAGCGTGATTTATATTTTTTTTTCGCCCTCGACATCATCTGCCUCAGATGCGAAAGTT
AAGTGCGCAGAAAAGTAATATCATGCGTCAATCGTATGTGAATGCTGGTCGCTATACTGCTGTGCGATTCT
GATACTAACGCCGCCATCCACCCGGGTTTCTCATTCAAGTGGTAACTGCTGTAAAAATTAAGATATTTA
TAAATTGAAGCTTGGTCGTTCCGACCAATACCGTAGGGAAACGTAAATTAGCTATTGTAAAAAAGGA
AAAGAAAAGAAAAGAAAAATGTTACATATCGAATTGATCTTATTCTTTGGTAGACCAGTCTTTGCGT
CAATCAAAGATTTCGTTTGTTCCTTGTGGGCCTGAACCGACTTGAGTTAAAATCACTCTGGCAACATCCT
TTTGCAACTCAAGATCCAATTCACGTGCAGTAAAGTTAGATGATTCAAATTGATGGTTGAAAGCCTCA
AGCTGCTCAGTAGTAAATTTCTTGTCCCATCCAGGAACAGAGCCAAACAATTTATAGATAAATGCAAA
5 GAGTTTCGACTCATTTTCAGCTAAGTAGTACAACACAGCATTTGGACCTGCATCAAACGTGTATGCAA
CGATTGTTTCTCCGTAAAACTGATTAATGGTGTGGCACCAACTGATGATACGCTTGAAGTGTCAATTCA
TGTAGAATATTGGAGGGAAAGAGTCCAAACATGTGGCATGGAAAGAGTTGGAATCCATCATTTGTTTCC
TTTGCAAAGGTGGCGAAATCTTTTTCAACAATGGCTTTACGCATGACTTCAAATCTCTTTGGTACGACA
TGTTCAATTCTTCTTTAAATAGTTCGGAGGTTGCCACGGTCAATTGCATACCCTGAGTGGAACTCACA
TCCTTTTTAATATCGCTGACAACTAGGACACAAGCTTTCATCTGAGGCCAGTCAGAGCTGTCTGCGATT
TGTA CTGCCATGGAATCATGACCATCTTCAGCTTTTCCCATTTCCAGGCCACGTATCCGCCAAACAAC
GATCTACAAGCTGAACCAGACCCCTTTCTTGCTATTCTAGATATTTCTGAAGTTGACTGTGGTAATTGG
10 TATAACTTAGCAATTGCAGAGACCAATGCAGCAAAGCCAGCAGCGGAGGAAGCTAAACCAGCTGCTG
TAGGAAAGTTATTTTCGGAGACAATGTGGAGTTTCCATTGAGATAATGTGGGCAATGAGGCGTCCCTC
GATTCCATTTCCCTTTCTTAATTGGCGTAGGTCGCGCAGACAATTTTGAGTTCTTTTCAATTGTGCGATGCTGT
GTGGTTCTCCATTTAACCACAAAGTGTCGCGTTCAAACCTCAGGTGCAGTAGCCGCAGAGGTCAACGTT
CTGAGGTCACTTTCGATAAAAGTCACTGATATGGACGAATTGGTGGGCAGATTCAACTTCGTGTCCCTT
TTCCCCCAATACTTAAGGGTTGCGATGTTGACGGGTGCGGTAACGGATGCTGTGTAAACGGTCATTAT
AGTTTTTTCTCCTTGACGTTAAAGTATAGAGGTATATTAACAATTTTTTGTGATACTTTTATGACATTT
GAATAAGAAGTAATACAAACCGAAAATGTTGAAAGTATTAGTTAAAGTGGTTATGCAGCTTTTGCATT
TATATATCTGTTAATAGATCAAAAATCATCGCTTCGCTGATTAATTACCCAGAAAATAAGGCTAAAAA
15 ACTAATCGCAITATTATCCTATGGTTGTAAATTTGATTGCTTGAATTTGAAGGTTTGTGGGGCCAGGTTA
CTGCCAATTTTTCTCTTCATAACCATAAAAAGCTAGTATTGTAGAATCTTTATTGTTCCGAGCAGTGCG
GCGCGAGGCACATCTGCGTTTCAGGAACCGCAGCCGTTGAAGACCAGGACGCACGGAGGAGAGTCTTC
CGTCGGAGGGCTGTGCCCCGCTCGGCGGCTTCTAATCCGTA CTCAATATAGCAATGAGCAGTTAAGC
GTATTACTGAAAGTTCCAAAGAGAAGGTTTTTTTAGGCTAAGATAATGGGGCTCTTTACATTTCCACAA
CATATAAGTAAGATTAGATATGGATATGTATATGGTGGTATTGCCATGTAATATGATTATTTAAACTTCT
TTGCGTCCATCCAAAAAAGTAAGAATTTTTGAAAATTCAATATAAATGTCAGAGTTGAGAGCCTT
CAGTGCCCCAGGGAAAGCGTTACTAGCTGGTGGATATTTAGTTTTAGATCCGAAATATGAAGCATTTG
TAGTCGGATTATCGGCAAGAATGCATGCTGTAGCCCATCCTTACGGTTCAATTGCAAGAGTCTGATAAG
20 TTTGAAGTGCGTGTGAAAAGTAAACAATTTAAAGATGGGGAGTGGCTGTACCATAAAGTCCTAAAC
TGGCTTCATTCCTGTTTCGATAGGCGGATCTAAGAACCCTTTCATTGAAAAAGTTATCGCTAACGTATT
TAGCTACTTTAAGCCTAACATGGACGACTACTGCAATAGAACTTGTTCGTTATTGATATTTCTCTGA
TGATGCCTACCATTCACAGGAGGACAGCGTTACCGAACATCGTGGCAACAGAAGATTGAGTTTTCAAT
CGCACAGAATTGAAGAAGTTCCAAAACAGGGCTGGGCTCCTCGGCAGGTTTAGTCACAGTTTTAACT
ACAGCTTTGGCCTCCTTTTTTGTATCGGACCTGAAAAATAATGTAGACAAATATAGAGAAGTTATTCAT
AATTTATCACAAGTTGCTCATTTGTCAAGCTCAGGGTAAAATTGGAAGCGGGTTTGATGTAGCGGCGGC
AGCATATGGATCTATCAGATATAGAAGATTCACCCCGCAITTAATCTCTAATTTGCCAGATATTGGAA

GTGCTACTTACGGCAGTAAACTGGGCGATTGGTTAATGAAGAAGACUGAAATATAACGATTAAAAGT
AACCATTACCTTCGGGATTAACCTTATGGATGGGCGATATTAAGAATGGTTCAGAAACAGTAAAACT
GGTCCAGAAGGTAAAAAATTGGTATGATTTCGCATATGCCGAAAAGCTTGAAAATATATACAGAACTCG
ATCATGCAAATTCTAGATTTATGGATGGACTATCTAACTAGATCGCTTACACGAGACTCATGACGATT
ACAGCGATCAGATATTTGAGTCTCTTGAGAGGAATGACTGTACCTGTCAAAAAGTATCCTGAGATCACA
GAAGTTAGAGATGCAGTTGCCACAATTAGACGTTCCCTTTAGAAAAATAACTAAAAGAACTCTGGTGCCGA
TATCGAACCTCCCGTACAACTAGCTTATTGGATGATTGCCAGACCTTAAAAGGAGTTCTTACTTGCTT
AATACCTGGTGCTGGTGGTTATGACGCCATTGCAGTGATTGCTAAGCAAGATGTTGATCTTAGGGCTC
5 AAACCGCTGATGACAAAAGATTTTCTAAGGTTCAATGGCTGGATGTAACCTCAGGCTGACTGGGGTGT
AGGAAAAGAAAAAGATCCGAAAACCTTATCTTGATAAAATAACTTAAGGTAGATAATAGTGGTCCATGTG
ACATCTTTATAAATGTGAAGTTTGAAGTGACCGCGCTTAACATCTAACCATTCTTCCGATAGTACT
TGAAATTGTTCTTTTCGGCGGCATGATAAAATTCTTTAATGGGTACAAGCTACCCGGGAAAAGATTCTC
TTTTTTTATGATATTTGTACATAAACTTTATAAATGAAATTCATAATAGAAACGACACGAAATTACAAA
ATGGAATATGTTTCATAGGGTAGACGAAACTATATACGCAATCTACATACATTTATCAAGAAGGAGAAA
AAGGAGGATGTAAAGGAATACAGGTAAGCAAATTGATACTAATGGCTCAACGTGATAAGGAAAAAGA
ATTGCACTTTAACATTAATATTGACAAGGAGGAGGACACACAAAAAGTTAGGTGTAACAGAAAA
TCATGAAACTATGATTCCTAATTTATATATTGGAGGATTTTCTCTAAAAAATAAATAACAACAAAT
10 AAAAAACACTCAATGACCTGACCATTTGATGGAGTTTAAGTCAATACCTTCTGAACCATTTCCATAA
TGGTGAAAGTTCCCTCAAGAATTTTACTCTGTGAGAAACGGCCTTAACGACGTAGTCGACCTCCTCTC
AGTACTAAATCTACCAATACCAATCTGATGGAAGAAATGGGCTAATGCATCATCCTTACCCAGCGCAT
GTAAAAACATAAGAAGTTCTAGGGAAGCAGATGTACAGGCTGAACCCGAGGATAATGCGATATCCCT
TAGTGCCATCAATAAAGATTCTCCTTCCACGTAGGCGAAAAGAAACGTTAACACGTTTAAAC

SEQ ID NO: 52

secuencia pAM493 (excluyendo el vector de la cadena principal)

GTTTAACTACTCAGTATATTAAGTTTCGAATTGAAGGGCGAACTCTTATTCTGAAGTCGGAGTCACCCAC
15 AACACTTCCGCCATACTCTCCGAATCCTCGTTTCCTAAAGTAAGTTTACTTCCACTTGTAGGCCTATTA
TTAATGATATCTGAATAATCCTCTATTAGGGTTGGATCATTTCAGTAGCGCGTGCGATTGAAAGGAGTCC
ATGCCCGACGTCGACGTGATTAGCGAAGGCGCGTAACCATTTGTCATGTCTAGCAGCTATAGAATAAC
CTCCTTGACACCACTTGCGGAAGTCTCATCAACATGCTCTTCCTTATTACTCATTCTTTACCAAGCAG
AGAATGTTATCTAAAAACTACGTGTATTTACCTCTTTCTCGACTTGAACACGTCCAACCTCTTAAGTA
CTACCACAGCCAGGAAAGAAATGGATCCAGTTCTACACGATAGCAAAGCAGAAAAACACAACCAGCGTA
CCCCGTGTAGAAGCTTCTTTGTTTACAGCACTTGATCCATGTAGCCATACTCGAAATTTCAACTCATCTG
AAACTTTTCCTGAAGGTTGAAAAAGAATGCCATAAGGGTCACCCGAAGCTTATTACGCCCCGGGAGTT
ATGACAATTACAACAACAGAATTCTTTCTATATATGCACGAACTTGTAATATGGAAGAAATTATGACG
20 TACAAACTATAAAGTAAATATTTTACGTAACACATGGTGCTGTTGTGCTTCTTTTTCAAGAGAATACCA
ATGACGTATGACTAAGTTTAGGATTTAATGCAGGTGACGGACCCATCTTTCAAACGATTTATATCAGTG
GCGTCCAAATTGTTAGGTTTTGTTGGTTTCAGCAGGTTTCCTGTTGTGGGTCATATGACTTTGAACCAAA
TGGCCGGCTGCTAGGGCAGCACATAAGGATAATTCACCTGCCAAGACGGCACAGGCAACTATTCTTGC
TAATTGACGTGCGTTGGTACCAGGAGCGGTAGCATGTGGGCCTCTTACACCTAATAAGTCCAACATGG
CACCTTGTGGTTCTAGAACAGTACCACCACCGATGGTACCTACCTCGATGGATGGCATGGATACGGAA
ATTCTCAAATCACCGTCCACTTCTTTCATCAATGTTATACAGTTGGAACTTTCGACATTTTGTGCAGGAT

