

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 282**

51 Int. Cl.:

C12N 1/15 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 9/00 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
C12N 9/88 (2006.01)
C12P 7/22 (2006.01)
C12P 7/42 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.02.2006 E 06708430 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2012 EP 1856251**

54 Título: **Células modificadas mediante ingeniería genética desde el punto de vista metabólico para la producción de resveratrol o un derivado del mismo oligomérico o con unión glucosídica**

30 Prioridad:

22.02.2005 GB 0503657

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

06.03.2013

73 Titular/es:

**Evolva SA (100.0%)
Duggingerstrasse 23
4153 Reinach, CH**

72 Inventor/es:

**KATZ, MICHAEL;
SMITS, HANS PETER;
FÖRSTER, JOCHEN y
NIELSEN, JENS BREDAL**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 397 282 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Células modificadas mediante ingeniería genética desde el punto de vista metabólico para la producción de resveratrol o un derivado del mismo oligomérico o con unión glucosídica

Campo de la Invención

- 5 Esta invención se refiere en general a la producción del polifenol resveratrol o un derivado oligomérico o con unión glicosídica del mismo, tal como su R-glucósido piceído, mediante el uso de células microbianas. Además, se describen microorganismos naturales o recombinantes que producen resveratrol o dicho derivado para la producción de alimentos, piensos y bebidas.

Antecedentes de la Invención

- 10 La producción de productos químicos a partir de microorganismos ha sido una aplicación importante de la biotecnología. En general, las etapas en el desarrollo de tal método de bio-producción pueden incluir 1) la selección de un microorganismo hospedador adecuado, 2) la eliminación de las rutas metabólicas que conducen a subproductos, 3) la desregulación de rutas deseadas tanto a nivel de la actividad enzimática como a nivel transcripcional, y 4) la sobreexpresión de las enzimas adecuadas en las rutas deseadas. En un aspecto preferido, la presente invención ha empleado combinaciones de las etapas anteriores para redirigir el flujo de carbono desde fenilalanina o tirosina por medio de enzimas de la ruta fenilpropanoide vegetal que suministra el precursor necesario para la biosíntesis deseada de resveratrol.

El resveratrol (o 3,4,5-trihidroxiestilbeno) es un fitofenol que pertenece al grupo de estilbeno fitoalexinas, que son metabolitos secundarios de masa molecular baja que constituyen el mecanismo de defensa activa en plantas en respuesta a infecciones u otros sucesos relacionados con agresiones. Las estilbeno fitoalexinas contienen el esqueleto de estilbeno (trans-1,2-difeniletileno) como estructura básica común: también se puede complementar mediante la adición de otros grupos (Hart y Shrimpton, 1979, Hart, 1981). Los estilbenos se han hallado en ciertos árboles (angiospermas, gimnospermas), pero también en ciertas plantas herbáceas (en especies de las familias *Myrtaceae*, *Vitaceae* y *Leguminosae*). Dichos compuestos son tóxicos para las plagas, en especial para hongos, bacterias e insectos. Solamente unas cuantas plantas tienen la capacidad de sintetizar estilbenos, o de producirlos en una cantidad que les proporciona una resistencia suficiente hacia las plagas.

La síntesis del esqueleto de estilbeno básico es llevada a cabo por las estilbeno sintasas. Hasta ahora, se han designado dos enzimas como estilbeno sintasas; la pinosilvina sintasa y la resveratrol sintasa. Hasta la fecha, la resveratrol sintasa de cacahuete (*Arachis hypogaea*) se ha caracterizado con más detalle, de forma que se conocen la mayoría de las propiedades (Schoppner y Kindl, 1984). Los sustratos que usan las estilbeno sintasas son malonil-CoA, cinamoil-CoA o cumaroil-CoA. Estas sustancias se dan en todas las plantas, debido a que se usan en la biosíntesis de otros constituyentes vegetales importantes, así como flavonoides, pigmentos florales y lípidos.

El resveratrol (Fig. 1, forma trans) consiste en dos anillos de fenol conectados a poca distancia, y por lo tanto pertenece a los polifenoles. Aunque está presente en otras plantas, tales como eucalipto, picea, y lirio, y en otros alimentos tales como moras y cacahuetes, las fuentes naturales más abundantes de resveratrol son las uvas de *Vitis vinifera*, *-labrusca*, y *-muscadine (rotundifolia)*, que se usan para producir vinos. El compuesto se da en las vides, raíces, semillas, y tallos, pero su concentración más alta está en la piel (Celotti *et al.*, 1996), que contiene 50-100 µg/g. (Jang *et al.* 1997). Durante la vinificación del vino tinto, las pieles de las uvas se incluyen en el mosto, en contraste con la vinificación del vino blanco, y por lo tanto el resveratrol se halla en pequeñas cantidades solamente en el vino tinto. El resveratrol se ha reconocido, además de por sus propiedades antifúngicas, por sus actividades cardioprotectoras y quimiopreventivas del cáncer; actúa como un fitoestrógeno, un inhibidor de la agregación plaquetaria (Kopp *et al.*, 1998; Gehm *et al.* 1997; Lobo *et al.* 1995), y un antioxidante (Jang *et al.*, 1997; Huang 1997). Estas propiedades explican la denominada paradoja francesa, es decir, los franceses que beben vino tienen una incidencia baja de cardiopatía coronaria a pesar de una dieta elevada en grasas y poco ejercicio. Recientemente se ha demostrado que el resveratrol puede activar también el gen SIR2 en levadura, y el gen humano análogo SIRT1, que desempeñan un papel clave en prolongar la vida. Desde entonces se ha centrado la atención en gran medida en las propiedades de prolongación de la vida de resveratrol (Hall, 2003, Couzin, 2004).

Las asociaciones sanitarias americanas, tales como la Life Extension Foundation, están promocionando los amplios efectos beneficiosos de este fármaco, y por lo tanto están impulsando las condiciones ideales para una comercialización favorable. Los procedimientos de producción actuales dependen en gran medida de la extracción de resveratrol, de la piel de las uvas o de plantas del género *Polygonum*. Este es un procedimiento muy laborioso y genera un rendimiento bajo que, por tanto, da lugar a un estímulo para el desarrollo de procesos de producción nuevos, más eficaces y de alto rendimiento.

En las plantas, la ruta fenilpropanoide es responsable de la síntesis de una amplia diversidad de compuestos metabólicos secundarios, que incluyen ligninas, salicilatos, cumarinas, amidas hidroxicinámicas, pigmentos, flavonoides y fitoalexinas. De hecho, la formación de resveratrol en las plantas se desarrolla por medio de la ruta fenilpropanoide. El aminoácido L-fenilalanina se convierte en ácido *trans*-cinámico por medio de la desaminación no-oxidativa mediante la L-fenilalanina amoniaco liasa (PAL) (Fig. 2). A continuación, el ácido *trans*-cinámico se

hidroxila en la posición para hasta ácido 4-cumárico (ácido 4-hidroxicinámico) mediante la cinamato-4-hidroxilasa (C4H), una enzima citocromo P450 monooxigenasa, junto con la NADPH:citocromo P450 reductasa (CPR). El ácido 4-cumárico se activa posteriormente hasta 4-cumaroil-CoA mediante la acción de la 4-cumarato-CoA ligasa (4CL). Finalmente, la resveratrol sintasa (VST) cataliza la condensación de una unidad de fenilpropano de 4-cumaroil-CoA con malonil CoA, lo que da como resultado la formación de resveratrol.

Recientemente, se describió una levadura que podía producir resveratrol a partir de ácido 4-cumárico que se halla en pequeñas cantidades en el mosto de la uva (Becker *et al.* 2003). La producción de 4-cumaroil-CoA, y el resveratrol concomitante, en las cepas de laboratorio de *S. cerevisiae*, se consiguió mediante la co-expresión de un gen heterólogo de coenzima-A ligasa, de álamo híbrido, junto con el gen de resveratrol sintasa de vid (*vstI*). El otro sustrato para la resveratrol sintasa, malonil-CoA, ya se produce de forma endógena en levadura y está implicado en la biosíntesis *de novo* de ácidos grasos. El estudio demostró que las células de *S. cerevisiae* podrían producir cantidades diminutas de resveratrol, en forma libre o en la forma con unión de glucósido, cuando se cultivan en un medio sintético que se complementó con ácido 4-cumárico.

Sin embargo, dicha levadura no sería adecuada para una aplicación comercial, ya que tiene un bajo rendimiento de resveratrol, y requiere la adición de ácido 4-cumárico, que está presente solamente en unos pocos medios industriales. Para facilitar y ampliar la aplicación de resveratrol como producto farmacéutico y nutracéutico, es por tanto sumamente deseable obtener una levadura que pueda producir resveratrol directamente a partir de glucosa, sin la adición de ácido 4-cumárico.

Un estudio reciente (Ro y Douglas, 2004) describe la reconstitución del punto de entrada de la ruta fenilpropanoide en *S. cerevisiae* mediante la introducción de PAL, C4H y CPR de álamo. El propósito fue determinar si los complejos multienzimáticos (MECs) que contienen PAL y C4H son funcionalmente importantes en este punto de entrada en el metabolismo fenilpropanoide. Alimentando a la levadura recombinante con [3H]-fenilalanina, se descubrió que la mayoría de la [3H]-fenilalanina metabolizada se incorporó en el ácido 4-[3H]-cumárico, y que el metabolismo de la fenilalanina se redujo en gran medida inhibiendo la actividad de C4H. Además, las levaduras que expresaron solamente PAL metabolizaron muy poca fenilalanina hasta ácido cinámico. Cuando se alimenta [3H]-fenilalanina y ácido [14C]-*trans*-cinámico de manera simultánea a las levaduras que expresaron los tres, no se descubrió ninguna prueba de la canalización del ácido [3H]-*trans*-cinámico sintetizado de forma endógena hasta ácido 4-cumárico. Por lo tanto, el flujo de carbono eficaz desde fenilalanina hasta ácido 4-cumárico por medio de reacciones catalizadas mediante PAL y C4H no parece requerir la canalización por medio de un MEC en levadura, y el puro acoplamiento bioquímico de PAL y C4H parece ser suficiente para controlar el flujo de carbono hasta la ruta fenilpropanoide. En otro estudio (Hwang *et al.*, 2003) se llevó a cabo la producción de flavanonas específicas de plantas mediante *Escherichia coli* por medio de la expresión de un agrupamiento de genes artificial que contuvo tres genes de una ruta fenil propanoide de diversos orígenes heterólogos; PAL de la levadura *Rhodotorula rubra*, 4CL del actinomiceto *Streptomyces coelicolor*, y calcona sintasa (CHS) de la planta de regaliz *Glycyrrhiza echinata*. Estas rutas evitaron C4H, debido a que la enzima 4CL bacteriana ligó coenzima A tanto a ácido *trans*-cinámico como a ácido 4-cumárico. Además, la PAL de *Rhodotorula rubra* usa tanto fenilalanina como tirosina como sustratos. Por lo tanto, las células de *E. coli* que contenían los agrupamientos de genes y que se cultivaron con glucosa, produjeron cantidades pequeñas de dos flavanonas, pinocembrina (0,29 g/l) a partir de fenilalanina y naringenina (0,17 g/l) a partir de tirosina. Además, se acumularon grandes cantidades de sus precursores, ácido 4-cumárico y ácido *trans*-cinámico (0,47 y 1,23 mg/litro respectivamente). Además, los rendimientos de estos compuestos se pudieron incrementar mediante la adición de fenilalanina y tirosina.

Mientras la enzima de plantas dicotiledóneas utiliza solamente fenilalanina eficazmente, varios estudios indican que PAL de las plantas monocotiledóneas, y ciertos microorganismos, utiliza también tirosina (Rösler *et al.*, 1997). En tales reacciones, la actividad enzimática se denomina tirosina amoniaco liasa (TAL, figura 3). La conversión de tirosina mediante TAL da como resultado la formación directa de ácido 4-cumárico sin la intermediación de C4H y CPR. En su mayor parte, ambas actividades residen en el mismo polipéptido y tienen eficacias catalíticas muy similares, a pesar de grandes diferencias en Km y número de recambio. Sin embargo, la mayoría de las enzimas PAL/TAL de plantas prefieren fenilalanina en vez de tirosina. El nivel de actividad TAL es en su mayor parte inferior que la actividad PAL, pero la magnitud de esta diferencia varía a lo largo de un amplio intervalo. Por ejemplo, la enzima de perejil tiene una Km para fenilalanina de 15-25 μM y para tirosina 2,0-8,0 mM, con números de recambio 22 s^{-1} y 0,3 s^{-1} , respectivamente. En contraste, la enzima de maíz tiene una Km para fenilalanina solamente 15 veces mayor que para tirosina, y números de recambio alrededor de 10 veces mayores. Además, en las levaduras rojas, *Rhodotorula glutinis* (*Rhodosporidium toruloides*) y *-rubra*, la actividad catalítica TAL es cercana a la actividad catalítica PAL, con una proporción de TAL/PAL de aproximadamente 0,58. Se cree que la enzima PAL de estas levaduras degrada la fenilalanina como una función catabólica, y el ácido *trans*-cinámico formado se convierte en benzoato y otros materiales celulares, mientras en las plantas se cree que es simplemente una enzima reguladora en la biosíntesis de lignina, isoflavonoides y otros fenilpropanoides.