CTTGTCCTAATGCCAAGAAAACAGCTGTCACTAAATTAGCTGCATGTGCGTTAAATCCACCAACAGAC
 CCAGCCATTGCAGATCCAACCAAAT
 TCTTAGCAATGTTCAACTCAACCAATGCGGAAACATCACTTTTTAACACTTTTCTGACAAATCACCAG
 GAATAGTAGCTTCTGCGACGACACTCTTACCACGACCTTCGATCCAGTTGATGOCAGCTGGTTTTTGT
 CGGTACAGTAGTTACCAGAAAACGGAGACAACCTCCATATCTTCCCAGCCATACTCTTCTACCATTTGCT
 TTAATGAGTAITCGACACCCTTAGAAATCATATTTCATACCCATTGCGTCAACCAGTAGTTGTTCTAAATC
 TCATGAAGAGTAAATCTCCTGCTAGACAAGTTTGAATATGTTGCAGACGTGCAAAATCTTGATGTAGAG
 TTAAGAGCTTTTTTAATTGCGTTTTGTCCCCTCTCTGAGTCTAACCATATCTTACAGGCACCAGATCTTT
 TCAAAGTTGGGAAACGGACTACTGGGCCTCTTGTACATACCATCCTTAGTTAAACAGTTGTTGCACCAC
 CGCCAGCATTGATTGCTTACAGCCACGCATGGCAGAAGCTACCAAAACAACCTCTGTAGTTGCCAITT
 GGTATATGATAAGATGTACCATCGATAACCAAGGGGCCTATAACACCAACGGGCAAAGGCATGTAAC
 CTATAACATTTTCACAACAAGCGCCAAATACGCGGTGCTAGTCATAATTTTATATGGTAAACGATCA
 GATGCTAATACAGGAGCTTCTGCCAAAATTGAAAGAGCCTTCCTACGTACCGCAACCGCTCTCGTAGT
 ATCACCTAATTTTTCTCCAAAGCGTACAAAGGTAACCTTACCGTGAATAACCAAGGCAGCGACCTCTTT
 GTTCTTCAATTGTTTTGTATTTCCACTACTTAATAATGCTTCTAATTCTTCTAAAGGACGTATTTCTTAT
 CCAAGCTTTCAATATCGCGGGAATCATCTTCTCACTAGATGATGAAGGTCCTGATGAGCTCGATTGCG
 CAGATGATAAACTTTTGACTTTTCGATCCAGAAATGACTGTTTTATTGGTTAAAACTGGTGTAGAAGCCT
 TTTGTACAGGAGCAGTAAAGACTTCTTGGTGACTTCAGTCTTCACCAATTGGTCTGCAGCCATTATAG
 TTTTTCTCCTTGACGTTAAAGTATAGAGGTATATTAACAATTTTTTGTGATACTTTTATGACATTTGA
 ATAAGAAGTAATACAAACCGAAAATGTTGAAAGTATTAGTTAAAGTGGTTATGCAGCTTTTGCAITTA
 TATATCTGTTAATAGATCAAAAATCATCGCTTCGCTGATTAATTACCCAGAAAATAAGGCTAAAAAAC
 TAATCGCATTATTATCCTATGGTTGTTAAATTGATTGCTGATTTGAAGGTTTGTGGGGCCAGGTTACTG
 CCAATTTTCTCTTCATAACCATAAAAGCTAGTATTGTAGAATCTTTATTGTTCCGAGCAGTGCAGGCG
 CGAGGCACATCTGCGTTTCAGGAACGCGACCGGTGAAGACCAGGACGCACGGAGGAGAGTCTTCCGT
 CGGAGGGCTGTGCGCCGCTCGGCGGCTTCTAATCCGTACTTCAATATAGCAATGAGCAGTTAAGCGTA
 TFACTGAAAGTTCCAAAGAGAAGGTTTTTTTAGGCTAAGATAATGGGGCTCTTACATTTCCACAACAT
 ATAAGTAAGATTAGATATGGATATGTATATGGTGGTATTGCCATGTAATATGATTATTAAACTCTTTTG
 CGTCCATCCAAAAAAGTAAGAATTTTGAAAAATCAATATAAATGACTGCCGACAACAATAGTAT
 GCCCATGGTGAGTATCTAGTTACGCCAAATTAGTGCAAAACCAAACACCTGAAGACATTTTGGAAG
 AGTTTCTGAAATTATTCCATTACAACAAAGACCTAATACCCGATCTAGTGAGACGTCAAATGACGAA
 AGCGGAGAAACATGTTTTCTGGTCATGATGAGGAGCAAATTAAGTTAATGAATGAAAATTGTATTGT
 TTTGGATTGGGACGATAATGCTATTGGTGCCGTACCAAGAAAGTTTGTCAITTAATGGAAAATATTG
 AAAAGGGTTTACTACATCGTGCATTCTCCGTCTTTATTTTCAATGAACAAGGTGAATTACTTTTACAAC
 AAAGAGCCACTGAAAAAATAACTTTCCCTGATCTTTGGACTAACACATGCTGCTCTCATCCACTATGTA
 TTGATGACGAATTAGGTTTGAAGGGTAAGCTAGACGATAAGATTAAGGGCGCTATTACTGCGCGCGTG
 AGAAAACTAGATCATGAATTAGGTATTCCAGAAGATGAAACTAAGACAAGGGGTAAGTTTCACTTTTT
 AAACAGAATCCATTACA'TGGCACCAAGCAATGAACCATGGGGTGAACATGAAATTGATTACATCCTAT
 TTTATAAGATCAACGCTAAAGAAAACTTGACTGTCAACCCAAACGTCAATGAAGTTAGAGACTTCAAA
 TGGGTTTACCAAAATGATTTGAAAACTATGTTTGTGACCCAAAGTTACAAGTTTACGCCTTGGTTTAAAG
 ATTATTTGCGAGAAATTACTTATTCAACTGGTGGGAGCAATTAGATGACCTTCTGAAGTGGAAAAATGA
 CAGGCAAATTCATAGAATGCTATAACAACGCGTCAATAATATAGGCTACATAAAAAATCATAATAACTT
 TGTATCATAGCAAAATGTGATATAAAACGTTTCATTTACCTGAAAAATAGTAAAAATAGGCGACAA

AAATCCTTAGTAATAATGTAAACCTTATTTTCTTTATTTACCCGGGAGTCAGTCTGACTCTTGCGAGAGA
TGAGGATGTAATAATACTAATCTCGAAGATGCCATCTAATACATATAGACATACATATATATATATAT
ACATTCTATATATTCTTACCCAGATTCTTTGAGGTAAGACGGTTGGGTTTTATCTTTTGCAGTTGGTACT
ATTAAGAACAATCGAATCATAAGCATTGCTTACAAAGAATACACATACGAAATATTAACGATAATGTC
AATTACGAAGACTGAACTGGACGGTATATTGCCATTGGTGGCCAGAGGTAAAGTTAGAGACATATATG
AGGTAGACGCTGGTACGTTGCTGTTTGTGCTACGGATCGTATCTCTGCATATGACGTTATTATGAAAA
ACAGCATTCTGAAAAGGGGATCCTATTGACCAAACCTGTCAGAGTTCTGGTTCAAGTTCTGTCCAAC
GATGTTTCGTAATCATTGGTTCGACATCGCCCCAGGTAAGACTATTTTCGATTATCTACCTGCAAAATTG
5 AGCGAACCAAAGTACAAAACGCAACTAGAAGACCGCTCTCTATTGGTTACAAAACATAAACTAATTCC
ATTGGAAGTAATTGTCAGAGGCTACATCACCGGATCTGCTTGGAAAGAGTACGTAAAAACAGGTAAGT
TGCATGGTTTGAACAACCTCAAGGACTTAAAGAATCTCAAGAGTTCCCAGAACCAATCTTCACCCCA
TCGACCAAGGCTGAACAAGGTGAACATGACGAAAAACATCTCTCCTGCCAGGCCGCTGAGCTGGTGG
GTGAAGATTTGTACGTAGAGTGGCAGAACTGGCTGTAAACCTGTAAGTCCAAGTGCAAAGATTATGCT
AAGGAGAAGGGCATCATCATCGCAGACACTAAATTGTTTAAAC

SEQ ID NO: 53
secuencia pAM426
10 TCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGT
CTGTAAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGGG
GCTGGCTTAAGTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATCGACTACGTCGTAAGG
CCGTTTCTGACAGAGTAAAAATCTTGAGGGAACCTTCACCATTATGGGAAATGCTTCAAGAAGGTATT
GACTTAAACTCCATCAAATGGTCAGGTCAATTGAGTGTTTTTATTGTTGTATTTTTTTTTTAGAGA
AAATCCTCCAATATCAAATTAGGAATCGTAGTTTCATGATTTTCTGTTACACCTAAGCTTTTGTGTGGTG
CCCTCCTCCTTGCAATATTAATGTAAAAGTGCAATTCCTTTTCCTTATCACGTTGAGCCATTAGTATCA
ATTTGCTTACCTGTATTCCTTACTATCCTCCTTTTTCTCCTTCTTGATAAAATGTATGTAGATTGCGTATA
TAGTTTCGTCTACCCTATGAACATATTCATTTTGTAAATTCGTGTCGTTTCTATTATGAATTCATTTAT
15 AAAGTTTATGTACAAATATCATAAAAAAAGAGAATCTTTTAAGCAAGGATTTTCTTAACTTCTTCGGC
GACAGCATCACCGACTTCGGTGGTACTGTTGGAACCACTAAATCACCAGTTCTGATACCTGCATCCA
AAACCTTTTAACTGCATCTTCAATGGCCTTACCTTCTTCAGGCAAGTTCAATGACAATTTCAACATCA
TTGACGACAGACAAGATAGTGGCGATAGGGTCAACCTTATTCCTTTGGCAAATCTGGAGCAGAACCGTGG
CATGGTTCGTACAAACCAAATGCGGTGTTCTTGTCTGGCAAAGAGGCCAAGGACGCAGATGGCAACA
AACCAAGGAACCTGGGATAACGGAGGCTTCATCGGAGATGATATCACCAAACATGTTGCTGGTGATT
ATAATACCATTTAGGTGGGTGGGTCTTAACTAGGATCATGGCGGCAGAATCAATCAATTGATGTTG
AACCTTCAATGTAGGGAATTCGTTCTTGATGGTTTCCTCCACAGTTTTTCTCCATAATCTTGAAGAGGC
CAAAAGATTAGCTTTATCCAAGGACCAAATAGGCAATGGTGGCTCATGTTGTAGGGCCATGAAAGCGG
20 CCATTCTGTGATTCTTTCGACTTCTGGAACGGTGTATTGTTCACTATCCCAAGCGACACCATCACCAT
CGTCTTCTTTCTCTTACCAAAGTAAATACCTCCCACTAATTCTCTGACAACAACGAAGTCAGTACCTT
TAGCAAATTGTGGCTTGATTGGAGATAAGTCTAAAAGAGAGTCGGATGCAAAGTTACATGGTCTTAAG
TTGGCGTACAATTGAAGTCTTTACGGATTTTATAGTAAACCTTGTTCAGGTCTAACACTACCGGTACCC
CATTTAGGACCAGCCACAGCACCTAACAAAACGGCATCAACCTTCTTGGAGGCTTCCAGCGCCTCATC
TGGAAGTGGGACACCTGTAGCATCGATAGCAGCACCACCAATTAAATGATTTTCGAAATCGAACTTGA
CATTTGGAACGAACATCAGAAATAGCTTTAAGAACCTTAATGGCTTCGGCTGTGATTCTTGACCAACG

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un isoprenoide, caracterizado porque comprende:

(a) obtener una pluralidad de células huésped que
5 comprenden una ruta enzimática para elaborar isopentenil pirofosfato y en donde todas las enzimas de ruta están bajo el control de un regulador transcripcional heterólogo y

(b) cultivar las células huésped en un medio, bajo condiciones que son sub-óptimas en comparaciones con las
10 condiciones que proporcionarían una velocidad de crecimiento específica máxima para las células huésped.

2. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la ruta es la ruta de mevalonato.

3. El método de conformidad con la reivindicación 1,
15 caracterizado porque la ruta es la ruta DXP.

4. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el por lo menos un regulador transcripcional heterólogo es inducible.

5. El método de conformidad con la reivindicación 1,
20 caracterizado porque las enzimas de ruta están bajo el control de un solo regulador transcripcional.

6. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque las enzimas de ruta están bajo el control de un regulador transcripcional múltiple.

25 7. El método de conformidad con la reivindicación 1,

caracterizado porque las células huésped son procariontes.

8. El método de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado porque las células huésped son *E. coli*.

9. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque las células huésped son eucariontes.

10. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque las células huésped son hongos.

11. El método de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado porque las células huésped son *S. cerevisiae*.

12. El método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque la ruta comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima de ruta de mevalonato de un procarionte que tiene una ruta de mevalonato endógena.

13. El método de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque el procarionte es del género seleccionado de *Enterococcus*, *Pseudomonas* y *Staphylococcus*.

14. El método de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque la secuencia de ácido nucleico es seleccionada de acetil-CoA tiolasa, HMG-CoA sintasa, HMG-CoA reductasa y mevalonato cinasa.

15. El método de conformidad con la reivindicación 12, caracterizado porque la secuencia de ácido nucleico codifica una HMG reductasa clase II.

16. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque las células huésped son cultivadas en el

medio en donde el nutriente o la temperatura o ambos son mantenidos a un nivel por debajo de aquel que proporcionaría la velocidad de crecimiento específica máxima para las células huésped.

5 17. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque la temperatura del medio es por lo menos aproximadamente 2-20°C menor que aquella que proporcionaría la velocidad de crecimiento específica máxima.

10 18. El método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque las células huésped son cultivadas a una temperatura por lo menos aproximadamente 5°C menor que aquella que proporcionaría la velocidad de crecimiento específica máxima.

15 19. El método de conformidad con la reivindicación 17, caracterizado porque la temperatura del medio es por lo menos aproximadamente 10°C menor que aquella que proporcionaría la velocidad de crecimiento específica máxima.

20 20. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el medio comprende una fuente de carbono y la cantidad de fuente de carbono proporcionará aproximadamente 90% o menos de la velocidad de crecimiento específica máxima.

25 21. El método de conformidad con la reivindicación 20, caracterizado porque la cantidad de la fuente de carbono proporcionará aproximadamente 75% o menos de la velocidad de crecimiento específica máxima.

22. El método de conformidad con la reivindicación 20, caracterizado porque la cantidad de la fuente de carbono proporcionará aproximadamente 50% o menos de la velocidad de crecimiento específica máxima.

5 23. El método de conformidad con la reivindicación 20, caracterizado porque la cantidad de la fuente de carbono proporcionará aproximadamente 25% o menos de la velocidad de crecimiento específica máxima.

24. El método de conformidad con la reivindicación
10 20, caracterizado porque la cantidad de la fuente de carbono proporcionará aproximadamente 75%-10% de la velocidad de crecimiento específica máxima.

25. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el medio comprende una fuente de nitrógeno
15 presente en una cantidad menor que aquella que proporcionaría aproximadamente el 90% o menos de la velocidad específica máxima.

26. El método de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado porque la cantidad de la fuente de nitrógeno
20 proporcionará aproximadamente 75% o menos de la velocidad de crecimiento máxima específica.

27. El método de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado porque la cantidad de la fuente de nitrógeno proporcionará el 50% o menos de la velocidad de crecimiento
25 específica máxima.

28. El método de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado porque la cantidad de la fuente de nitrógeno proporcionará aproximadamente 25% o menos de la velocidad de crecimiento específica máxima.

5 29. El método de conformidad con la reivindicación 25, caracterizado porque la cantidad de la fuente de nitrógeno proporcionará aproximadamente 75%-10% de la velocidad de crecimiento específica máxima.

10 30. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el isoprenoide es producido en una cantidad mayor de aproximadamente 10 gramos por litro del medio.

15 31. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el isoprenoide es producido en una cantidad mayor de aproximadamente 50 mg por gramo de peso de célula seco.

32. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 30 o 31, caracterizado porque la cantidad de isoprenoide producido es menor de aproximadamente 150 horas.

20 33. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 30 o 31, caracterizado porque la cantidad de isoprenoide es producido en menos de aproximadamente 96 horas.

34. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 30 o 31, caracterizado porque la cantidad de
25 isoprenoide es producido en menos de aproximadamente 72 horas.

35. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque las células huésped son cultivadas a una temperatura menor que aquella que proporcionaría la velocidad de crecimiento específica máxima y en donde las células huésped son cultivadas en un medio en el cual la fuente de carbono es mantenida a un nivel menor que aquel que proporcionaría la velocidad de crecimiento específica máxima.

36. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el isoprenoide es seleccionado del grupo que consiste de un hemiterpeno, monoterpeno, diterpeno, triterpeno, tetraterpeno y politerpeno.

37. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el isoprenoide no es un carotenoide.

38. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el isoprenoide es un C₅-C₂₀ isoprenoide.

39. El método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el isoprenoide es seleccionado del grupo que consiste de abietadieno, amorfadieno, careno, α -farneseno, β -farneseno, farnesol, geraniol, geranilgeraniol, isopreno, linalool, limoneno, mirceno, nerolidol, ocimeno, patchoulol, β -pineno, sabineno, γ -terpineno, terpinoleno y valenceno.

40. Un método para producir un isoprenoide, caracterizado porque comprende:

(a) obtener una pluralidad de células huésped que

comprenden una secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima de ruta de mevalonato de un procarionte que tiene una ruta de mevalonato endógena y

(b) cultivar las células huésped en un medio, bajo
5 condiciones que son sub-óptimas en comparaciones con las condiciones que proporcionarían una velocidad de crecimiento específica máxima para las células huésped.

41. Una célula huésped, caracterizada porque es apta de producir un isoprenoide en una cantidad mayor de
10 aproximadamente 10 gramos por litro del medio, cuando es cultivada en un medio que comprende una fuente de carbono.

42. Una célula huésped, caracterizada porque es apta de producir un isoprenoide en una cantidad mayor de aproximadamente 50 gramos por gramo de peso de célula seca
15 cuando es cultivada en un medio que comprende una fuente de carbono.

43. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 40 o 41, caracterizado porque la cantidad de isoprenoide es producida en menos de aproximadamente 150 horas.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona métodos para una producción robusta de isoprenoides vía una o más rutas biosintéticas. La invención también proporciona ácidos nucleicos, enzimas, vectores de expresión y células huésped modificadas genéticamente para llevar a cabo los métodos presentes. La invención también proporciona métodos de fermentación para la alta productividad de isoprenoides a partir de células huésped modificadas genéticamente.