Recientemente, se descubrió un marco de lectura abierto en la bacteria *Rhodobacter capsulatus* que codifica una tirosina amoniaco liasa (TAL) biosintética hipotética que está implicada en la biosíntesis del cromóforo de la proteína amarilla fotoactiva (Kyndt *et al.*, 2002). Esta fue la primera vez que se descubrió un gen homólogo a PAL en bacterias. El gen TAL se aisló y se produjo en gran cantidad en *Escherichia coli*. Los valores de Km y *kcat* para la conversión de tirosina en ácido 4-cumárico fueron 15,6 μM y 27,7 s^{-1} respectivamente, y para la conversión de L-

fenilalanina en ácido *trans*-cinámico fueron 1277 μM y 15,1 s^{-1} , respectivamente. Como consecuencia de la K_m más pequeña y una k_{cat} ligeramente más grande, la enzima muestra una preferencia intensa por la tirosina sobre la L-fenilalanina, con una eficacia catalítica (K_m/k_{cat}) por la tirosina aproximadamente 150 veces mayor que por la fenilalanina. Los estudios cinéticos establecieron que la tirosina, y no la L-fenilalanina, es el sustrato natural de la enzima en condiciones fisiológicas. Muy recientemente, un estudio describió la coexpresión heteróloga de fenilalanina amoniaco liasa, cinamato-4-hidroxilasa, 4-cumarato-CoA-ligasa y calcona sintasa, para la producción de flavonoides en *E. coli* (Watts *et al.*, 2004). La expresión simultánea de los cuatro genes, sin embargo, no fue eficaz debido a una cinamato-4-hidroxilasa no funcional. La sustitución de la fenilalanina amoniaco liasa y cinamato-4-hidroxilasa por una nueva tirosina amoniaco liasa que se clonó a partir de *Rhodobacter sphaeroides*, pudo resolver, sin embargo, el problema y condujo a la producción de nivel elevado de la flavonona naringenina. Además, dicha tirosina amoniaco liasa de *Rhodobacter sphaeroides* se usa también para la producción heteróloga de ácido 4-cumárico (es decir, ácido para-hidroxicinámico) en *Escherichia coli* (documento US-A-2004059103). Además, se describen métodos adicionales para el desarrollo de un biocatalizador para la conversión de glucosa en ácido 4-cumárico. El documento US-A-2004023357 describe una tirosina amoniaco liasa de la levadura *Trichosporon cutaneum* para la producción de ácido cumárico en *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*. El documento US-A-2001053847 describe la incorporación de PAL de tipo natural de la levadura *Rhodotorula glutinis* en *E. coli*, subrayando la capacidad de la PAL de tipo natural de convertir la tirosina directamente en ácido 4-cumárico. Además, también se ejemplifica la incorporación de PAL de tipo natural de la levadura *Rhodotorula glutinis*, más una C4H y CPR vegetal en *E. coli* y *S. cerevisiae*. También se describe el desarrollo de un biocatalizador por medio de la mutagénesis de la PAL de la levadura de tipo natural *Rhodotorula glutinis* con actividad TAL aumentada (documento US-A-6521748). Ninguna de las patentes anteriormente mencionadas reivindica la incorporación de 4CL y VST para la producción de resveratrol.

Recientemente, se han mostrado pruebas de que los hongos filamentosos *A. oryzae* contienen la enzima calcona sintasa (CHS) que está implicada normalmente en la biosíntesis de flavonoides, tales como naringenina, en plantas (Seshime *et al.*, 2005). De hecho, también se demostró que *A. oryzae* contenía el grupo principal de genes responsables del metabolismo fenilpropanoide-flavonoide, es decir, PAL, C4H y 4CL. Sin embargo, no hay pruebas de que *A. oryzae* contenga una estilbeno sintasa, tal como la resveratrol sintasa.

La presente invención proporciona ahora un microorganismo que produce resveratrol, y dicho microorganismo tiene una ruta metabólica operativa que produce ácido 4-cumárico y produce resveratrol a partir suyo, o un derivado oligomérico o con unión glicosídica del mismo, en cuya ruta se produce ácido 4-cumárico a partir de L-fenilalanina por la acción de una L-fenilalanina amoniaco liasa y una cinamato 4-hidroxilasa expresadas en dicho microorganismo, o a partir de tirosina por la acción de una L-fenilalanina amoniaco liasa o a partir de una tirosina amoniaco liasa expresadas en dicho microorganismo, se forma 4-cumaroil-CoA a partir de dicho ácido cumárico en una reacción catalizada por una 4-cumarato-CoA ligasa expresada en dicho microorganismo, y se produce resveratrol a partir de dicho 4-cumaroil-CoA en una reacción en la que el malonil-CoA endógeno es un sustrato mediante una resveratrol sintasa expresada en dicho microorganismo. Un microorganismo descrito en la presente memoria se puede dar de manera natural, y se puede aislar mediante procedimientos de cribado adecuados, pero más preferiblemente se modifica mediante ingeniería genética.

Dicho resveratrol se produce preferiblemente a partir de 4-cumaroil-CoA mediante una resveratrol sintasa que se expresa preferiblemente en dicho microorganismo a partir de un ácido nucleico que codifica dicha enzima que no es nativa en el microorganismo.

En general en la presente memoria, a menos que el contexto implique lo contrario, las referencias a resveratrol incluyen la referencia a los derivados oligoméricos o con unión glicosídica del mismo, que incluyen en particular piceido.

Así, en ciertas realizaciones preferidas, dicha resveratrol sintasa es una resveratrol sintasa (EC 2.3.1.95) de una planta que pertenece al género *Arachis*, p.ej. *A. glabata*, *A. hypogaea*, una planta que pertenece al género *Rheum*, p.ej. *R. tataricum*, una planta que pertenece al género *Vitis*, p.ej. *V. labrusca*, *V. riparia*, *V. vinifera*, o cualquiera de los géneros *Pinus*, *Picea*, *Lilium*, *Eucalyptus*, *Parthenocissus*, *Cissus*, *Calochortus*, *Polygonum*, *Gnetum*, *Artocarpus*, *Nothofagus*, *Phoenix*, *Festuca*, *Carex*, *Veratrum*, *Bauhinia* o *Pterolobium*.

Según la invención, una opción es que en dicha ruta se produzca ácido 4-cumárico a partir de L-fenilalanina por la acción de una L-fenilalanina amoniaco liasa y una cinamato 4-hidroxilasa expresadas en dicho microorganismo. Así, dicho ácido 4-cumárico se produce a partir de ácido *trans*-cinámico, mediante una enzima en una reacción catalizada por dicha enzima en la que el oxígeno es un sustrato, NADH o NADPH es un cofactor y NAD^+ o NADP^+ es un producto.

Dicho ácido 4-cumárico se puede producir así a partir de ácido *trans*-cinámico mediante una cinamato 4-hidroxilasa, que se expresa preferiblemente en dicho microorganismo a partir de un ácido nucleico que codifica dicha enzima que no es nativa en el microorganismo.

En ciertas realizaciones preferidas, que incluyen las mencionadas en los párrafos anteriores, dicha cinamato-4-hidroxilasa es una cinamato-4-hidroxilasa (EC 1.14.13.11) de una planta o un microorganismo. La planta puede

5 pertenecer al género *Arabidopsis*, p.ej. *A. thaliana*, una planta que pertenece al género *Citrus*, p.ej. *C. sinensis*, *C. x paradisi*, una planta que pertenece al género *Phaseolus*, p.ej. *P. vulgaris*, una planta que pertenece al género *Pinus*, p.ej. *P. taeda*, una planta que pertenece al género *Populus*, p.ej. *P. deltoides*, *P. tremuloides*, *P. trichocarpa*, una planta que pertenece al género *Solanum*, p.ej. *S. tuberosum*, una planta que pertenece al género *Vitis*, p.ej. *Vitis vinifera*, una planta que pertenece al género *Zea*, p.ej. *Z. mays*, u otros géneros vegetales, p.ej. *Ammi*, *Avicennia*, *Camellia*, *Camptotheca*, *Catharanthus*, *Glycine*, *Helianthus*, *Lotus*, *Mesembryanthemum*, *Physcomitrella*, *Ruta*, *Saccharum*, *Vigna*. El microorganismo podría ser un hongo que pertenece al género *Aspergillus*, p.ej. *A. oryzae*.

10 De manera alternativa, dicho ácido 4-cumárico se produce a partir de tirosina mediante una L-fenilalanina amoniaco liasa o una tirosina amoniaco liasa, p.ej. tirosina amoniaco liasa (EC 4.3.1.5) de levadura o bacteria. Esta es una reacción en la que se produce amoniaco. De manera adecuada, la tirosina amoniaco liasa es de la levadura *Rhodotorula rubra* o de la bacteria *Rhodobacter capsulatus*.

Opcionalmente, dicha tirosina amoniaco liasa se expresa en dicho microorganismo a partir de un ácido nucleico que codifica dicha enzima que no es nativa en el microorganismo.

15 Se puede producir ácido *trans*-cinámico a partir de L-fenilalanina en una reacción en la que se produce amoniaco mediante una fenilalanina amoniaco liasa.

20 En ciertas realizaciones preferidas, dicha L-fenilalanina amoniaco liasa es una L-fenilalanina amoniaco liasa (EC 4.3.1.5) de una planta o de un microorganismo. La planta puede pertenecer al género *Arabidopsis*, p.ej. *A. thaliana*, una planta que pertenece al género *Brassica*, p.ej. *B. napus*, *B. rapa*, una planta que pertenece al género *Citrus*, p.ej. *C. reticulata*, *C. clementinus*, *C. limon*, una planta que pertenece al género *Phaseolus*, p.ej. *P. coccineus*, *P. vulgaris*, una planta que pertenece al género *Pinus*, p.ej. *P. banksiana*, *P. monticola*, *P. pinaster*, *P. sylvestris*, *P. taeda*, una planta que pertenece al género *Populus*, p.ej. *P. balsamifera*, *P. deltoides*, *P. Canadensis*, *P. kitakamiensis*, *P. tremuloides*, una planta que pertenece al género *Solanum*, p.ej. *S. tuberosum*, una planta que pertenece al género *Prunus*, p.ej. *P. avium*, *P. persica*, una planta que pertenece al género *Vitis*, p.ej. *Vitis vinifera*, una planta que pertenece al género *Zea*, p.ej. *Z. mays* u otros géneros vegetales, p.ej. *Agastache*, *Ananas*, *Asparagus*, *Bromheadia*, *Bambusa*, *Beta*, *Betula*, *Cucumis*, *Camellia*, *Capsicum*, *Cassia*, *Catharanthus*, *Cicer*, *Citrullus*, *Coffea*, *Cucurbita*, *Cynodon*, *Daucus*, *Dendrobium*, *Dianthus*, *Digitalis*, *Dioscorea*, *Eucalyptus*, *Gallus*, *Ginkgo*, *Glycine*, *Hordeum*, *Helianthus*, *Ipomoea*, *Lactuca*, *Lithospermum*, *Lotus*, *Lycopersicon*, *Medicago*, *Malus*, *Manihot*, *Medicago*, *Mesembryanthemum*, *Nicotiana*, *Olea*, *Oryza*, *Pisum*, *Persea*, *Petroselinum*, *Phalaenopsis*, *Phyllostachys*, *Physcomitrella*, *Picea*, *Pyrus*, *Quercus*, *Raphanus*, *Rehmannia*, *Rubus*, *Sorghum*, *Sphenostylis*, *Stellaria*, *Stylosanthes*, *Triticum*, *Trifolium*, *Triticum*, *Vaccinium*, *Vigna*, *Zinnia*. El microorganismo puede ser un hongo que pertenece al género *Agaricus*, p.ej. *A. bisporus*, un hongo que pertenece al género *Aspergillus*, p.ej. *A. oryzae*, *A. nidulans*, *A. fumigatus*, un hongo que pertenece al género *Ustilago*, p.ej. *U. maydis*, una bacteria que pertenece al género *Rhodobacter*, p.ej. *R. capsulatus*, una levadura que pertenece al género *Rhodotorula*, p.ej. *R. rubra*. De forma adecuada, dicha L-fenilalanina amoniaco liasa se expresa en dicho microorganismo a partir de un ácido nucleico que codifica dicha enzima que no es nativa en el microorganismo.

35 Se forma 4-cumaroil-CoA en una reacción catalizada por una 4-cumarato-CoA ligasa en la que ATP y CoA son sustratos y ADP es un producto.

40 Dicha 4-cumarato-CoA ligasa puede ser una 4-cumarato-CoA ligasa (EC 6.2.1.12) de una planta, un microorganismo o un nemátodo. La planta puede pertenecer al género *Abies*, p.ej. *A. beshanzuensis*, *B. firma*, *B. holophylla*, una planta que pertenece al género *Arabidopsis*, p.ej. *A. thaliana*, una planta que pertenece al género *Brassica*, p.ej. *B. napus*, *B. rapa*, *B. oleracea*, una planta que pertenece al género *Citrus*, p.ej. *C. sinensis*, una planta que pertenece al género *Larix*, p.ej. *L. decidua*, *L. gmelinii*, *L. griffithiana*, *L. himalaica*, *L. kaempferi*, *L. laricina*, *L. mastersiana*, *L. occidentalis*, *L. potaninii*, *L. sibirica*, *L. speciosa*, una planta que pertenece al género *Phaseolus*, p.ej. *P. acutifolius*, *P. coccineus*, una planta que pertenece al género *Pinus*, p.ej. *P. armandii*, *P. banksiana*, *P. pinaster*, una planta que pertenece al género *Populus*, p.ej. *P. balsamifera*, *P. tomentosa*, *P. tremuloides*, una planta que pertenece al género *Solanum*, p.ej. *S. tuberosum*, una planta que pertenece al género *Vitis*, p.ej. *Vitis vinifera*, una planta que pertenece al género *Zea*, p.ej. *Z. mays*, u otros géneros vegetales, p.ej. *Agastache*, *Amorpha*, *Cathaya*, *Cedrus*, *Crocus*, *Festuca*, *Glycine*, *Juglans*, *Keteleeria*, *Lithospermum*, *Lolium*, *Lotus*, *Lycopersicon*, *Malus*, *Medicago*, *Mesembryanthemum*, *Nicotiana*, *Nothotsuga*, *Oryza*, *Pelargonium*, *Petroselinum*, *Physcomitrella*, *Picea*, *Prunus*, *Pseudolarix*, *Pseudotsuga*, *Rosa*, *Rubus*, *Ryza*, *Saccharum*, *Suaeda*, *Thellungiella*, *Triticum*, *Tsuga*. El microorganismo podría ser un hongo filamentoso que pertenece al género *Aspergillus*, p.ej. *A. flavus*, *A. nidulans*, *A. oryzae*, *A. fumigatus*, un hongo filamentoso que pertenece al género *Neurospora*, p.ej. *N. crassa*, un hongo que pertenece al género *Yarrowia*, p.ej. *Y. lipolytica*, un hongo que pertenece al género *Mycosphaerella*, p.ej. *M. graminicola*, una bacteria que pertenece al género *Mycobacterium*, p.ej. *M. bovis*, *M. leprae*, *M. tuberculosis*, una bacteria que pertenece al género *Neisseria*, p.ej. *N. meningitidis*, una bacteria que pertenece al género *Streptomyces*, p.ej. *S. coelicolor*, una bacteria que pertenece al género *Rhodobacter*, p.ej. *R. capsulatus*, un nemátodo que pertenece al género *Ancylostoma*, p.ej. *A. ceylanicum*, un nemátodo que pertenece al género *Caenorhabditis*, p.ej. *C. elegans*, un nemátodo que pertenece al género *Haemonchus*, p.ej. *H. contortus*, un nemátodo que pertenece al género *Lumbricus*, p.ej. *L. rubellus*, un nemátodo que pertenece al género *Meilodogyne*, p.ej. *M. hapla*, un nemátodo que pertenece al género *Strongyloides*, p.ej. *S. ratti*, *S. stercoralis*, un nemátodo que pertenece al género *Pristionchus*, p.ej. *P. pacificus*.

Opcionalmente, se ha introducido de forma recombinante una NADPH:citocromo P450 reductasa (CPR) en dicho microorganismo. Esta puede ser una CPR vegetal introducida en un microorganismo no vegetal. De manera alternativa, se ha sobreexpresado una NADPH:citocromo P450 reductasa (CPR) nativa en dicho microorganismo.

5 En ciertas realizaciones preferidas, que incluyen las mencionadas en los párrafos anteriores, dicha NADPH:citocromo P450 reductasa es una NADPH:citocromo P450 reductasa (EC 1.6.2.4) de una planta que pertenece al género *Arabidopsis*, p.ej. *A. thaliana*, una planta que pertenece al género *Citrus*, p.ej. *C. sinensis*, *C. x paradisi*, una planta que pertenece al género *Phaseolus*, p.ej. *P. vulgaris*, una planta que pertenece al género *Pinus*, p.ej. *P. taeda*, una planta que pertenece al género *Populus*, p.ej. *P. deltoides*, *P. tremuloides*, *P. trichocarpa*, una planta que pertenece al género *Solanum*, p.ej. *S. tuberosum*, una planta que pertenece al género *Vitis*, p.ej. *Vitis vinifera*, una planta que pertenece al género *Zea*, p.ej. *Z. mays*, u otros géneros vegetales, p.ej. *Ammi*, *Avicennia*, *Camellia*, *Camptotheca*, *Catharanthus*, *Glycine*, *Helianthus*, *Lotus*, *Mesembryanthemum*, *Physcomitrella*, *Ruta*, *Saccharum*, *Vigna*.

10 Aunque el microorganismo descrito en la presente memoria se puede dar de manera natural, preferiblemente al menos una copia de al menos una secuencia genética que codifica una enzima respectiva en dicha ruta metabólica se ha introducido de manera recombinante en dicho microorganismo.

15 Adicionalmente o alternativamente a la introducción de secuencias codificantes que codifican dicha enzima, se puede proporcionar una o más señales de expresión, tales como secuencias promotoras, que no están asociadas de manera nativa a dicha secuencia codificante en dicho organismo. Así, opcionalmente, al menos una copia de una secuencia genética que codifica una tirosina amoniaco liasa se une de forma operable a una señal de expresión que no está asociada de manera nativa a dicha secuencia genética en dicho organismo, y/o al menos una copia de una secuencia genética que codifica una L-fenilalanina amoniaco liasa se une de forma operable a una señal de expresión que no está asociada de manera nativa a dicha secuencia genética en dicho organismo.

20 Opcionalmente, al menos una copia de una secuencia genética que codifica una cinamato 4-hidroxilasa, sea nativa o no, se une de forma operable a una señal de expresión que no está asociada de manera nativa a dicha secuencia genética en dicho organismo. Opcionalmente, al menos una copia de una secuencia genética que codifica una 4-cumarato-CoA ligasa, sea nativa o no, se une de forma operable a una señal de expresión que no está asociada de manera nativa a dicha secuencia genética en dicho organismo.

25 Opcionalmente, al menos una copia de una secuencia genética que codifica una resveratrol sintasa, sea nativa o no, se une de forma operable a una señal de expresión que no está asociada de manera nativa a dicha secuencia genética en dicho organismo.

30 Las señales de expresión incluyen secuencias de nucleótidos localizadas en dirección 5' (secuencias no codificantes de 5'), dentro, o en dirección 3' (secuencias no codificantes de 3') de una secuencia codificante, y que influyen en la transcripción, el procesamiento o la estabilidad del ARN, o la traducción de la secuencia codificante asociada. Tales secuencias pueden incluir promotores, secuencias líder de traducción, intrones, y secuencias de reconocimiento de poliadenilación.

35 Lo anterior se puede considerar como ejemplificante del concepto de un microorganismo modificado metabólicamente que tiene una ruta metabólica operativa en la que un primer metabolito se transforma en un segundo metabolito en una reacción catalizada por una primera enzima, y dicha etapa de reacción produce amoniaco, y en la que dicho segundo metabolito se transforma en un tercer metabolito en una reacción catalizada por una segunda enzima, en la que el oxígeno es un sustrato, NADPH o NADH es un cofactor y NADP⁺ o NAD⁺ es un producto, y en la que dicho tercer metabolito se transforma en un cuarto metabolito en una reacción catalizada por una tercera enzima en la que ATP y CoA son un sustrato, y ADP es un producto, y en la que dicho cuarto metabolito se transforma en un quinto metabolito en una reacción catalizada por una cuarta enzima en la que el malonil-CoA endógeno es un sustrato.

40 Lo anterior se puede considerar también como ejemplificante del concepto de un microorganismo modificado metabólicamente que tiene una ruta metabólica operativa en la que un primer metabolito se transforma en dicho tercer metabolito catalizado por una primera enzima, y dicha etapa de reacción produce amoniaco, sin la implicación de dicha segunda enzima, y en la que dicho tercer metabolito se transforma en dicho cuarto metabolito en una reacción catalizada por dicha tercera enzima en la que ATP y CoA es un sustrato, y ADP es un producto, y en la que dicho cuarto metabolito se transforma en dicho quinto metabolito en una reacción catalizada por dicha cuarta enzima en la que el malonil-CoA endógeno es un sustrato.

45 Los microorganismos descritos anteriormente incluyen los que contienen una o más copias de una secuencia de ADN heteróloga que codifica fenilalanina amoniaco liasa asociada de forma operable con una señal de expresión, y que contienen una o más copias de una secuencia de ADN heteróloga que codifica cinamato-4-hidroxilasa asociada de forma operable con una señal de expresión, y que contienen una o más copias de una secuencia de ADN heteróloga que codifica 4-cumarato-CoA-ligasa asociada de forma operable con una señal de expresión, y que contienen una o más copias de una secuencia de ADN heteróloga que codifica resveratrol sintasa asociada de forma operable con una señal de expresión.

También incluyen los que carecen de actividad cinamato-4-hidroxilasa, y que contienen una o más copias de una secuencia de ADN heteróloga que codifica tirosina amoniaco liasa asociada de forma operable con una señal de expresión, y que contienen una o más copias de una secuencia de ADN heteróloga que codifica 4-cumarato-CoA ligasa asociada de forma operable con una señal de expresión, y que contienen una o más copias de una secuencia de ADN heteróloga que codifica resveratrol sintasa asociada de forma operable con una señal de expresión.

En el presente contexto, el término "microorganismo" se refiere a organismos microscópicos, que incluyen bacterias, hongos microscópicos, que incluyen levadura.

De manera más específica, el microorganismo puede ser un hongo, y de manera más específica un hongo filamentosos que pertenece al género *Aspergillus*, p.ej. *A. niger*, *A. awamori*, *A. oryzae*, *A. nidulans*, una levadura que pertenece al género *Saccharomyces*, p.ej. *S. cerevisiae*, *S. kluyveri*, *S. bayanus*, *S. exiguus*, *S. sevazzi*, *S. uvarum*, una levadura que pertenece al género *Kluyveromyces*, p.ej. *K. lactis* *K. marxianus* var. *marxianus*, *K. thermotolerans*, una levadura que pertenece al género *Candida*, p.ej. *C. utilis* *C. tropicalis*, *C. albicans*, *C. lipolytica*, *C. versatilis*, una levadura que pertenece al género *Pichia*, p.ej. *P. stipidis*, *P. pastoris*, *P. sorbitophila*, u otros géneros de levadura, p.ej. *Cryptococcus*, *Debaromyces*, *Hansenula*, *Pichia*, *Yarrowia*, *Zygosaccharomyces* o *Schizosaccharomyces*. Con respecto a otros microorganismos, se suministra una lista no exhaustiva de hongos filamentosos adecuados: una especie que pertenece al género *Penicillium*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Fusidium*, *Gibberella*, *Mucor*, *Mortierella*, *Trichoderma*.

Con respecto a las bacterias, se proporciona una lista no exhaustiva de bacterias adecuadas a continuación: una especie que pertenece al género *Bacillus*, una especie que pertenece al género *Escherichia*, una especie que pertenece al género *Lactobacillus*, una especie que pertenece al género *Lactococcus*, una especie que pertenece al género *Corynebacterium*, una especie que pertenece al género *Acetobacter*, una especie que pertenece al género *Acinetobacter*, una especie que pertenece al género *Pseudomonas*, etc.

Los microorganismos preferidos de la invención pueden ser *S. cerevisiae*, *A. niger*, *A. oryzae*, *E. coli*, *L. lactis* o *B. subtilis*.