Fig 1A

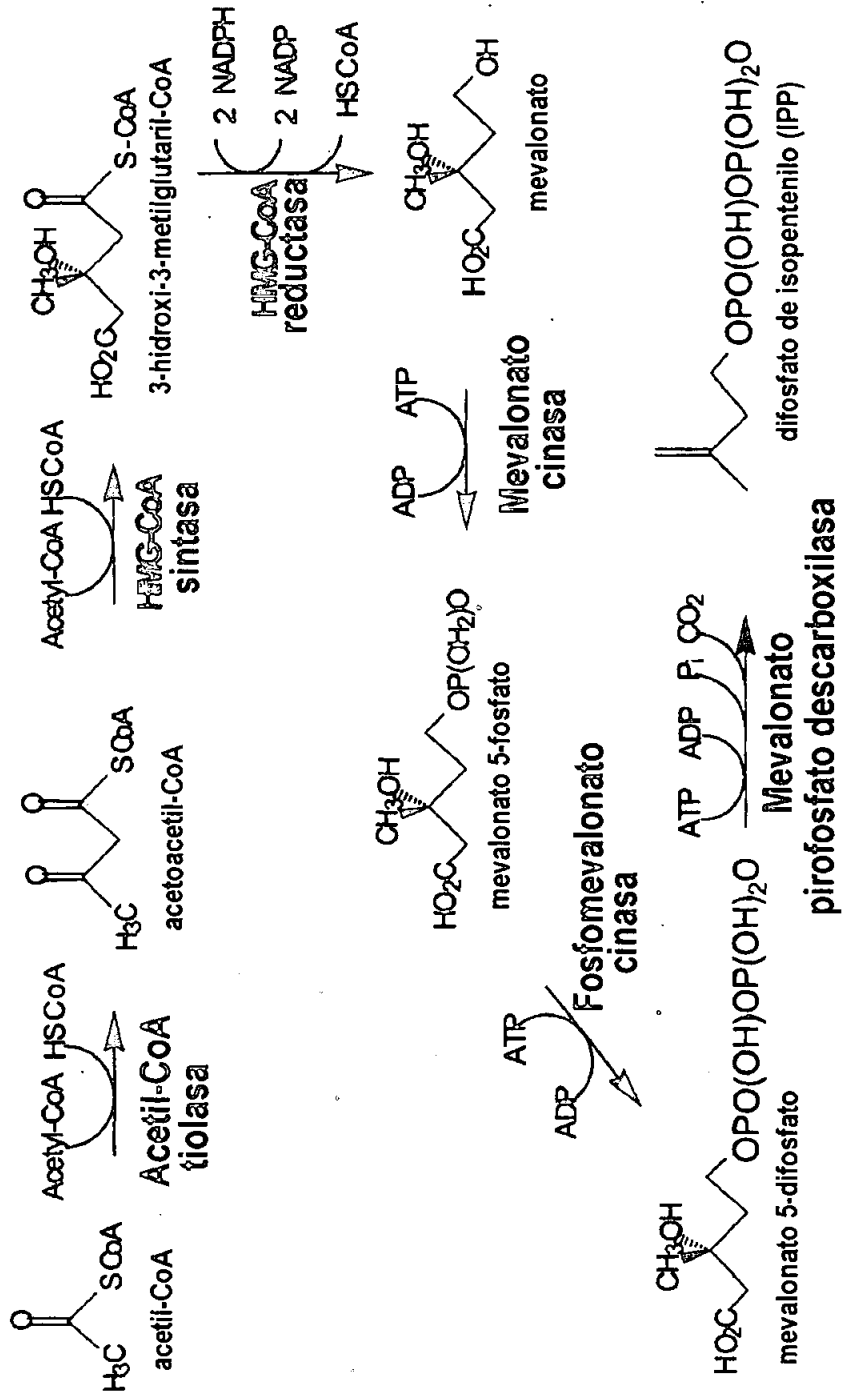


Fig 2

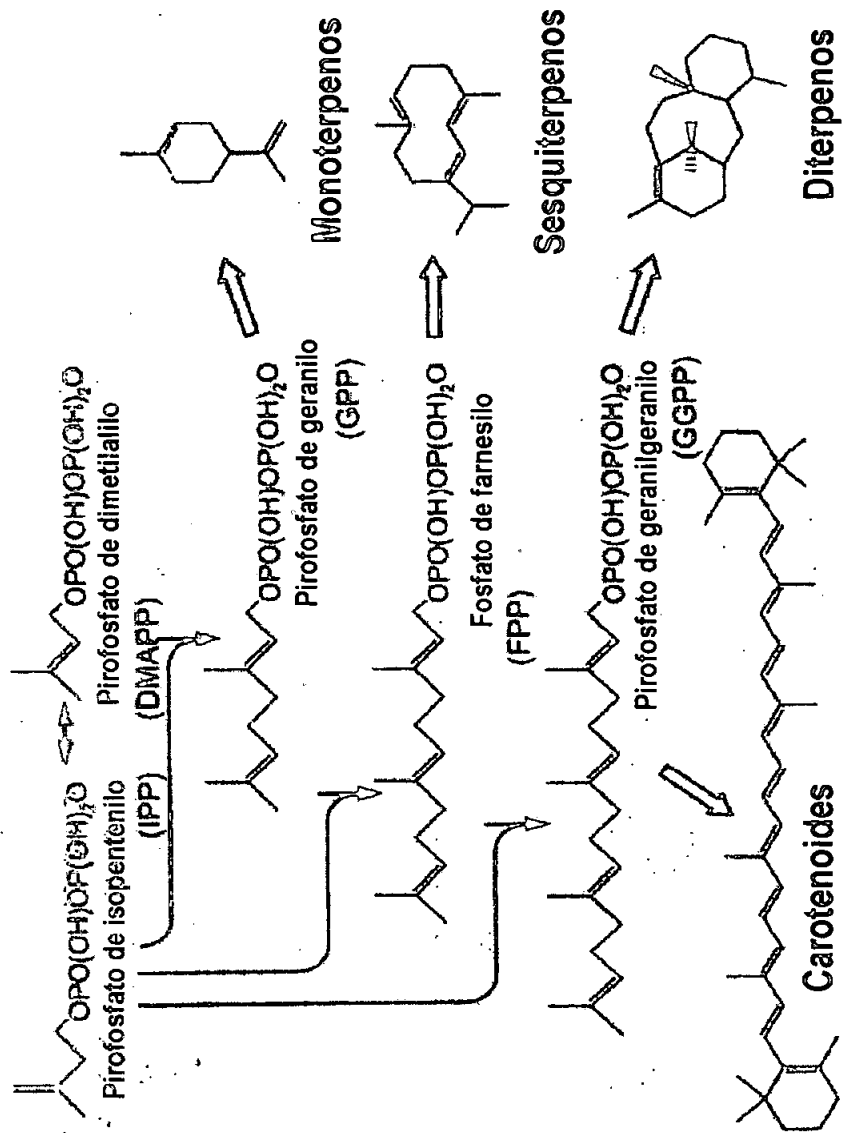


Fig 3

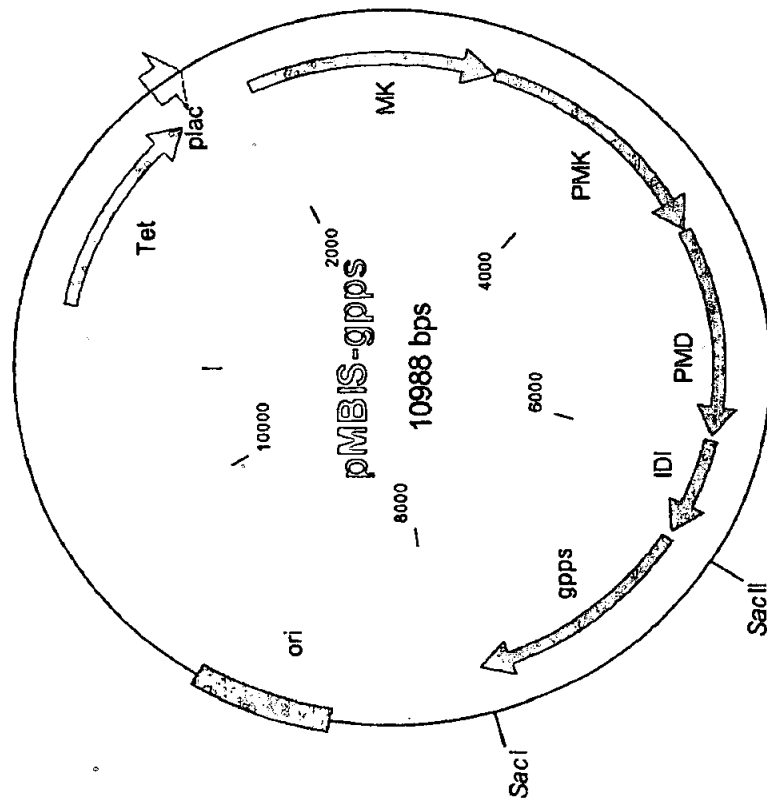


Fig 4

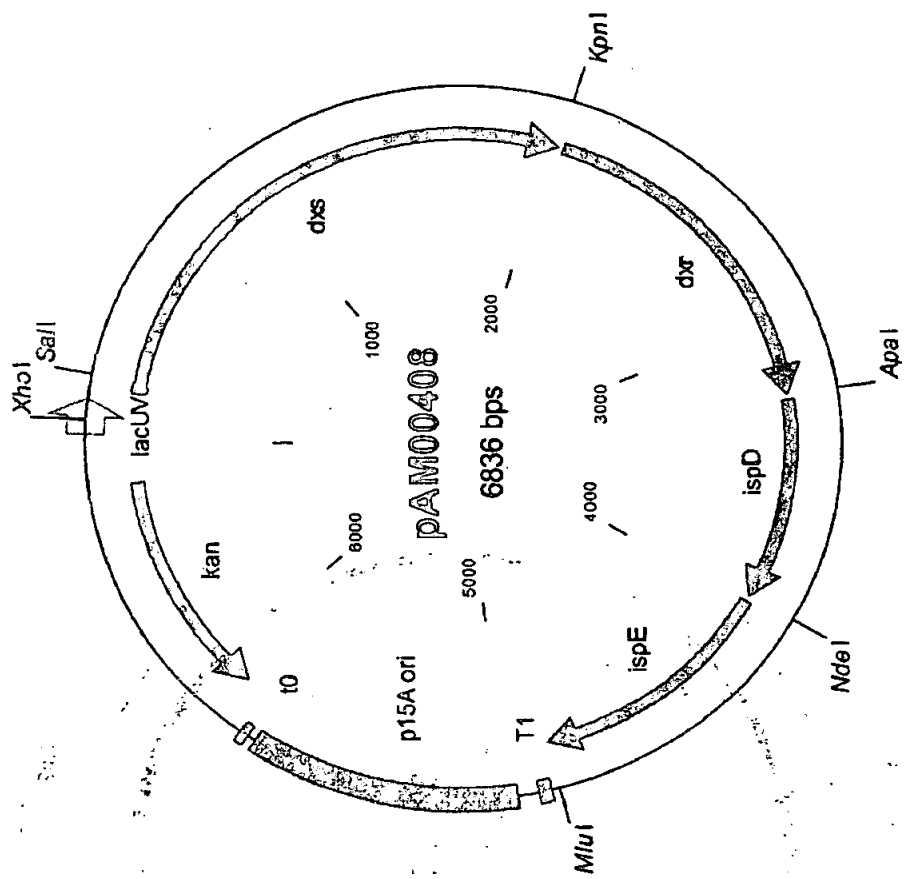
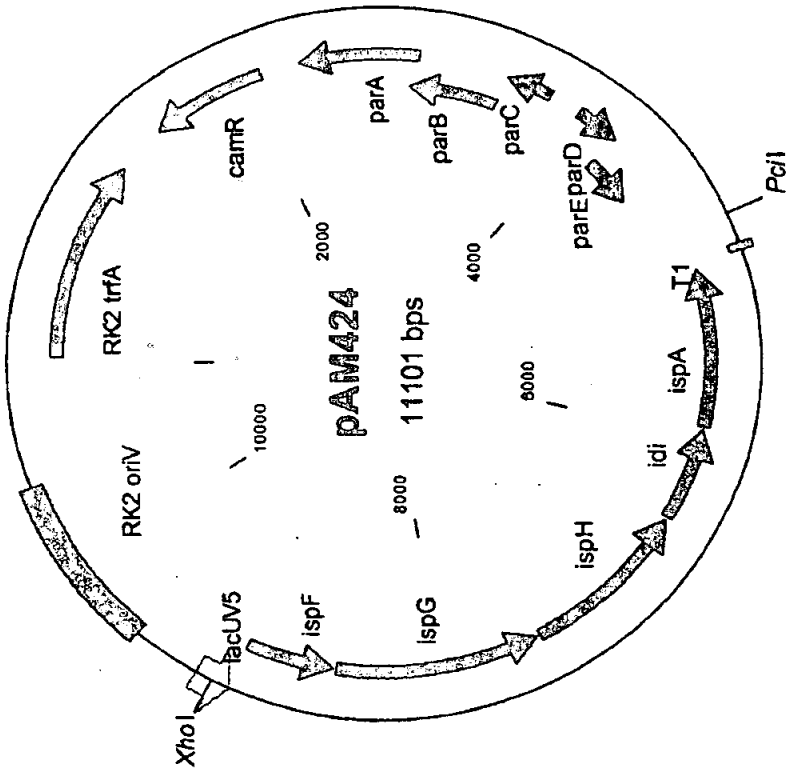


Fig 5



pTrc99A-ADS: ~1.6 kb ADS inserto en sitio *NcoI* *XmaI*
pTrc99A-FSA: ~1.7 kb FSA inserto en sitio *NcoI* *SacI*
pTrc99A-GTS: ~1.8 kb GTS inserto en sitio *XmaI* *XbaI*
pTrc99A-APS: ~1.9 kb APS inserto en sitio *XmaI* *XbaI*
pTrc99A-TS: ~1.9 kb TS inserto en sitio *XmaI* *XbaI*
pTrc99A-BPS: ~1.7 kb BPS inserto en sitio *XmaI* *XbaI*
pTrc99A-PHS: ~1.9 kb PHS inserto en sitio *XmaI* *XbaI*
pTrc99A-SS: ~1.8 kb SS inserto en sitio *XmaI* *XbaI*
pTrc99A-LLS: ~1.7 kb LLS inserto en sitio *NcoI* *XmaI*
pTrc99A-CS: ~1.8 kb CS inserto en sitio *NcoI* *XmaI*
pTrc99A-LMS: ~1.9 kb LMS inserto en sitio *XbaI* *PstI*
pAM373: ~1.7 kb FSA inserto en sitio *NcoI* *SacI*