El microorganismo construido y modificado se puede cultivar mediante el uso de procedimientos conocidos normalmente, que incluyen los cultivos en quimiostato, por lotes, por lote alimentado, etc.

Así, la invención incluye un método para la producción de resveratrol o un derivado oligomérico o con unión glicosídica del mismo que comprende poner en contacto una célula no vegetal con un sustrato de carbono en ausencia sustancial de una fuente externa de ácido 4-cumárico, y dicha célula tiene la capacidad de producir resveratrol o un derivado oligomérico o con unión glicosídica del mismo en condiciones en las que el microorganismo se puede seleccionar del grupo que consiste en hongos y bacterias, en especial levadura.

Dicho sustrato de carbono se selecciona opcionalmente del grupo de sustratos de carbono fermentables que consiste en monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos, p.ej. glucosa, fructosa, galactosa, xilosa, arabinosa, manosa, sacarosa, lactosa, eritrosa, treosa, y/o ribosa. Dicho sustrato de carbono se puede seleccionar además o de manera alternativa del grupo de sustratos de carbono no fermentables que incluye etanol, acetato, glicerol, y/o lactato. Dicho sustrato de carbono no fermentable se puede seleccionar además o de manera alternativa del grupo de aminoácidos, y puede ser fenilalanina y/o tirosina.

En un aspecto alternativo, la invención incluye un método para la producción de resveratrol o un derivado oligomérico o con unión glicosídica del mismo por medio de la expresión heteróloga de secuencias de nucleótidos que codifican la fenilalanina amoniaco liasa, cinamato 4-hidroxilasa, 4-cumarato-CoA ligasa y resveratrol sintasa, y también un método para la producción de resveratrol por medio de la expresión heteróloga de secuencias de nucleótidos que codifican tirosina amoniaco liasa, 4-cumarato-CoA ligasa y resveratrol sintasa.

El resveratrol o un derivado oligomérico o con unión glicosídica del mismo así producido se puede usar como un producto nutracéutico en un producto lácteo o una bebida, tal como cerveza.

El resveratrol producido según la invención puede ser *cis*-resveratrol o *trans*-resveratrol, pero se espera que la forma *trans* predomine normalmente.

Breve Descripción de los Dibujos

Para ayudar a entender fácilmente la descripción anterior de la invención, se ha hecho referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

La Figura 1 muestra la estructura química de *trans*-resveratrol;

La Figura 2 muestra la ruta fenilpropanoide que utiliza fenilalanina amoniaco liasa que actúa sobre la L-fenilalanina; y

La Figura 3 muestra la ruta alternativa que utiliza la fenilalanina amoniaco liasa que actúa sobre la L-tirosina.

La Figura 4 muestra los cromatogramas de HPLC de extractos de las cepas de *S. cerevisiae* FSSC-

PALC4H4CLVST, FSSC-TAL4CLVST, cultivadas con 100 g/l de galactosa. Se incluye un cromatograma de 60 nanogramos de resveratrol puro.

La Figura 5 muestra el espectro de absorción UV para *trans*-resveratrol puro y *trans*-resveratrol producido mediante la cepa de *S. cerevisiae* FSSC-PALC4H4CLVST, cultivada con 100 g/l de galactosa.

- 5 La Figura 6 muestra los cromatogramas de HPLC de extractos de las cepas de *E. coli* FSEC-TAL4CLVST y FSEC-control, cultivadas con 50 g/l de glucosa.

La Figura 7 muestra los cromatogramas de HPLC de extractos de las cepas de *E. coli* FSEC-TAL4CLVST y FSEC-control, cultivadas con 50 g/l de glucosa con la adición de 20 mg/l de ácido cumárico. Se incluye el espectro de absorción UV para el *trans*-resveratrol producido en la cepa FSEC-TAL4CLVST.

- 10 La invención se describirá y se ilustrará adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1

Aislamiento de los genes que codifican PAL, TAL, C4H, CPR, 4CL, y VST

- 15 La fenilalanina amoniaco liasa (PAL2) (Cochrane *et al.*, 2004; SEQ ID N°: 1, 2), cinamato 4-hidroxilasa (C4H) (Mizutani *et al.*, 1997; SEQ ID N°: 3, 4) y 4-cumarato:CoenzimaA ligasa (4CL1) (Hamberger y Hahlbrock 2004; Ehltling *et al.*, 1999; SEQ ID N°: 5, 6) se aislaron por medio de PCR de cADN de *A. thaliana* (BioCat, Heidelberg, Alemania) mediante el uso de los cebadores de la tabla 1. PAL2 y 4CL1 se eligieron entre varios homólogos de *A. thaliana* debido a los parámetros cinéticos favorables hacia ácido cinámico y cumaroil-CoA, respectivamente (Cochrane *et al.*, 2004; Hamberger y Hahlbrock 2004; Ehltling *et al.*, 1999).

- 20 La secuencia codificante de la resveratrol sintasa (VST) de *Rheum tataricum* (Samappito *et al.*, 2003; SEQ ID N°: 7, 8) y tirosina amoniaco liasa (TAL) de *Rhodobacter capsulatus* (Kyndt *et al.*, 2002; SEQ ID N°: 11, 12) se optimizó con respecto a los codones para la expresión en *S. cerevisiae* mediante el uso la herramienta de traducción inversa del servicio en línea de www.entelechon.com, lo que produjo la secuencia SEQ ID N°: 9, 10 y SEQ ID N°: 13, 14 respectivamente. Los oligonucleótidos para el ensamblaje del gen sintético se construyeron en MWG Biotech, y el gen sintético se construyó mediante PCR con el uso de un protocolo de un método ligeramente modificado del de Martin *et al.* (2003) descrito más adelante.
- 25

Tabla 1. Cebadores y sitios de restricción para la amplificación de genes

Cebador para la amplificación del gen* (los sitios de restricción están subrayados)	Gen	Sitio de restricción: cebador	Sitio de restricción: vector
5'-CGGAATTCTCATGGATCAAATCGAAGCAATGTT	PAL2	EcoR1	EcoR1
5'-CGACTAGTTTAGCAAATCGGAATCGGAGC	PAL2	Spe1	Spe1
5'-CGCTCGAGAT ATGGACCTCCTCTTGCTGGA	C4H	Xho1	Xho1
5'-CGGGTACCTTAACAGTTCCTTGGTTTCATAAC	C4H	Kpn1	Kpn1
5'-GCTCTAGACCT ATGGCGCCACAAGAACAAGCAGTTT	4CL1	Xba1	Spe1
5'-GCGGATCCCCT TCACAATCCATTTGCTAGTTT TGCC	4CL1	BamH1	BglII
5'-CC GGATCCAAATGGCCCCAGAAGAGAGCAGG	VST	BamH1	BamH1
5'-CG CTCGAGTTAAGTGATCAATGGAACCGAAGACAG	VST	Xho1	Xho1
5'-CCGAATTCCCATGACCCTGCAATCTCAAACAGCTAAAG	TAL	EcoR1	EcoR1
5'-CCACTAGTTTAAGCAGGTGGATCGGCAGCT	TAL	Spe1	Spe1
5'-CCCTCGAGATCATGCCGTTTGGGAATAGACAACACCGA	CPR1	Xho1	Xho1
5'-CCAAGCTTATCGGGCTGATTACCAGACATCTTCTTG	CPR1	HindIII	HindIII
5'-CCGGATCCCATGTCCTTCTTCTTCTTCGTCAAC	AR2	BamH1	BamH1
5'-CCCTCGAGGTGAGTGTGTGGCTTCAATAGTTT CG	AR2	Xho1	Xho1

Cebador para la amplificación del gen* (los sitios de restricción están subrayados)	Gen	Sitio de restricción: cebador	Sitio de restricción: vector
* SEQ ID N°s 19-32			

Los cebadores de MWG para el ensamblaje del gen sintético se disolvieron en agua milliQ a una concentración de 100 pmoles/μl. Se combinó una alícuota de 5 μl de cada cebador en Totalmix y después se diluyó 10 veces con agua milliQ. El gen se ensambló por medio de PCR mediante el uso de 5 μl de Totalmix diluida por 50 μl como molde para la ADN polimerasa de fusión (Finnzymes). El programa de PCR fue como sigue: Inicialmente 98 °C durante 30 s., y después 30 ciclos con 98 °C durante 10 s., 40 °C durante 1 min. y 72 °C a 1 min./1000 pares de bases, y finalmente 72 °C durante 5 min. De la reacción de PCR resultante, se purificaron 20 μl en un gel de agarosa del 1 %. El resultado fue una mancha de PCR, y las regiones de alrededor del tamaño deseado se cortaron del gel de agarosa y se purificaron mediante el uso del equipo de extracción de geles QiaQuick (Qiagen). Una PCR final con los cebadores externos (para TAL y VST) de la tabla 1 proporcionó los genes TAL y VST necesarios. Las mutaciones puntuales se corrigieron mediante el uso del equipo de mutagénesis dirigida Quick-change II (Stratagene, La Jolla, CA), o mediante el uso de PCR de tramos de ADN sin errores solapantes de diversos subclones de *E. coli* diferentes. La NADPH:Citocromo P450 reductasa (CPR) de *A. thaliana* (AR2) (Mizutani y Ohta, 1998; SEQ ID N°: 17, 18) y de *S. cerevisiae* (CPR1) (Aoyama *et al.*, 1978; SEQ ID N°: 15, 16), se aislaron de cADN de *A. thaliana* (BioCat, Heidelberg, Alemania) y ADN genómico de *S. cerevisiae*, respectivamente, mediante el uso de los cebadores de la tabla 1.

Ejemplo 2

Construcción de un vector de levadura para la expresión de PAL

El gen que codifica PAL, aislado como se describió en el ejemplo 1, se volvió a amplificar mediante PCR con el uso de los cebadores directos e inversos, con salientes en 5' que contenían sitios de restricción EcoR1 y Spe1 (tabla 1). El producto de PCR de PAL amplificado se digirió con EcoR1/Spe1 y se ligó en un vector pESC-URA digerido con EcoR1/Spe1 (Stratagene), lo que dio como resultado el vector pESC-URA-PAL. La secuencia del gen se verificó mediante secuenciación de dos clones diferentes.

Ejemplo 3

Construcción de un vector de levadura para la expresión de PAL y C4H

El gen que codifica C4H, aislado como se describió en el ejemplo 1, se amplificó mediante PCR con el uso de los cebadores directos e inversos, con salientes en 5' que contenían sitios de restricción Xho1 y Kpn1. El producto de PCR de C4H amplificado se digirió con Xho1/Kpn1 y se ligó en un vector pESC-URA-PAL digerido de forma similar. El plásmido resultante, pESC-URA-PAL-C4H, contenía los genes que codifican PAL y C4H bajo control del promotor GAL1/GAL10 divergente. La secuencia del gen que codifica C4H se verificó mediante secuenciación de dos clones diferentes.

Ejemplo 4

Construcción de un vector de levadura para la expresión de 4CL

El gen que codifica 4CL se aisló como se describió en el ejemplo 1. El producto de PCR de 4CL amplificado se digirió con Xba1/BamH1 y se ligó en un vector pESC-TRP digerido con Spe1/BglII (Stratagene), lo que dio como resultado el vector pESC-TRP-4CL.

Se secuenciaron dos clones diferentes de pESC-TRP-4CL para verificar la secuencia del gen clonado.

Ejemplo 5

Construcción de un vector de levadura para la expresión de 4CL y VST

El gen que codifica VST se aisló como se describió en el ejemplo 1. El gen VST sintético amplificado se digirió con BamH1/Xho1 y se ligó en pESC-TRP-4CL digerido con BamH1/Xho1 (ejemplo 4). El plásmido resultante, pESC-TRP-4CL-VST, contuvo los genes que codifican 4CL y VST bajo control del promotor GAL1/GAL10 divergente. La secuencia del gen que codifica VST se verificó mediante secuenciación de dos clones diferentes de pESC-TRP-4CL-VST.

Ejemplo 6

Construcción de un vector de levadura para la expresión de TAL

El gen que codifica TAL se aisló como se describió en el ejemplo 1. El gen TAL sintético amplificado se digirió con

EcoR1/Spe1 y se ligó en el vector pESC-URA digerido con EcoR1/Spe1. El plásmido resultante, pESC-URA-TAL, contuvo el gen que codifica TAL bajo control del promotor GAL1/GAL10 divergente. La secuencia se verificó mediante la secuenciación de dos clones diferentes de pESC-URA-TAL.