Fig 8

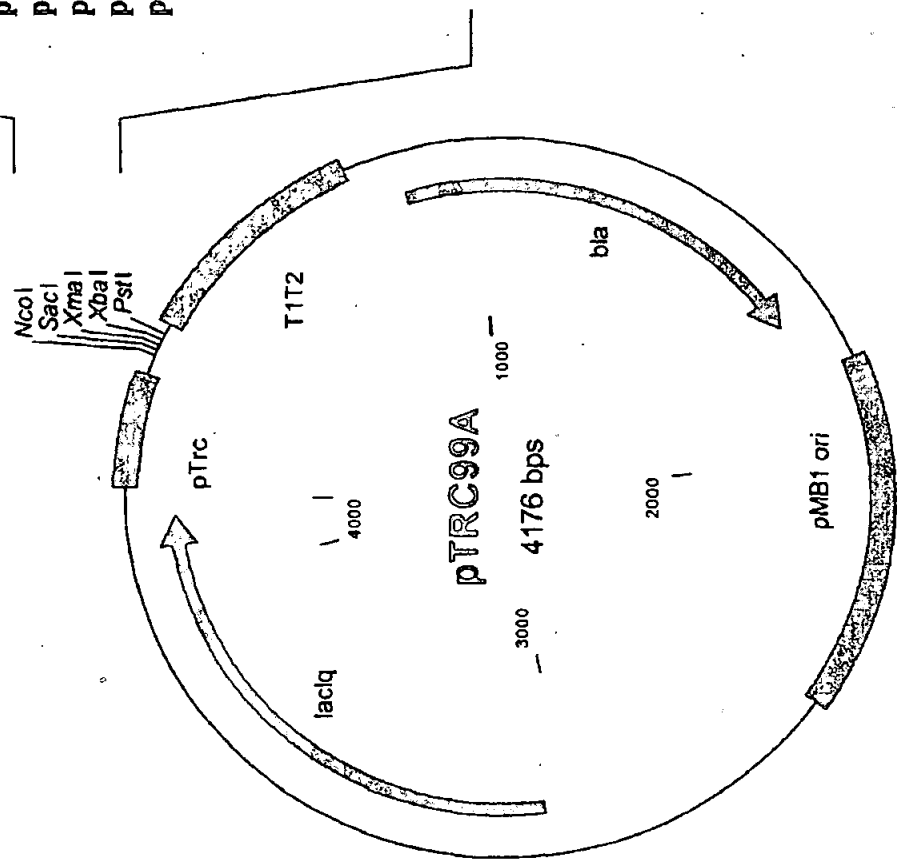


Fig 7

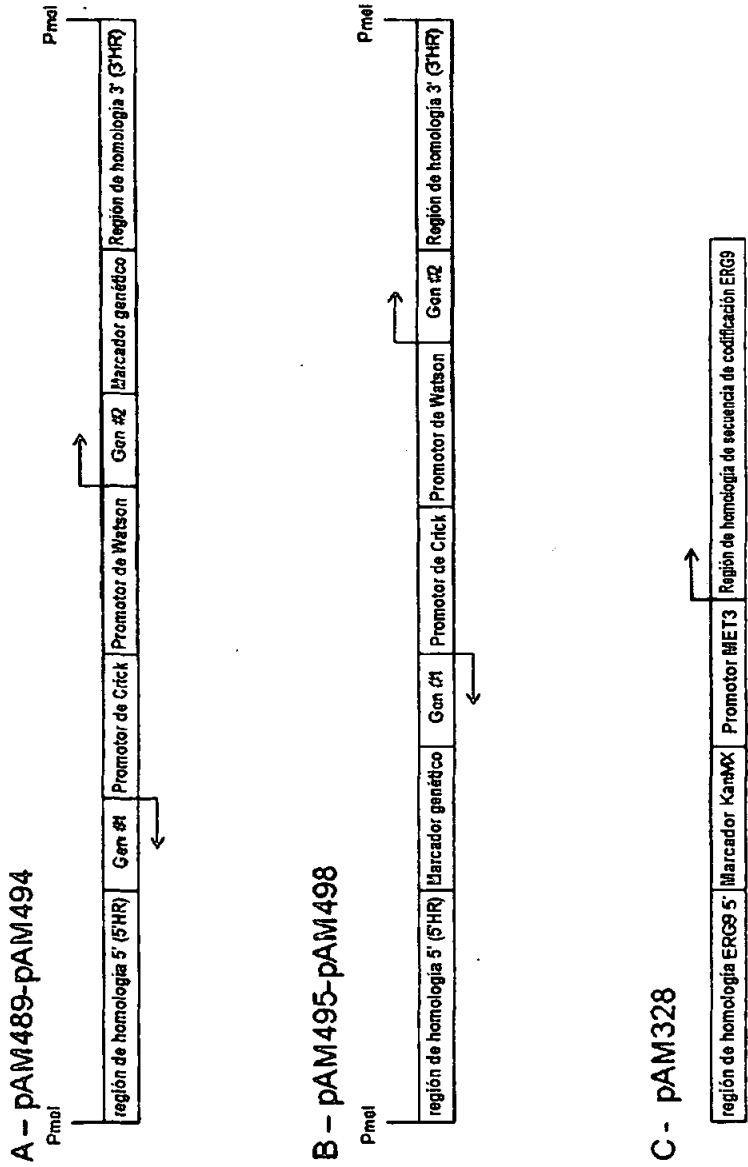


Fig 8

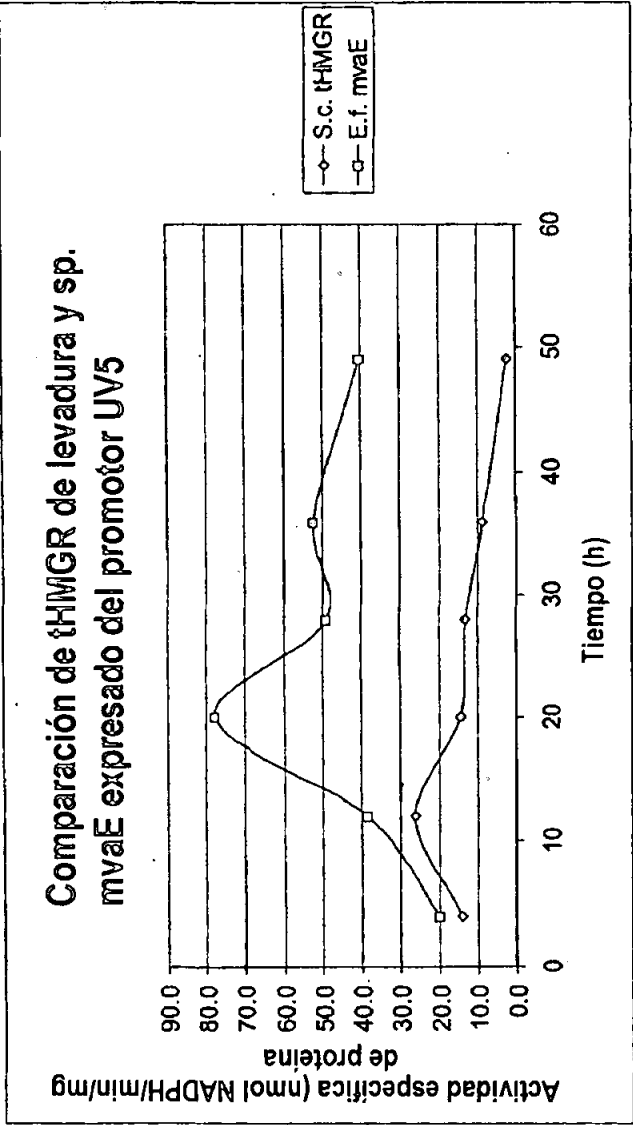


Fig 9

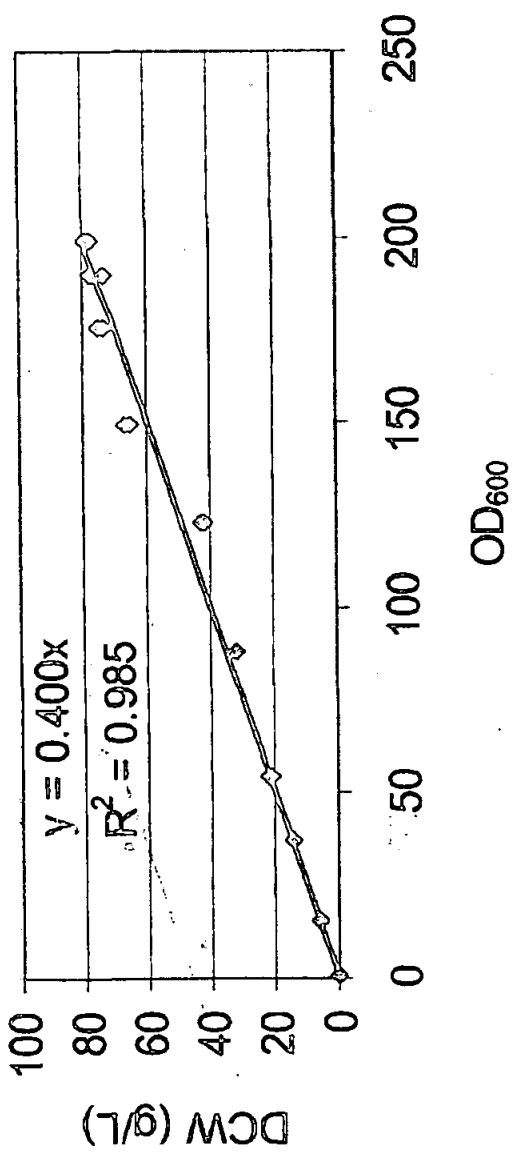


Fig 10A-B

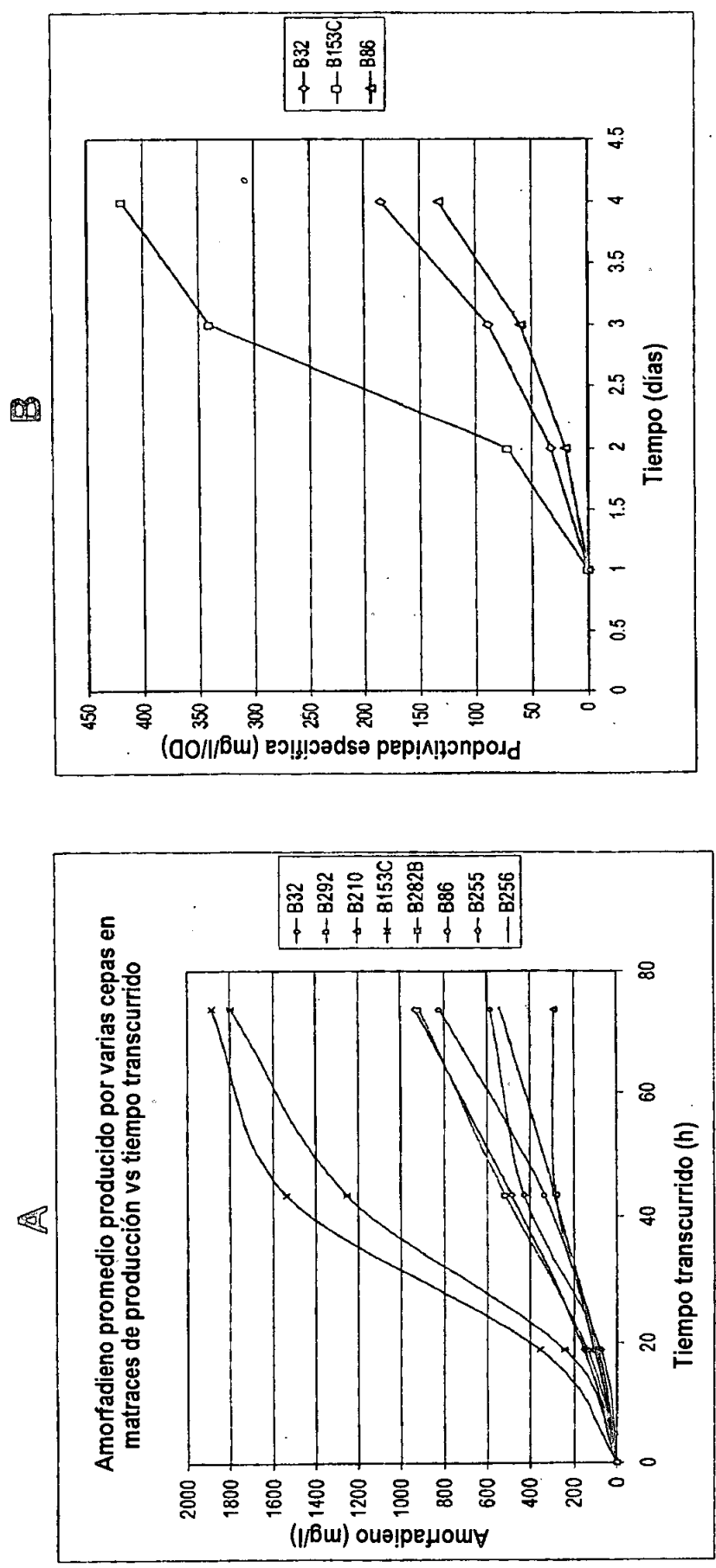
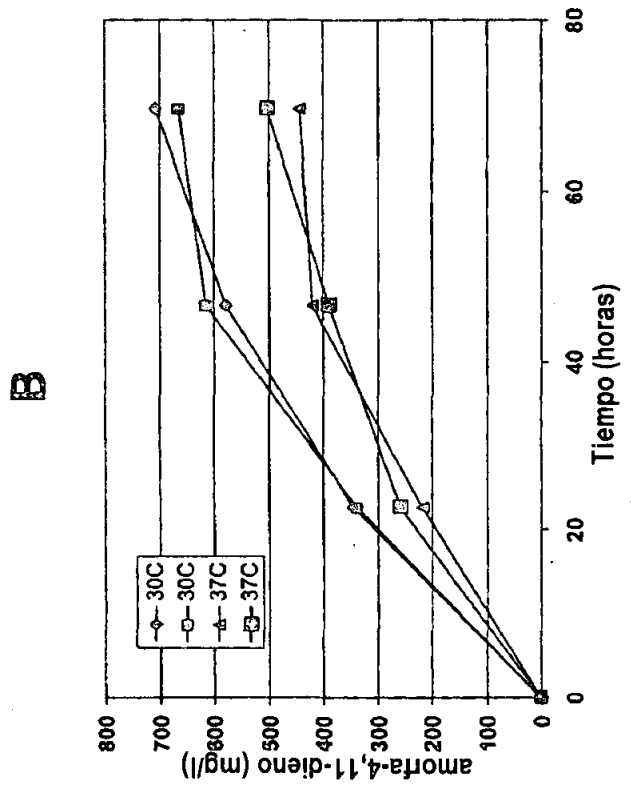
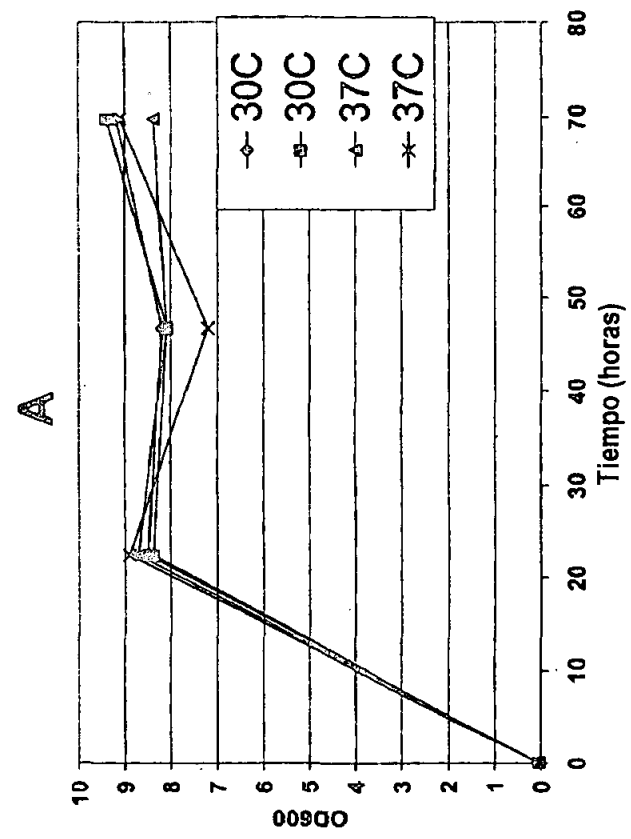