Ejemplo 7

5 *Construcción de un vector de levadura para la sobreexpresión de CPR endógeno de S. cerevisiae*

El gen que codifica CPR de *S. cerevisiae* (CPR1) se aisló como se describió en el ejemplo 1. El gen CPR1 amplificado se digirió con Xho1/HindIII y se ligó en el vector pESC-LEU digerido con Xho1/HindIII (Stratagene), lo que dio como resultado el vector pESC-LEU-CPR1. La secuencia se verificó mediante la secuenciación de dos clones diferentes de pESC-LEU-CPR1.

10 Ejemplo 8

Construcción de un vector de levadura para la sobreexpresión de CPR de A. thaliana (AR2)

El gen que codifica CPR de *A. thaliana* (AR2) se aisló como se describió en el ejemplo 1. El gen AR2 amplificado se digirió con BamH1/Xho1 y se ligó en el vector pESC-LEU digerido con BamH1/Xho1 (Stratagene), lo que dio como resultado el vector pESC-LEU-AR2. La secuencia se verificó mediante la secuenciación de dos clones diferentes de pESC-LEU-AR2.

15

Ejemplo 9

Expresión de la ruta hasta resveratrol en la levadura S. cerevisiae mediante el uso de PAL, C4H, 4CL y VST

20 Las cepas de levadura que contenían los marcadores genéticos adecuados se transformaron con los vectores descritos en los ejemplos 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8, por separado o en combinación. La transformación de la célula de levadura se llevó a cabo de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de células competentes o mediante electroporación (véase, p.ej., Sambrook *et al.*, 1989). Los transformantes se seleccionaron en un medio que carecía de uracilo y/o triptófano, y se purificaron mediante siembra en estrías en el mismo medio.

25 La cepa de *S. cerevisiae* CEN.PK 113-5D (MATa ura3) se transformó por separado con el vector pESC-URA-PAL (ejemplo 2), lo que proporcionó la cepa FSSC-PAL, y con pESC-URA-PAL-C4H (ejemplo 3), lo que dio como resultado la cepa FSSC-PALC4H. La cepa de *S. cerevisiae* FS01267 (MATa trp1 ura3) se co-transformó con pESC-URA-PAL-C4H y pESC-TRP-4CL (ejemplo 4), y la cepa transformada se denominó FSSC-PALC4H4CL. La misma cepa se co-transformó también con pESC-URA-PAL-C4H y pESC-TRP-4CL-VST (ejemplo 5), lo que dio como resultado la cepa FSSC-PALC4H4CLVST.

25

Ejemplo 10

30 *Expresión de la ruta hasta resveratrol en S. cerevisiae mediante el uso de TAL, 4CL y VST.*

La cepa de *S. cerevisiae* CEN.PK 113-5D (MATa ura3) se transformó por separado con el vector pESC-URA-TAL (ejemplo 6), lo que proporcionó la cepa FSSC-TAL. La cepa de *S. cerevisiae* FS01267 (MATa trp1 ura3) se co-transformó con pESC-URA-TAL (ejemplo 6) y pESC-TRP-4CL (ejemplo 4), y la cepa transformada se denominó FSSC-TAL4CL. La misma cepa se co-transformó también con pESC-URA-TAL y pESC-TRP-4CL-VST (ejemplo 5), lo que dio como resultado la cepa FSSC-TAL4CLVST. Los transformantes se seleccionaron en un medio que carecía de uracilo y/o triptófano, y se purificaron mediante siembra en estrías en el mismo medio.

35

Ejemplo 11

Expresión de la ruta hasta resveratrol en S. cerevisiae con CPR endógeno sobreexpresado.

40 La cepa de *S. cerevisiae* FS01277 (MATa ura3 leu2 trp1) se co-transformó con los vectores pESC-URA-PAL-C4H (ejemplo 3), pESC-TRP-4CL (ejemplo 4), y pESC-LEU-CPR1 (ejemplo 7). La cepa transformada se denominó FSSC-PALC4H4CLVSTCPR. Los transformantes se seleccionaron en un medio que carecía de uracilo y/o triptófano, y se purificaron mediante siembra en estrías en el mismo medio.

40

Ejemplo 12

Expresión de la ruta hasta resveratrol en S. cerevisiae con CPR de A. thaliana (AR2) sobreexpresado.

45 La cepa de *S. cerevisiae* FS01277 (MATa ura3 leu2 trp1) se co-transformó con los vectores pESC-URA-PAL-C4H (ejemplo 3), pESC-TRP-4CL (ejemplo 4), y pESC-LEU-AR2 (ejemplo 8). La cepa transformada se denominó FSSC-PALC4H4CLVSTAR2. Los transformantes se seleccionaron en un medio que carecía de uracilo y/o triptófano, y se purificaron mediante siembra en estrías en el mismo medio.

45

Ejemplo 13

Fermentación con cepas de levadura recombinantes en matraces de agitación

Las cepas de levadura recombinantes se inocularon a partir de placas de agar con un asa de inoculación estéril y se cultivaron en 200 ml de medio mineral definido (Verduyn et al, 1992) que contenía vitaminas, oligoelementos, 5 g/l de glucosa y 40 g/l o 100 g/l de galactosa. Los matraces de agitación de 500 ml taponados se incubaron durante tres días a 30 °C y 160 rpm.

Ejemplo 14

Extracción de resveratrol

Las células se recogieron mediante centrifugación a 5000 g durante 5 minutos. Se extrajo una alícuota de 50 ml de sobrenadante una vez con 20 ml de acetato de etilo. El acetato de etilo se liofilizó y el producto seco se redisolvió en 0,7 ml de metanol y se filtró en viales de HPLC.

El sedimento celular de 200 ml de medio se disolvió en 1 a 2 ml de agua y se dividió en 3 tubos FastPrep y se rompió con esferas de vidrio. Los extractos brutos de los tres tubos se mezclaron en 10 ml de metanol del 100 % en un tubo Sartorius de 50 ml, y se extrajo en una cámara rotatoria durante 48 horas en una sala de refrigeración oscura a 4 °C. Después de 48 horas, los restos celulares se eliminaron por medio de centrifugación durante 5 min. a 5000 g, y el metanol se eliminó mediante liofilización durante la noche. El residuo seco se redisolvió en 1 ml de tampón fosfato-citrato de pH 5,4, y se añadieron 10 unidades de beta-glucosidasa de almendra (Sigma) para liberar el resveratrol de las supuestas formas con unión de glucósido. La mezcla se incubó durante tres horas a 37 °C y después se extrajo dos veces con 1 ml de acetato de etilo. El acetato de etilo combinado se liofilizó y el residuo seco se redisolvió en 0,7 ml de metanol y se filtró en viales de HPLC.

Ejemplo 15

*Análisis de resveratrol**Cromatografía en capa fina*

Se desarrolló un método basado en la cromatografía en capa fina que permitió la separación rápida de ácido cinámico, ácido cumárico y resveratrol en la misma placa de CCF para el análisis de cribado rápido. Se extrajo una alícuota de 1 ml de cultivo que contenía tanto células como sobrenadante con 500 microlitros de acetato de etilo y se centrifugó durante 30 s. a 13000 rpm con una microcentrífuga. El acetato de etilo se secó, y se redisolvió en metanol. Los extractos se analizaron en placas de Sílice G (0,2 mm Alugram SIL G/UV₂₅₄, Macherey-Nagel) que contenían un indicador fluorescente. La fase móvil fue una mezcla de cloroformo, acetato de etilo y ácido fórmico (25:10:1).

HPLC

Para el análisis cuantitativo de ácido cinámico, ácido cumárico, y resveratrol, las muestras se sometieron a separación mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), sistema Agilent Series 1100 (Hewlett Packard) antes de la detección mediante matriz de diodos UV a $\lambda = 306$ nm. Se usó una columna Phenomenex (Torrance, CA, EE.UU.) Luna de C18 de 3 micras (100 X 2,00 mm) a 40 °C. Como fase móvil, se usó un gradiente de acetonitrilo y agua milliQ (que contenían ambos 50 ppm de ácido trifluoroacético) a un caudal de 0,4 ml/min. El perfil del gradiente fue lineal desde un 15 % de acetonitrilo hasta un 100 % de acetonitrilo a lo largo de 20 min. Los tiempos de elución fueron de aproximadamente 3,4 min. para ácido cumárico, 5,5 min. para *trans*-resveratrol libre y 6,8 min. para ácido cinámico.

El patrón de resveratrol puro se adquirió de Cayman Chemical Company, mientras los patrones de ácido cumárico y de ácido cinámico puros se adquirieron de Sigma.

Resultados

Las cepas FSSC-PALC4H4CLVST y FSSC-TAL4CLVST se cultivaron en 100 g/l de galactosa como se describió en el ejemplo 13, y se analizó su contenido de resveratrol intracelular según los ejemplos 14 y 15. Además, se incluyó una cepa de control FSSC-control que contenía solamente los vectores vacíos pESC-URA y pESC-TRP. El análisis mediante HPLC demostró que las cepas FSSC-PALC4H4CLVST y FSSC-TAL4CLVST contenían un componente con un tiempo de retención de 5,5 min. que fue idéntico a *trans*-resveratrol (figura 4). Dicho resultado se confirmó mediante los espectros de absorción UV, que también fueron similares al espectro de absorción de *trans*-resveratrol puro (figura 5), con una λ_{\max} de aproximadamente 306 nm.

Los resultados, por lo tanto, demostraron la presencia de una ruta fenil-propanoide activa en *S. cerevisiae* que condujo a la producción *in vivo* de *trans*-resveratrol. La producción de resveratrol se puede mejorar probablemente cultivando las cepas en condiciones de cultivo bien definidas en cultivos por lotes y continuos, y/o optimizando la expresión/actividades de las enzimas individuales.

Ejemplo 16

Construcción de un vector bacteriano para la expresión de TAL en Escherichia coli.

El gen que codifica TAL, aislado como se describió en el Ejemplo 1, se reamplificó mediante PCR del plásmido pESC-URA-TAL (ejemplo 6) mediante el uso del cebador directo 5'-CCG CTCGAG CGG ATG ACC CTG CAA TCT CAA ACA GCT AAA G-3' SEQ ID N° 33 y el cebador inverso 5'-GC GGATCC TTA AGC AGG TGG ATC GGC AGC T-3' SEQ ID N° 34 con salientes en 5' que contenían los sitios de restricción XhoI y BamHI, respectivamente. La introducción de los sitios de restricción en los extremos 5' y 3' del gen permitió la ligadura del producto de PCR sometido a restricción en un vector pET16b (Novagen), digerido con XhoI y BamHI para proporcionar pET16b-TAL. El vector pET16b contuvo tanto el gen de resistencia a ampicilina como el promotor de T7. Por lo tanto, el procedimiento anterior dio como resultado un vector con un marcador de selección por antibiótico que contenía el gen que codifica TAL bajo control del promotor de T7. La secuencia del gen que codifica TAL se verificó mediante secuenciación de un clon de pET16b-TAL.

Ejemplo 17

Construcción de un vector bacteriano para la expresión de 4CL y VST en Escherichia coli.

El gen que codifica VST, aislado como se describió en el ejemplo 1, se cortó con las enzimas de restricción BamHI y XhoI del plásmido digerido pESC-TRP-4CL-VST (ejemplo 5), que contenía los genes que codifican 4CL y VST. El gen VST se ligó en un vector pET26b (Novagen), que contenía el gen de resistencia a kanamicina, y se digirió con BamHI y Sall para proporcionar pET26b-VST. Las enzimas de restricción XhoI y Sall tienen extremos compatibles, que permitieron una ligadura adecuada. El vector pET26b contuvo tanto el gen de resistencia a kanamicina como el promotor de T7. Por lo tanto, el procedimiento anterior dio como resultado un vector con un marcador de selección por antibiótico que contenía el gen que codifica VST bajo control del promotor de T7.

El gen que codifica 4CL, aislado como se describió en el ejemplo 1, se reamplificó mediante PCR del plásmido pESC-URA-4CL-VST (ejemplo 5) mediante el uso del cebador directo 5'-TG CCATGG CA ATGGCGCCAC AAGAACAAGC AGTTT-3' SEQ ID N° 35 y el cebador inverso 5'-GC GGATCC CCT TCA CAA TCC ATT TGC TAG TTT TGCC-3' SEQ ID N° 36 con salientes en 5' que contenían los sitios de restricción NcoI y BamHI, respectivamente. La introducción de sitios de restricción en los extremos 5' y 3' del gen permitió la ligadura del producto de PCR sometido a restricción en un vector pET16b (Novagen) digerido con NcoI y BamHI. El plásmido resultante, pET16b-4CL, contuvo el gen que codifica 4CL bajo control del promotor de T7. Tanto el promotor de T7 como el gen que codifica 4CL se reamplificaron en forma de un fragmento mediante PCR del plásmido pET16b-4CL con el uso del cebador directo 5'-TT GCGGCCGC AAA TCT CGA TCC CGC GAA ATT AAT ACG-3' SEQ ID N° 37 y el cebador inverso 5'-CG CTCGAG CCT TCA CAA TCC ATT TGC TAG TTT TGCC-3' SEQ ID N° 38 con salientes en 5', que contenían los sitios de restricción NotI y XhoI, respectivamente. La introducción de sitios de restricción en los extremos 5' y 3' del fragmento de ADN permitió la ligadura del producto de PCR sometido a restricción en el plásmido pET26b-VST que se digirió con NotI y XhoI antes de la ligadura. El plásmido resultante, pET26b-VST-4CL, contuvo los dos genes 4CL y VST que estuvieron cada uno bajo control de un promotor de T7 individual.