Fig 11A-B



12/20

Fig 12A-B

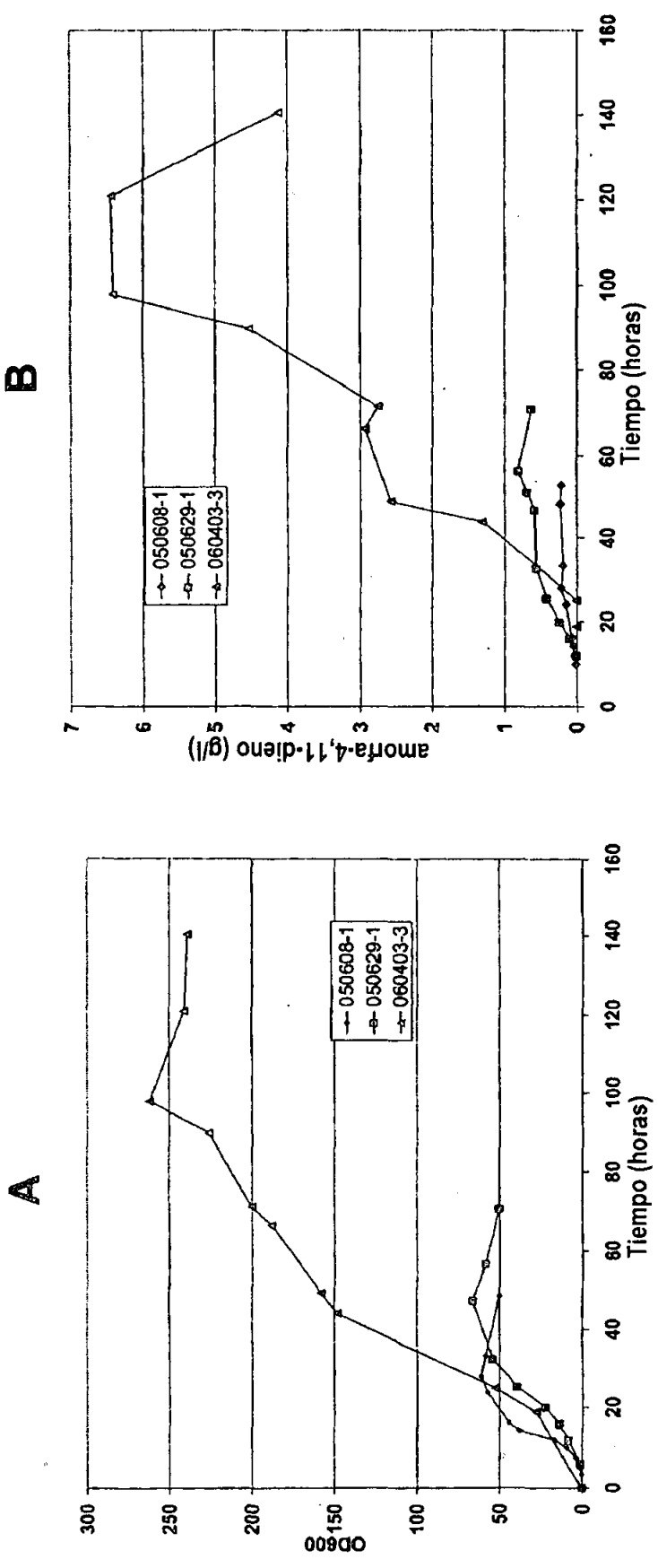


Fig 12C-D

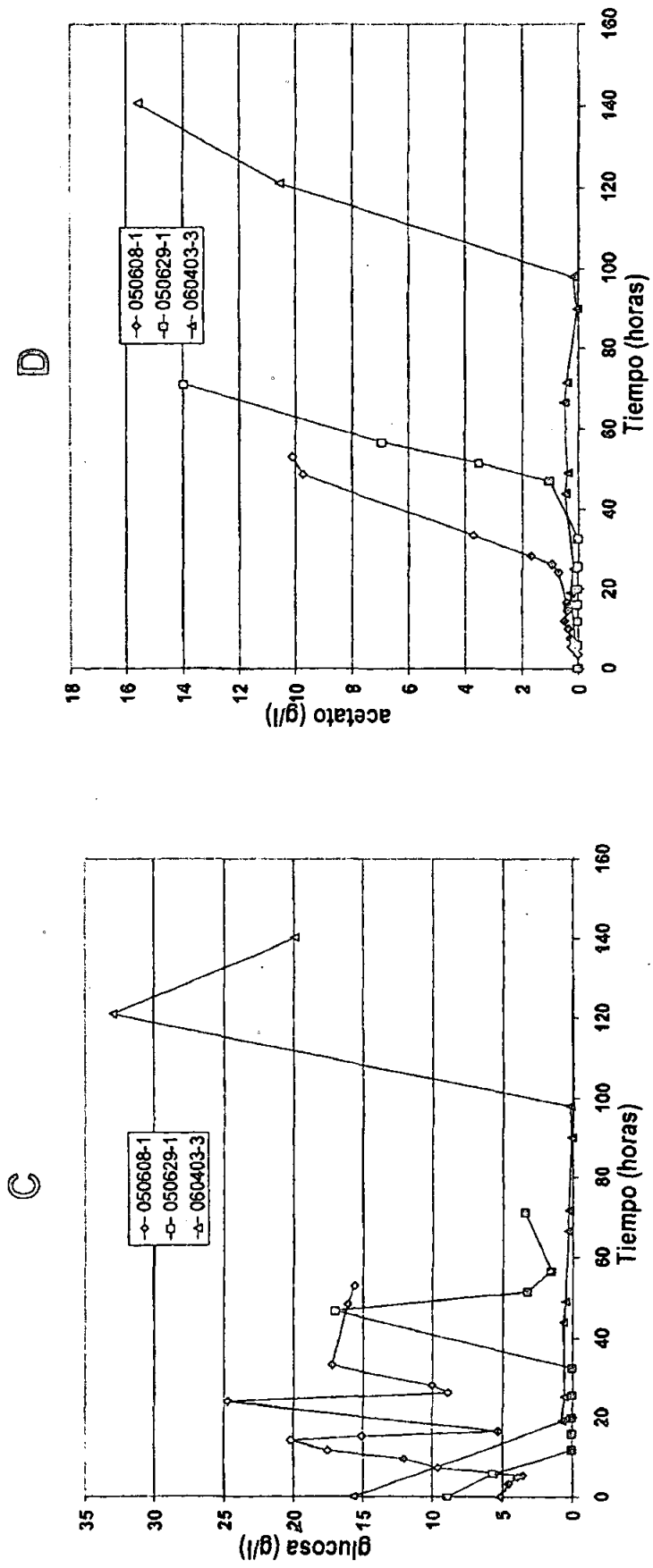


Fig 13A-B

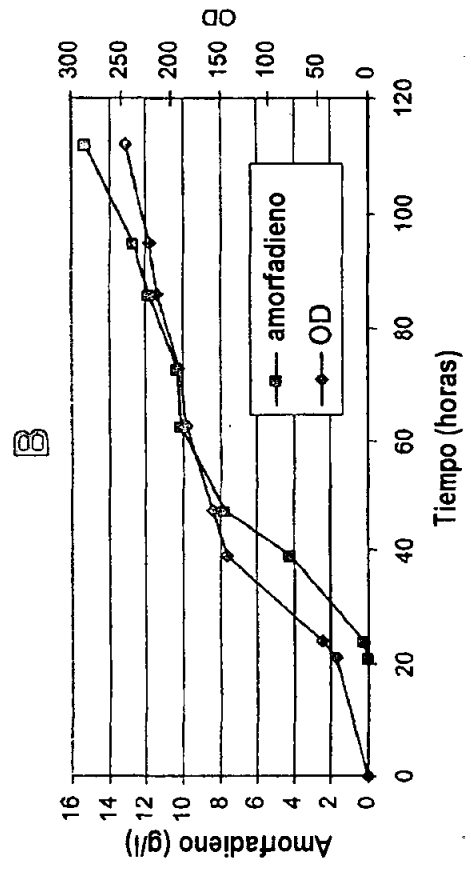
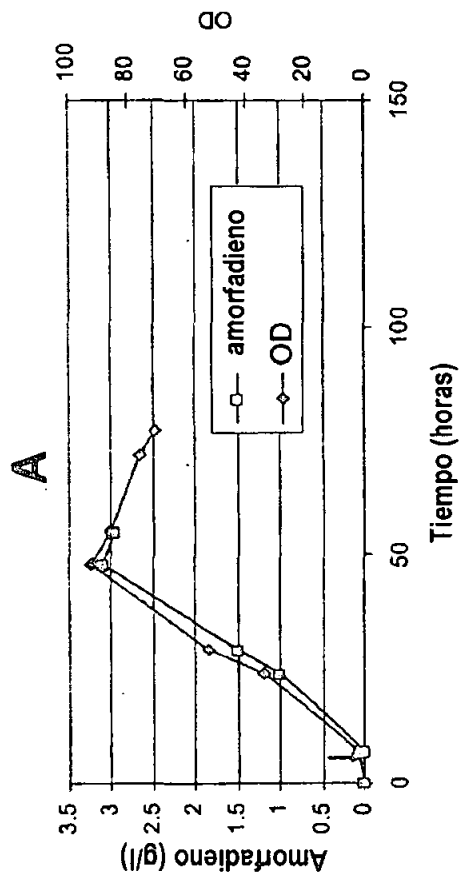