Ejemplo 18

Expresión de la ruta hasta resveratrol en Escherichia coli, mediante el uso de TAL, 4CL y VST.

La transformación de la célula bacteriana se llevó a cabo de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de células competentes o mediante electroporación (véase, p.ej., Sambrook *et al.*, 1989). La cepa de *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen) se co-transformó con los dos vectores pET16b-TAL (ejemplo 16) y pET26b-VST-4CL (Ejemplo 17), lo que dio como resultado la cepa FSEC-TAL4CLVST. Además, la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) se co-transformó con los dos vectores vacíos pET16b (Novagen) y pET26b (Novagen), lo que dio como resultado la cepa FSEC-control, que se usó como cepa de control. Los transformantes se seleccionaron en medio Luria-Bertani (LB) con 100 µg/ml de ampicilina y 60 µg/ml de kanamicina.

Ejemplo 19

Fermentación con cepas de Escherichia coli recombinantes en matraces de agitación.

Se cultivaron pre-cultivos de *Escherichia coli* BL21 (DE3) en tubos de vidrio a 160 rpm y 37 °C en 7 ml de medio LB que contenía 100 µg/ml de ampicilina y 60 µg/ml de kanamicina. Se usaron los precultivos en crecimiento exponencial para la inoculación de matraces de agitación con deflectores de 500 ml que contenían 200 ml de medio LB complementado con 50 g/l de glucosa, 5 g/l de K₂HPO₄, 80 µg/ml de ampicilina y 50 µg/ml de kanamicina, y se incubaron a 160 rpm y 37 °C. Después de 5 horas, se añadió R-tiogalactopiranosido de isopropilo (IPTG) a una concentración final de 1 mM, como inductor del promotor de T7 que estaba al principio de cada uno de los tres genes TAL, 4CL y VST. Después de un periodo de incubación de 48 horas a 37 °C, las células se recogieron y se sometieron a procedimientos de extracción y se analizó la presencia del resveratrol producido.

55

Ejemplo 20

Extracción y análisis de resveratrol en Escherichia coli.

La extracción y el análisis se llevaron a cabo mediante el uso de los métodos descritos en los ejemplos 14 y 15.

Resultados

5 Las cepas FSEC-TAL4CLVST y FSEC-control se cultivaron con 50 g/l de glucosa como se describió en el ejemplo 19, y se analizó su contenido de resveratrol intracelular según los ejemplos 14 y 15. El análisis mediante HPLC demostró que la cepa FSEC-TAL4CLVST contuvo cantidades considerables de un componente con un tiempo de retención de 3,4 min., que es idéntico al ácido cumárico (figura 6). Sin embargo, el extracto no contuvo un
 10 componente que eluyese en el mismo tiempo del *trans*-resveratrol. Dicho resultado, por lo tanto, indica que la tirosina amoniaco liasa (TAL) fue activa, de hecho, pero no condujo a la producción de cantidades detectables de resveratrol. La ausencia de formación de resveratrol, sin embargo, pudo ser el resultado de; i) una cumarato-CoA ligasa (4CL) no funcional; ii) una resveratrol sintasa (VST) no funcional; iii) niveles demasiado bajos de ácido cumárico, provocados por condiciones de cultivo que no fueron óptimas, o expresión/actividad de TAL que no fueron óptimas, o ramificación del ácido cumárico hacia otros productos. Para estudiar dichas hipótesis, las cepas se
 15 cultivaron en un medio similar al descrito en el ejemplo 19, pero ahora en presencia de 20 mg/l de ácido cumárico. El análisis mediante HPLC posterior de los extractos de FSEC-TAL4CLVST, de hecho, mostró un agrupamiento de picos alrededor del mismo tiempo de retención del *trans*-resveratrol, que no se observó en los extractos de FSEC-control (figura 6). De hecho, el espectro de absorción UV del pico con un tiempo de retención de 5,5 min. fue similar al espectro de *trans*-resveratrol puro (figura 7), mientras no se pudo obtener dicho espectro para los picos en la cepa
 20 de control. Los resultados, por lo tanto, indican claramente la presencia de una ruta fenilpropanoide activa en *Escherichia coli*, que puede conducir a la producción de resveratrol. Lo más probablemente, la producción de resveratrol sin la adición de ácido cumárico se puede conseguir cultivando las cepas en condiciones de cultivo bien definidas en cultivos por lotes y continuos, y/o optimizando la expresión/actividades de las enzimas individuales.

Ejemplo 21

25 *Construcción de un vector bacteriano para la expresión de PAL y C4H en Lactococcus lactis.*

El plásmido pSH71, y los derivados del mismo, que se usa en los ejemplos siguientes, es un vector lanzadera bifuncional con múltiples orígenes de replicación de *Escherichia coli* y *Lactococcus lactis*. Con él, la especificidad de la serie de hospedadores abarca *Escherichia coli* y otras especies de bacterias de ácido láctico. Aunque las transformaciones en *Lactococcus lactis* normalmente tienen lugar sin problemas, las supuestas transformaciones
 30 difíciles en otras especies de bacterias de ácido láctico se pueden superar, por tanto, mediante el uso de *Escherichia coli* como hospedador intermedio para la construcción de plásmidos recombinantes. El plásmido contiene uno o más genes marcadores para permitir que el microorganismo que lo alberga se seleccione de los que no lo albergan. El sistema de selección que se usa para *Lactococcus lactis* se basa en marcadores dominantes, p.ej. resistencia hacia eritromicina y cloranfenicol, pero también se han descrito sistemas basados en genes implicados en el metabolismo de carbohidratos, peptidasas y marcadores de grado alimentario. Además, el plásmido contiene secuencias promotoras y terminadoras que permiten la expresión de los genes recombinantes. Los promotores adecuados se
 35 adquieren de genes de *Lactococcus lactis*, p.ej. *lacA*. Además, el plásmido contiene sitios de restricción únicos adecuados para facilitar la clonación de fragmentos de ADN y la identificación posterior de los recombinantes.

40 En los ejemplos siguientes, el plásmido contiene el gen de resistencia a eritromicina, denominado pSH71-ERY^r, o el gen de resistencia a cloranfenicol, denominado pSH71-CM^r.

El gen que codifica PAL, aislado como se describió en el ejemplo 1, se reamplifica mediante PCR del plásmido pESC-URA-PAL-C4H (ejemplo 3), mediante el uso de cebadores directos e inversos, con salientes en 5' que contienen sitios de restricción adecuados. La introducción de dichos sitios de restricción en los extremos 5' y 3' del gen permite la ligadura del producto de PCR sometido a restricción en un vector pSH71-ERY^r digerido que contiene el promotor *lacA* de *Lactococcus lactis*. El plásmido resultante, pSH71-ERY^r-PAL, contiene el gen que codifica PAL bajo control del promotor *lacA* de *Lactococcus lactis*.
 45

El gen que codifica C4H, aislado como se describió en el ejemplo 1, se reamplifica mediante PCR del plásmido pESC-URA-PAL-C4H (ejemplo 3), mediante el uso de cebadores directos e inversos, con salientes en 5' que contienen sitios de restricción adecuados. La introducción de dichos sitios de restricción en los extremos 5' y 3' del gen permite la ligadura del producto de PCR sometido a restricción en un vector pSH71-CM^r digerido para proporcionar pSH71-CM^r-C4H. El promotor *lacA* y el gen que codifica C4H se reamplifican en forma de un fragmento mediante PCR del plásmido pSH71-CM^r-C4H con el uso de cebadores directos e inversos, con salientes en 5' que
 50 contienen sitios de restricción adecuados. La introducción de dichos sitios de restricción en los extremos 5' y 3' del fragmento de ADN permite la ligadura del producto de PCR sometido a restricción en el plásmido digerido pSH71-ERY^r-PAL. El plásmido resultante, pSH71-ERY^r-PAL-C4H, contiene los genes que codifican PAL y C4H que están cada uno bajo control de un promotor *lacA* individual. La secuencia de los genes que codifican PAL y C4H se verifica mediante secuenciación de dos clones diferentes de pSH71-ERY^r-PAL-C4H.
 55

Ejemplo 22

Construcción de un vector bacteriano para la expresión de TAL en Lactococcus lactis.

El gen que codifica TAL, aislado como se describió en el ejemplo 1, se reamplifica mediante PCR del plásmido pESC-URA-TAL (ejemplo 6), mediante el uso de cebadores directos e inversos, con salientes en 5' que contienen sitios de restricción adecuados. La introducción de dichos sitios de restricción en los extremos 5' y 3' del gen permite la ligadura del producto de PCR sometido a restricción en un vector pSH71-ERY^r digerido. El plásmido resultante, pSH71-ERY^r-TAL, contiene el gen que codifica TAL bajo control del promotor *lacA* de *Lactococcus lactis*. La secuencia del gen que codifica TAL se verifica mediante secuenciación de dos clones diferentes de pSH71-ERY^r-TAL.

10 Ejemplo 23

Construcción de un vector bacteriano para la expresión de 4CL y VST en Lactococcus lactis.

El gen que codifica 4CL, aislado como se describió en el ejemplo 1, se reamplifica mediante PCR del plásmido pESC-TRP-4CL-VST (ejemplo 5), mediante el uso de cebadores directos e inversos, con salientes en 5' que contienen sitios de restricción adecuados. La introducción de dichos sitios de restricción en los extremos 5' y 3' del gen permite la ligadura del producto de PCR sometido a restricción en un vector pSH71-CM^r digerido. El plásmido resultante, pSH71-CM^r-4CL, contiene el gen que codifica 4CL bajo control del promotor *lacA* de *Lactobacillus lactis*.

El gen que codifica VST, aislado como se describió en el ejemplo 1, se reamplifica mediante PCR del plásmido pESC-TRP-4CL-VST (ejemplo 5), mediante el uso de cebadores directos e inversos, con salientes en 5' que contienen sitios de restricción adecuados. La introducción de dichos sitios de restricción en los extremos 5' y 3' del gen permite la ligadura del producto de PCR sometido a restricción en un vector pSH71-ERY^r digerido. El plásmido resultante, pSH71-ERY^r-VST, contiene el gen que codifica VST bajo control del promotor *lacA* de *Lactococcus lactis*. El promotor *lacA* y el gen que codifica VST se reamplifican en forma de un fragmento mediante PCR del plásmido pSH71-ERY^r-VST con el uso de cebadores directos e inversos, con salientes en 5' que contienen sitios de restricción adecuados. La introducción de dichos sitios de restricción en los extremos 5' y 3' del fragmento de ADN permite la ligadura del producto de PCR sometido a restricción en el plásmido digerido pSH71-CM^r-4CL. El plásmido resultante, pSH71-CM^r-4CL-VST, contiene los genes que codifican 4CL y VST que están cada uno bajo control de su promotor *lacA* individual. La secuencia de los genes que codifican 4CL y VST se verifica mediante la secuenciación de dos clones diferentes de pSH71-CM^r-4CL-VST.

Ejemplo 24

30 *Expresión de la ruta hasta resveratrol en Lactococcus lactis*

Las cepas de *Lactococcus lactis* se transforman con los vectores descritos en los ejemplos 21, 22 y 23, por separado o en combinación. La transformación de la célula bacteriana se lleva a cabo de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de células competentes o mediante electroporación (véase, p.ej., Sambrook *et al.*, 1989). Los transformantes se seleccionan en un medio que contiene los antibióticos eritromicina y cloranfenicol, y se purifican mediante siembra en estrias en el mismo medio.

La cepa de *Lactococcus lactis* MG1363 se transforma por separado con el vector pSH71-ERY^r-TAL (ejemplo 22), lo que produce la cepa FSLL-TAL; con pSH71-ERY^r-PAL-C4H (ejemplo 21), lo que produce la cepa FSLL-PALC4H y con pSH71-CM^r-4CL-VST (ejemplo 23), lo que produce la cepa FSLL-4CLVST. Además, la cepa de *Lactococcus lactis* MG1363 se co-transforma con pSH71-ERY^r-TAL (ejemplo 22) y pSH71-CM^r-4CL-VST (ejemplo 23), y la cepa transformada se denomina FSLL-TAL4CLVST. La misma cepa se co-transforma también con pSH71-ERY^r-PAL-C4H (ejemplo 21), y pSH71-CM^r-4CL-VST (ejemplo 23), lo que da como resultado la cepa FSLL-PALC4H4CLVST.

Ejemplo 25

Fermentación con cepas de Lactococcus lactis recombinantes en fermentadores.

Las cepas de levadura recombinantes se pueden cultivar en fermentadores que funcionan por lotes, por lote alimentado o cultivos en quimiostato.

Cultivos por Lotes y por Lote Alimentado

El microorganismo se cultiva en un biorreactor con deflectores con un volumen de trabajo de 1,5 litros en condiciones anaerobias, aerobias o microaerobias. Todos los cultivos se incuban a 30 °C, a 350 rpm. Se mantiene un pH constante de 6,6 mediante la adición automática de KOH 10 M. Las células se cultivan con lactosa en un medio MS10 definido complementado con los siguientes componentes para permitir el cultivo en condiciones aerobias: MnSO₄ (1,25 x 10⁻⁵ g/l), tiamina (1 mg/l), y ácido DL-6,8-tióctico (2,5 mg/l). La concentración de lactosa es, por ejemplo, 50 g/l. Los biorreactores se inoculan con células de precultivos cultivados a 30 °C en matraces de agitación con el medio descrito anteriormente tamponado con concentraciones tres veces mayores de K₂HPO₄ y KH₂PO₄. Las condiciones anaerobias se aseguran purgando el medio con N₂ (99,998% puro) antes de la

inoculación, y manteniendo un flujo constante de 50 ml/min de N₂ a través del espacio de aire del biorreactor durante el cultivo. Los biorreactores usados para el cultivo microaerobio y aerobio están equipados con sensores de oxígeno polarográficos que se calibran con aire (DOT, 100%) y N₂ (DOT, 0%). Las condiciones aerobias se obtienen inyectando en el biorreactor aire a una velocidad de 1 vvm para asegurar que el DOT es mayor del 80%. Durante los experimentos microaerobios, el DOT se mantiene constantemente en un 5% inyectando en el reactor gas compuesto de una mezcla de N₂ y aire atmosférico, a una velocidad de 0,25 vvm.

Cultivos en quimiostato

En los cultivos en quimiostato, las células se pueden cultivar, por ejemplo, en fermentadores de laboratorio Applikon de un volumen de trabajo de 1 L a 30 °C y 350 rpm. La velocidad de dilución (D) se puede ajustar a diferentes valores, p.ej. a 0,050 h⁻¹, 0,10 h⁻¹, 0,15 h⁻¹, o 0,20 h⁻¹. El pH se mantiene constante, p.ej. a 6,6, mediante la adición automática de KOH 5 M, mediante el uso del medio de cultivo descrito anteriormente, complementado con un antiespumante (50 µl/l). La concentración de lactosa se puede ajustar a diferentes valores, p.ej. es 3,0 g/l, 6,0 g/l, 12,0 g/l, 15,0 g/l o 18,0 g/l. El biorreactor se inocula a una concentración de biomasa inicial de 1 mg/l, y la bomba de alimentación se enciende al final de la fase de crecimiento exponencial.

Se obtiene un estado estacionario anaerobio mediante la introducción de 50 ml/min de N₂ (99,998% puro) en el espacio de aire del biorreactor. Se pueden obtener diferentes estados estacionarios anóxicos mediante la inyección en el reactor de 250 ml/min de gas compuesto de N₂ (99,998% puro) y aire atmosférico a diversas proporciones. El electrodo de oxígeno se calibra inyectando en el biorreactor aire (DOT del 100%) y N₂ (DOT del 0%).

Para todas las condiciones, el gas se esteriliza mediante filtración antes de introducirlo en el biorreactor. El gas de salida se conduce a través de un condensador enfriado a menos de -8 °C y se analiza su contenido volumétrico de CO₂ y O₂ por medio de un analizador de gases acústico.

Se considera que los cultivos están en estado estacionario después de al menos 5 tiempos de residencia, y si las concentraciones de biomasa y productos finales de la fermentación permanecen sin cambios (menos del 5% de desviación relativa) a lo largo de los dos últimos tiempos de residencia.

Ejemplo 26

Extracción y análisis de resveratrol en Lactococcus lactis

La extracción y el análisis se llevan a cabo mediante el uso de los métodos descritos en los ejemplos 14 y 15.

Ejemplo 27

Construcción de un vector fúngico para la expresión de PAL y C4H en una especie que pertenece al género Aspergillus.

El plásmido que se usa en los siguientes ejemplos deriva de pARp1 que contiene la secuencia de iniciación de la replicación AMA1 de *Aspergillus nidulans*, que también mantiene la replicación autónoma del plásmido en *A. niger* y *A. oryzae* (Gems *et al.*, 1991). Además, el plásmido es un vector lanzadera, que contiene la secuencia de replicación de *Escherichia coli*, y las transformaciones difíciles inherentes en *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae* se podrían superar, por tanto, mediante el uso de *Escherichia coli* como hospedador intermedio para la construcción de plásmidos recombinantes. El plásmido contiene uno o más genes marcadores para permitir que el microorganismo que lo alberga se seleccione de los que no lo albergan. El sistema de selección se puede basar en marcadores dominantes, p.ej. resistencia hacia higromicina B, fleomicina y bleomicina, o marcadores heterólogos, p.ej. aminoácidos y el gen *pirG*. Además, el plásmido contiene secuencias promotoras y terminadoras que permiten la expresión de los genes recombinantes. Los promotores adecuados se toman de genes de *Aspergillus nidulans*, p.ej. *alcA*, *glaA*, *amy*, *niaD*, y *gpdA*. Además, el plásmido contiene sitios de restricción únicos adecuados para facilitar la clonación de fragmentos de ADN y la identificación posterior de los recombinantes.

El plásmido usado en los ejemplos siguientes contiene el promotor constitutivo fuerte *gpdA* y marcadores auxotrópicos, todos originarios de *Aspergillus nidulans*; el plásmido que contiene el gen *methG* que está implicado en la biosíntesis de metionina se denomina pAMA1-MET; el plásmido que contiene el gen *hisA* que está implicado en la biosíntesis de histidina se denomina pAMA1-HIS.

El gen que codifica PAL, aislado como se describió en el ejemplo 1, se reamplifica mediante PCR del plásmido pESC-URA-PAL-C4H (ejemplo 3), mediante el uso de cebadores directos e inversos, con salientes en 5' que contienen sitios de restricción adecuados. La introducción de dichos sitios de restricción en los extremos 5' y 3' del gen permite la ligadura del producto de PCR sometido a restricción en un vector pAMA1-MET digerido que contiene el promotor *gpdA* de *Aspergillus nidulans*. El plásmido resultante, pAMA1-MET-PAL, contiene el gen que codifica PAL bajo control del promotor *gpdA* de *Aspergillus nidulans*.

El gen que codifica C4H, aislado como se describió en el ejemplo 1, se reamplifica mediante PCR del plásmido pESC-URA-PAL-C4H (ejemplo 3), mediante el uso de cebadores directos e inversos, con salientes en 5' que

contienen sitios de restricción adecuados. La introducción de dichos sitios de restricción en los extremos 5' y 3' del gen permite la ligadura del producto de PCR sometido a restricción en un vector pAMA1-HIS digerido para proporcionar pAMA1-HIS-C4H. El promotor *gpdA* y el gen que codifica C4H se reamplifican en forma de un fragmento mediante PCR del plásmido pAMA1-HIS-C4H con el uso de cebadores directos e inversos, con salientes en 5' que contienen sitios de restricción adecuados. La introducción de dichos sitios de restricción en los extremos 5' y 3' del fragmento de ADN permite la ligadura del producto de PCR sometido a restricción en el plásmido digerido pAMA1-MET-PAL. El plásmido resultante, pAMA1-MET-PAL-C4H, contiene los genes que codifican PAL y C4H que están cada uno bajo control de un promotor *gpdA* individual de *Aspergillus nidulans*. La secuencia de los genes que codifican PAL y C4H se verifica mediante secuenciación de dos clones diferentes de pAMA1-MET-PAL-C4H.

10 Ejemplo 28

Construcción de un vector fúngico para la expresión de TAL en una especie que pertenece al género Aspergillus.

El gen que codifica TAL, aislado como se describió en el ejemplo 1, se reamplifica mediante PCR del plásmido pESC-URA-TAL (ejemplo 6), mediante el uso de cebadores directos e inversos, con salientes en 5' que contienen sitios de restricción adecuados. La introducción de dichos sitios de restricción en los extremos 5' y 3' del gen permite la ligadura del producto de PCR sometido a restricción en un vector pAMA1-MET digerido. El plásmido resultante, pAMA1-MET-TAL, contiene el gen que codifica TAL bajo control del promotor *gpdA* de *Aspergillus nidulans*. La secuencia del gen que codifica TAL se verifica mediante secuenciación de dos clones diferentes de pAMA1-MET-TAL.

Ejemplo 29

20 *Construcción de un vector fúngico para la expresión de 4CL y VST en una especie que pertenece al género Aspergillus.*

El gen que codifica 4CL, aislado como se describió en el ejemplo 1, se reamplifica mediante PCR del plásmido pESC-TRP-4CL-VST (ejemplo 5), mediante el uso de cebadores directos e inversos, con salientes en 5' que contienen sitios de restricción adecuados. La introducción de dichos sitios de restricción en los extremos 5' y 3' del gen permite la ligadura del producto de PCR sometido a restricción en un vector pAMA1-HIS digerido que contiene el promotor *gpdA* de *Aspergillus nidulans*. El plásmido resultante, pAMA1-HIS-4CL, contiene el gen que codifica 4CL bajo control del promotor *gpdA* de *Aspergillus nidulans*.

El gen que codifica VST, aislado como se describió en el ejemplo 1, se reamplifica mediante PCR del plásmido pESC-TRP-4CL-VST (ejemplo 5), mediante el uso de cebadores directos e inversos, con salientes en 5' que contienen sitios de restricción adecuados. La introducción de dichos sitios de restricción en los extremos 5' y 3' del gen permite la ligadura del producto de PCR sometido a restricción en un vector pAMA1-MET digerido para proporcionar pAMA1-MET-VST. El promotor *gpdA* y el gen que codifica VST se reamplifican en forma de un fragmento mediante PCR del plásmido pAMA1-MET-VST con el uso de cebadores directos e inversos, con salientes en 5' que contienen sitios de restricción adecuados. La introducción de dichos sitios de restricción en los extremos 5' y 3' del fragmento de ADN permite la ligadura del producto de PCR sometido a restricción en el plásmido digerido pAMA1-HIS-4CL. El plásmido resultante, pAMA1-HIS-4CL-VST, contiene los genes que codifican 4CL y VST que están cada uno bajo control de un promotor *gpdA* individual de *Aspergillus nidulans*. La secuencia de los genes que codifican 4CL y VST se verifica mediante la secuenciación de dos clones diferentes de pAMA1-HIS-4CL-VST.

Ejemplo 30

40 *Expresión de la ruta hasta resveratrol en Aspergillus niger.*

Las cepas de *Aspergillus niger* se transforman con los vectores descritos en los ejemplos 27, 28 y 29, por separado o en combinación. La transformación de la célula fúngica se lleva a cabo de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante electroporación o mediante conjugación (véase, p.ej., Sambrook *et al.*, 1989). Los transformantes se seleccionan en medio mínimo que carece de metionina y/o histidina.

Una cepa de *Aspergillus niger* que es auxotrófica para histidina y metionina, por ejemplo, la cepa FGSC A919 (véase <http://www.fgsc.net>), se transforma por separado con el vector pAMA1-MET-TAL (ejemplo 28), lo que produce la cepa FSAN-TAL; con pAMA1-MET-PAL-C4H (ejemplo 27), lo que produce la cepa FSAN-PALC4H, y con pAMA1-HIS-4CL-VST (ejemplo 29), lo que produce la cepa FSAN-4CLVST. Además, la cepa de *Aspergillus niger* FGSC A919 se co-transforma con pAMA1-MET-TAL (ejemplo 28) y pAMA1-HIS-4CL-VST (ejemplo 29), y la cepa transformada se denomina FSAN-TAL4CLVST. La misma cepa se co-transforma también con pAMA1-MET-PAL-C4H (ejemplo 27), y pAMA1-HIS-4CL-VST (ejemplo 29), lo que da como resultado la cepa FSAN-PALC4H4CLVST.