Fig 14A-B

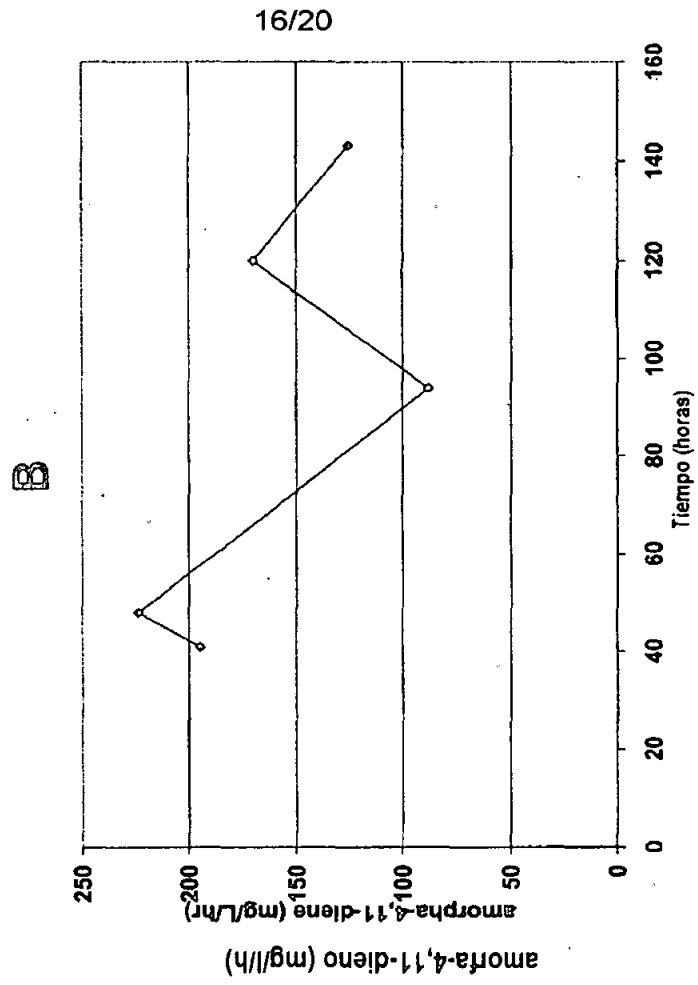
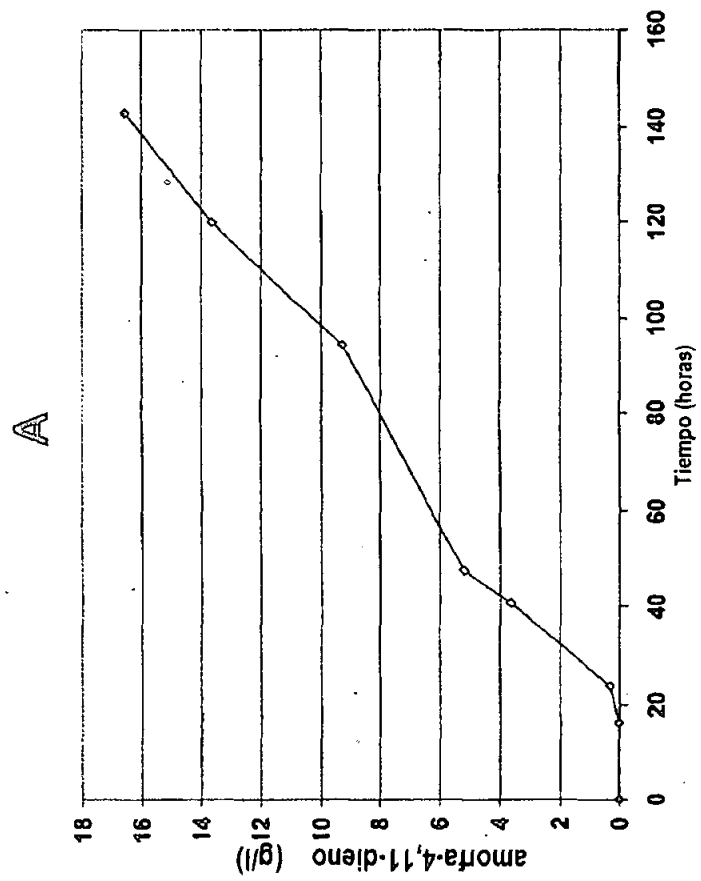
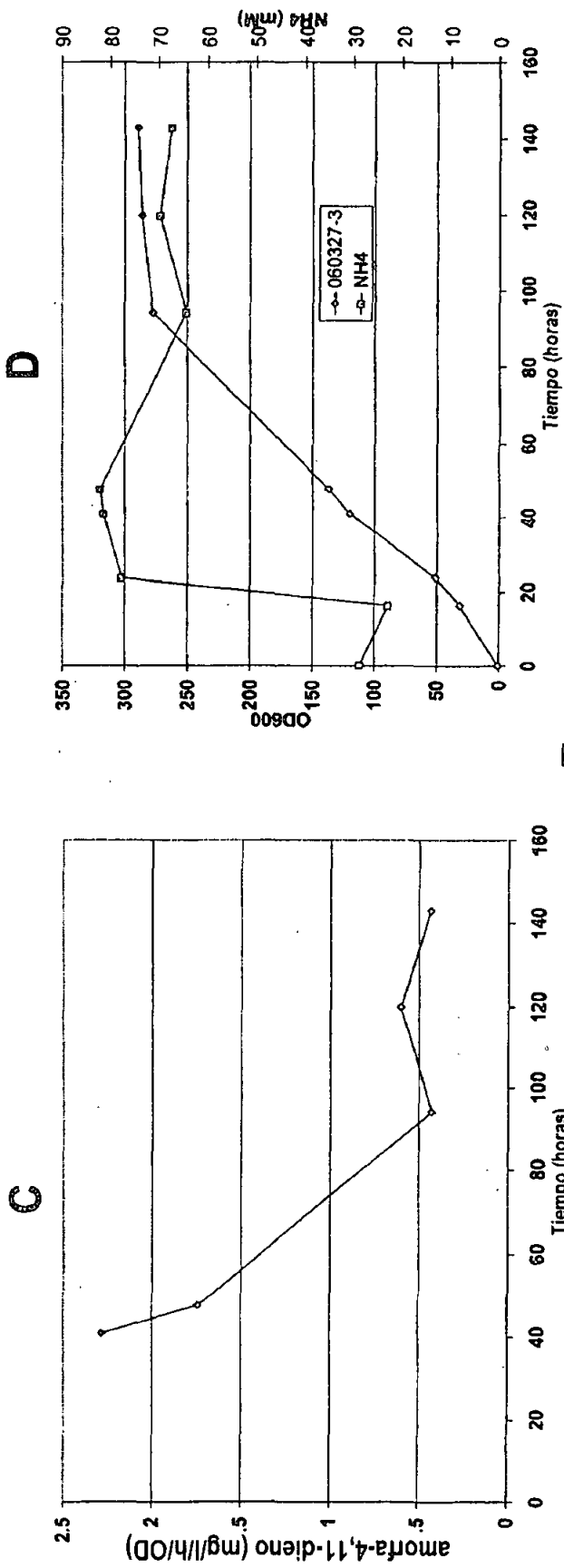


Fig 14C-E



E

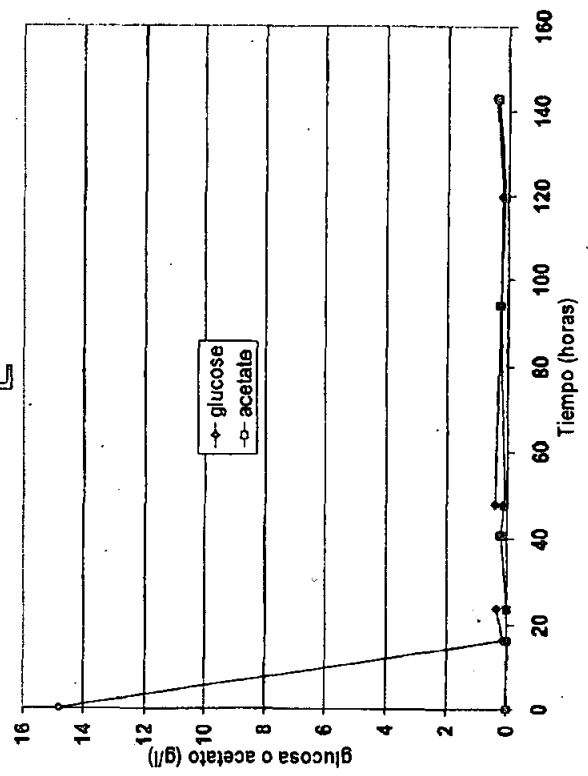


Fig 15A-B

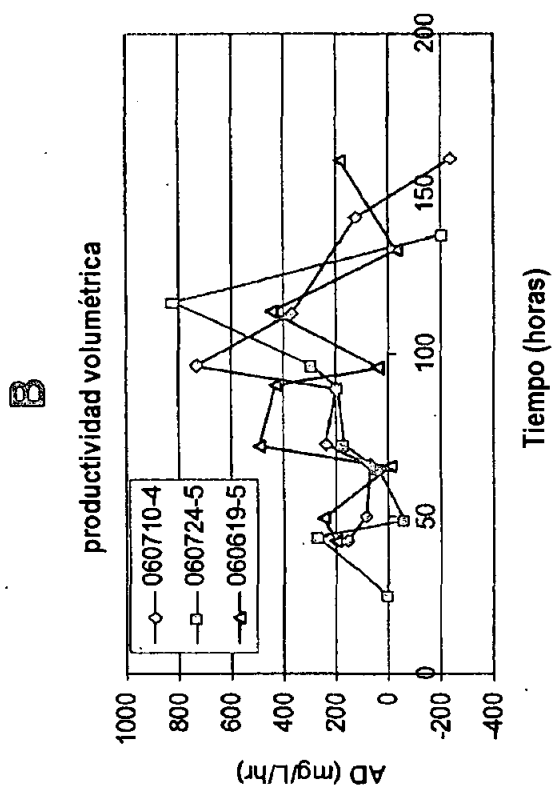
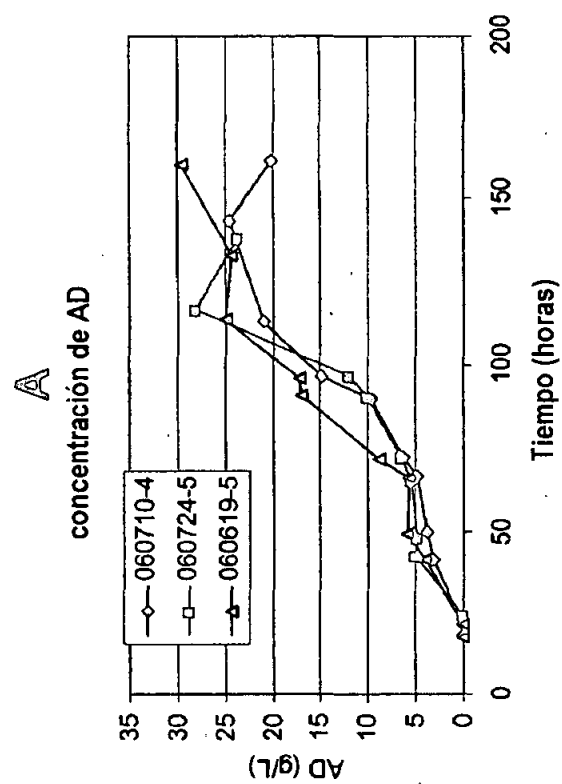
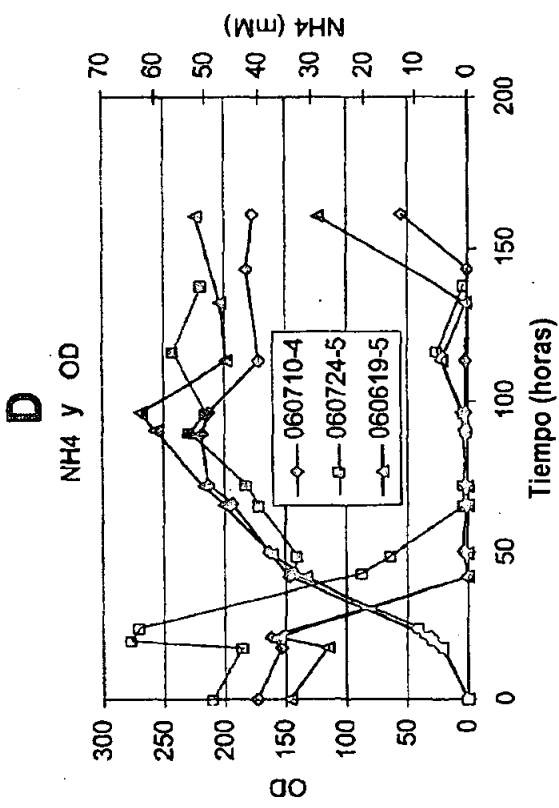
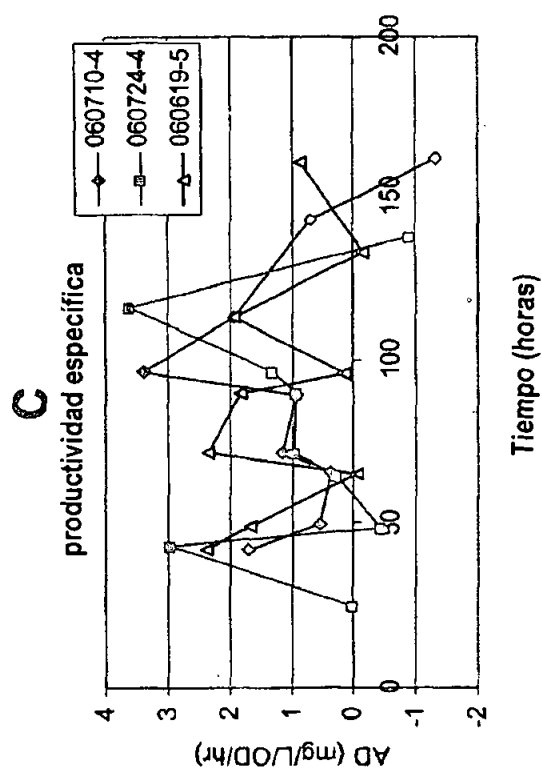


Fig 15C-E



E

Acetato y glucosa

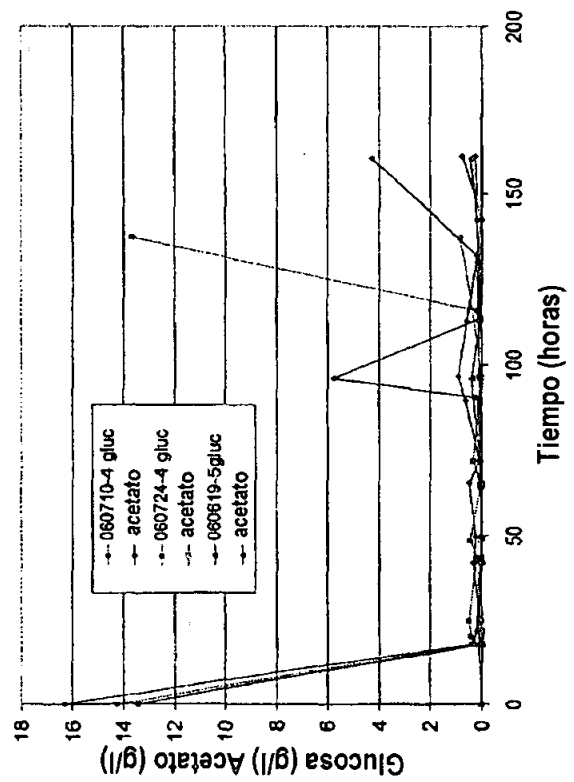
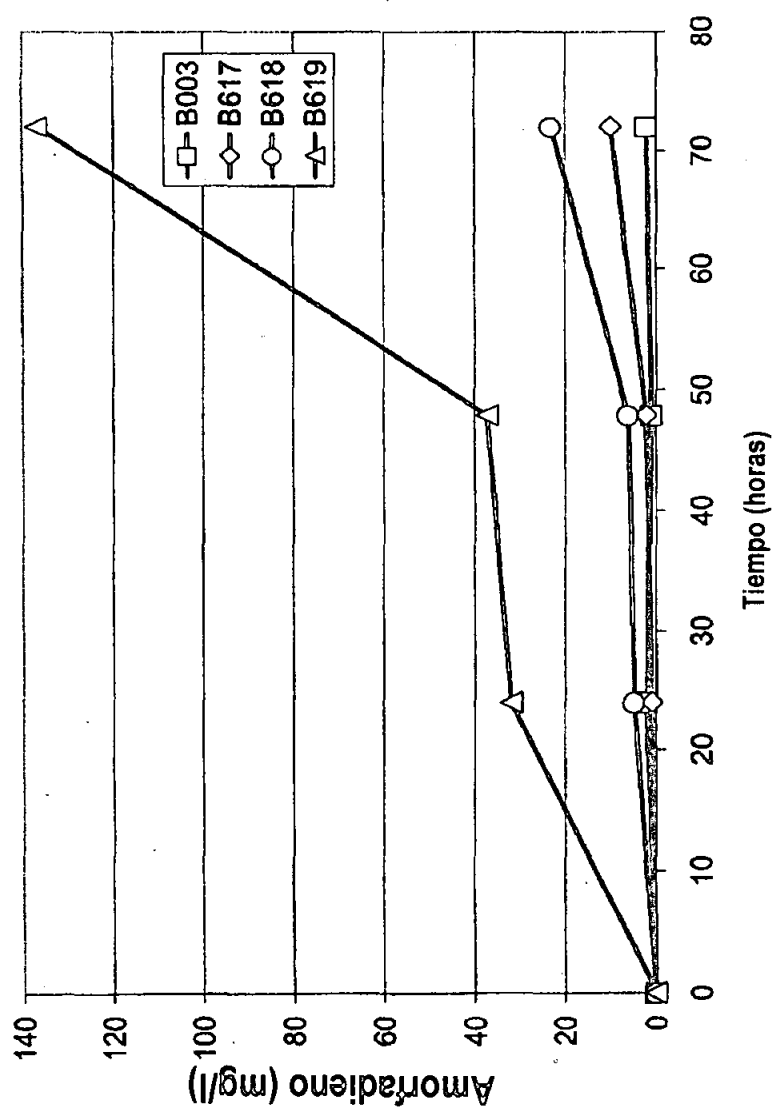


Fig 16



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

PATENTE DE INVENCION ☐ PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD ☐ DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(21) N° de solicitud:

(22) Fecha de solicitud: 25 DE NOVIEMBRE DE 2008

(51) Clasificación Internacional:

(71) Solicitante(s) **AMYRIS BIOTECHNOLOGIES, INC.**

(72) Inventor(es) **Neil Stephen RENNINGER; Jack NEWMAN; Keith Kinhead REILING; Rika REGENTIN y Christopher John PADDON**

(74) Agente: **HUMBERTO RUBIO CAMACHO**

(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
ESTADOUNIDENSE	60/808,989	26/05/2006	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
ESTADOUNIDENSE	60/870,592	18/12/2006	ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

(85) Fecha inicio fase nacional:

(87) Publicación internacional

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha: **06/12/2007**

Fecha de presentación de la solicitud: **25/05/2007**

N° publicación: **WO 2007/140339**

No. de solicitud: **PCT/US2007/069807**

(54) Título: **PRODUCCIÓN DE ISOPRENOIDES**

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO TEMATICO

PATENTE DE INVENCION ☐ PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD ☐ DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(1) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud: **25 DE NOVIEMBRE DE 2008**

(31) Clasificación Internacional:

(71) Solicitante(s) **AMYRIS BIOTECHNOLOGIES, INC.**

(72) Inventor(es) **Neil Stephen RENNINGER; Jack NEWMAN; Keith Kinkead REILING; Rika REGENTIN y Christopher John PADDON**

(74) Agente: **HUMBERTO RUBIO CAMACHO**

(30) Prioridad	(31)	No. Prioridad	(32)	Fecha	(33)	País
ESTADOUNIDENSE		60/808,989		26/05/2006		ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
ESTADOUNIDENSE		60/870,592		18/12/2006		ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

(85) Fecha inicio fase nacional:

(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT

Fecha de presentación de la solicitud: **25/05/2007**

No. de solicitud: **PCT/US2007/069807**

(87) Publicación internacional:

Fecha: **06/12/2007**

No. Publicación: **WO 2007/140339**

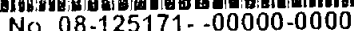
(54) Título: **PRODUCCIÓN DE ISOPRENOIDES**

(57) Resumen:

Un método para producir un isoprenoide, caracterizado porque comprende:

(a) obtener una pluralidad de células huésped que comprenden una ruta enzimática para elaborar isopentenil pirofosfato y en donde todas las enzimas de ruta están bajo el control de un regulador transcripcional heterólogo y (b) cultivar las células huésped en un medio, bajo condiciones que son sub-óptimas en comparaciones con las condiciones que proporcionarían una velocidad de crecimiento específica máxima para las células huésped.

731



mercio
NENCIA

PATENTE DE INVENCION

[3]

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ◆ Descripción de la invención
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas

[✓]
[✓]
[✓]
[✓]
[]

INCOMPLETA []

◆	Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	[]
◆	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	[]
◆	Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño	[]
◆	Comprobante de pago de las tasas establecidas	[]

[	]
[	]
[	]
[	]

INCOMPLETA []

◆	Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado	[]
◆	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud	[]
◆	Representación gráfica del esquema trazado	[]
◆	Comprobante de pago de las tasas establecidas	[]

[]
[]
[]
[]

INCOMPLETA []

Ganda. Pont. 2602
Firma Responsable

Fecha 15/6 25-08

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
 Conmutador: 3 82 08 40
 Fax: 350 52 20
 E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
 Bogotá, D.C., Colombia

232

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
RUBIO CAMACHO HUMBERTO

REFERENCIA	Radicación No.	8 125171
	Solicitud internacional	PCT/US2007/069807
	Fecha inicio fase nacional	26/12/2008
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	0583

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

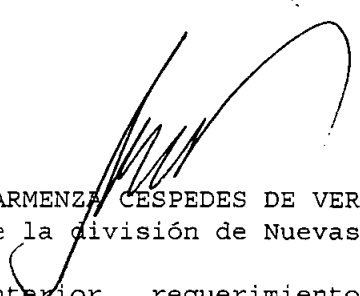
Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

Continúa en la página siguiente...

233

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación No.: 8 125171



ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 23 ENE. 2009
jfernand