Ejemplo 31

Expresión de la ruta hasta resveratrol en Aspergillus oryzae.

Una cepa de *Aspergillus oryzae* que contiene un grupo de genes nativos que codifican PAL, C4H y 4CL (Seshime *et*

al., 2005) y que es auxotrófica para metionina, se transforma con el vector pAMA1-MET-VST (ejemplo 29), lo que produce la cepa FSAO-VST. La transformación de la célula fúngica se lleva a cabo de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante electroporación o mediante conjugación (véase, p.ej., Sambrook et al., 1989). Los transformantes se seleccionan en medio mínimo que carece de metionina.

5 Ejemplo 32

Fermentación con cepas recombinantes de Aspergillus niger y Aspergillus oryzae en fermentadores.

Las cepas de levadura recombinantes se pueden cultivar en fermentadores que funcionan por lotes, por lote alimentado o cultivos en quimiostato.

Cultivos por Lotes y por Lote Alimentado

10 El microorganismo se cultiva en un biorreactor con deflectores con un volumen de trabajo de 1,5 litros en condiciones aerobias. Todos los cultivos se incuban a 30 °C, a 500 rpm. Se mantiene un pH constante de 6,0 mediante la adición automática de KOH 10 M, y se obtienen las condiciones aerobias inyectando en el biorreactor aire a una velocidad de 1 vvm para asegurar que el DOT es mayor del 80%. Las células se cultivan con glucosa en medio definido que consiste en los siguientes componentes para permitir el crecimiento en los cultivos por lotes: 7,3

15 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,5 g/l de KH_2PO_4 , 1,0 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g/l de NaCl, 0,1 g/l de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,1 ml/l de antiespumante de Sigma, 7,2 mg/l de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,3 mg/l de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,3 mg/l de $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 3,5 mg/l de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y 6,9 mg/l de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. La concentración de glucosa es, por ejemplo, 10, 20, 30, 40 ó 50 g/l. Para permitir el crecimiento en los cultivos por lote alimentado, el medio está compuesto de: 7,3 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4,0 g/l de KH_2PO_4 , 1,9 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,3 g/l de NaCl, 0,10 g/l de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,1 ml/l de antiespumante de Sigma,

20 7,2 mg/l de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,3 mg/l de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,3 de mg/l $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 3,5 mg/l de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y 6,9 mg/l de $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en la fase del lote. El reactor se alimenta después, por ejemplo, con 285 g/kg de glucosa y 42 g/kg de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Se usa el micelio libre de un pre-cultivo por lotes para incubar los cultivos por lotes y por lote alimentado. Se usa una concentración de esporas de $2,10^9$ esporas/l para la inoculación del pre-cultivo por lotes a pH 2,5. Las esporas se

25 obtienen mediante la propagación de esporas liofilizadas en 29 g de arroz al cual se le añaden los siguientes componentes: 6 ml de 15 g/l de sacarosa, 2,3 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1,0 g/l de KH_2PO_4 , 0,5 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,50 g/l de NaCl, 14,3 mg/l de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2,5 mg/l de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,50 mg/l de $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, y 13,8 mg/l de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Las esporas se propagan a 30 °C durante 7-14 días para proporcionar una capa negra de esporas sobre los granos de arroz, y se recogen añadiendo 100 ml de Tween 20 del 0,1 % en agua estéril. Para todas las condiciones, el gas se esteriliza mediante filtración antes de introducirlo en el biorreactor. El gas de salida se conduce a través de un condensador enfriado a menos de -8 °C y se analiza su contenido volumétrico de CO_2 y O_2 por medio de un

30 analizador de gases acústico.

Cultivos en quimiostato

En los cultivos en quimiostato, las células se pueden cultivar, por ejemplo, en fermentadores de laboratorio Biostat B de un volumen de trabajo de 1,5 L a 30 °C y 500 rpm. Se mantiene un pH constante de 6,0 mediante la adición automática de KOH 10 M, y se obtienen las condiciones aerobias inyectando en el biorreactor aire a una velocidad de 1 vvm para asegurar que el DOT es mayor del 80%. La velocidad de dilución (D) se puede ajustar a diferentes valores, p.ej. a $0,050 \text{ h}^{-1}$, $0,10 \text{ h}^{-1}$, $0,15 \text{ h}^{-1}$, o $0,20 \text{ h}^{-1}$. El pH se mantienen constante, p.ej. a 6,6, mediante la adición automática de KOH 10 M, mediante el uso de un medio de cultivo mínimo con los componentes siguientes: 2,5 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,75 g/l de KH_2PO_4 , 1,0 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g/l de NaCl, 0,1 g/l de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,1 ml/l de antiespumante de Sigma, 7,2 mg/l de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,3 mg/l de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0,3 mg/l de $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 3,5 mg/l de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y 6,9 mg/l de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. La concentración de glucosa se puede ajustar a diferentes valores, p.ej. es 3,0 g/l, 6,0 g/l, 12,0 g/l, 15,0 g/l o 18,0 g/l. El biorreactor se inocula con micelio libre de un pre-cultivo por lotes como se describió anteriormente, y la bomba de alimentación se enciende al final de la fase de crecimiento exponencial.

45 Para todas las condiciones, el gas se esteriliza mediante filtración antes de introducirlo en el biorreactor. El gas de salida se conduce a través de un condensador enfriado a menos de -8 °C y se analiza su contenido volumétrico de CO_2 y O_2 por medio de un analizador de gases acústico.

Se considera que los cultivos están en estado estacionario después de al menos 5 tiempos de residencia, y si las concentraciones de biomasa y glucosa y la composición del gas de salida permanecen sin cambios (menos del 5% de desviación relativa) a lo largo de los dos últimos tiempos de residencia.

50

Ejemplo 33

Extracción y análisis de resveratrol en Aspergillus niger y Aspergillus oryzae

La extracción y el análisis se llevan a cabo mediante el uso de los métodos descritos en los ejemplos 14 y 15.

REFERENCIAS

- Patente nº US-A-6521748
- Patente nº US-A-2001053847
- Patente nº US-A-2004059103
- 5 Patente nº US-A-2004023357
- Aoyama, Y., Yoshida, Y., Kubota, S., Kumaoka, H. y Furumichi, A. (1978). NADPH-cytochrome P-450 reductase of yeast microsomes. *Arch. Biochem. Biophys.* 185, 362-369.
- Becker JV, Armstrong GO, van der Merwe MJ, Lambrechts MG, Vivier MA, Pretorius IS. (2003). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the synthesis of the wine-related antioxidant resveratrol. *FEMS Yeast Res.* 4, 79-85.
- 10 Blanquet, S., Meunier, J. P., Minekus, M., Marol-Bonnin, S., y Alric, M. (2003). Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* Expressing P450 in Artificial Digestive Systems: a Model for Biodetoxication in the Human Digestive Environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2884-2892.
- 15 Celotti E y otros. (1996). Resveratrol content of some wines obtained from dried Valpolicella grapes: Recioto and Amarone. *Journal of Chromatography A* 730, 47-52.
- Cochrane, F.C., Davin, L.B. y Lewis N.G. (2004). The Arabidopsis phenylalanine ammonia lyase gene family: kinetic characterization of the four PAL isoforms. *Phytochemistry* 65, 1557-1564.
- Couzin, J. (2004) Aging Research's Family Feud. *Science* 303, 1276-1279.
- 20 Ehlting, J., Büttner, D., Wang, Q., Douglas, C.J., Somssich, I.E. y Kombrink, E. (1999). Three 4-coumarate: coenzyme A ligases in *Arabidopsis thaliana* represents two evolutionary divergent classes in angiosperms. *The plant journal.* 19, 9-20.
- Filpula, D., Vaslet, C.A., Levy, A., Sykes, A. y Strausberg, R.L. Nucleotide sequence of gene for phenylalanine ammonia-lyase from *Rhodotorula rubra*. (1988). *Nucleic Acids Res.* 16, 11381.
- 25 Gehm, B.D., McAndrews, J.M., Chien, P.Y. y Jameson, J.L. (1997). Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 14138-14143.
- Gems, D., Johnstone, I.L. y Clutterbuck, A.J. (1991). An autonomously replicating plasmid transforms *Aspergillus nidulans* at high frequency. *Gene* 98, 61-67.
- Hain, R., Reif, H.J., Krause, E., Langebartels, R., Kindl, H., Vornam, B., Wiese, W., Schmelzer, E., Schreier, P.H., Stocker, R.H. y Stenzel, K. (1993). Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature* 361, 153-156.
- 30 Hwang EI, Kaneko M, Ohnishi Y, Horinouchi S. (2003). Production of plant-specific flavanones by *Escherichia coli* containing an artificial gene cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2699-706.
- Huang, M-T. (1997). Diet for cancer prevention. *Food Sci.* 24, 713-727
- 35 Hart, J. H. (1981) *Annu. Rev. Phytopathology* 19, 437-458. Hart, J. H., Shrimpton, D. M. (1979) *Phytopathology* 69, 1138-1143.
- Hall, S.S. (2003) In *Vino Vitalis?* Compounds Activate Life-Extending Genes. *Science* 301, 1165.
- Hamberger, B. y Hahlbrock, K. (2004). The 4-coumarate:CoA ligase gene family in *Arabidopsis thaliana* comprises one rare, sinapate-activating and three commonly occurring isoenzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101, 2209-2214.
- 40 Jang, M., Cai, L., Udeani, GO., Slowing, KV., Thomas, CF., Beecher, CWW., Fong, HHS., Farnsworth, NR., Kinghorn, AD., Mehta, RG., Moon, RC., Pezzuto, JM. (1997). Cancer Chemopreventive Activity of Resveratrol, a Natural Product Derived from Grapes. *Science* 275, 218-220.
- 45 Jeandet, P. Bessis, R., Maume, B.F., Meunier, P., Peyron, D. y Trollat, P. (1995). Effect of Enological Practices on the Resveratrol Isomer Content of Wine *J. Agric. Food Chem.* 43, 316-319.
- Jeandet, P. Bessis, R., Sbaghi, M. y Meunier, P. (1994). Occurrence of a resveratrol R-D-glucoside in wine:

Preliminary studies. *Vitis* 33, 183-184.

Koopmann, E., Logemann, E. y Hahlbrock, K. (1999). Regulation and Functional Expression of Cinnamate 4-Hydroxylase from Parsley. *Plant Physiol.* 119, 49-55.

5 Kopp, P. (1998). Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the "French Paradox"? *Eur. J. Endocrinol.* 138, 619-620.

Kyndt JA, Meyer TE, Cusanovich MA, Van Beeumen JJ. (2002). Characterization of a bacterial tyrosine ammonia lyase, a biosynthetic enzyme for the photoactive yellow protein. *FEBS Lett.* 512, 240-244.

LaGrange, D.C., Pretorius, I.S. y Van Zyl, W.H. (1997). Cloning of the *Bacillus pumilus* beta-xylosidase gene (*xynB*) and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47, 262-266.

10 Lin X., Kaul S., Rounsley S.D., Shea T.P., Benito M.-I., Town C.D., Fujii C.Y., Mason T.M., Bowman C.L., Barnstead M.E., Feldblyum T.V., Buell C.R., Ketchum K.A., Lee J.J., Ronning C.M., Koo H.L., Moffat K.S., Cronin L.A., Shen M., Pai G., Van Aken S., Umayam L., Tallon L.J., Gill J.E., Adams M.D., Carrera A.J., Creasy T.H., Goodman H.M., Somerville C.R., Copenhaver G.P., Preuss D., Nierman W.C., White O., Eisen J.A., Salzberg S.L., Fraser C.M., Venter J.C. (1999). Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 402, 761-768.

15 Lobo, R.A. (1995). Benefits and risks of estrogen replacement therapy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 173, 982-989.

Martin, V.J.J., Pitera, D.J., Withers, S.T., Newman, J.D. y Keasling, J.D. (2003). Engineering a mevalonate pathway in *Escherichia coli* for production of terpenoids. *Nature biotechnology* 21, 796-802.

Mizutani, M., Ohta, D. y Sato, R. (1997). Isolation of a cDNA and a genomic clone encoding cinnamate 4-hydroxylase from *Arabidopsis* and its expression manner in planta. *Plant Physiol.* 113, 755-763.

20 Ro, D.K., Mah, N., Ellis, B.E. y Douglas, C.J. (2001). Functional Characterization and Subcellular Localization of Poplar (*Populus trichocarpa* x *Populus deltoides*) Cinnamate 4-Hydroxylase. *Plant Physiol.* 126, 317-329.

Ro D.K., Douglas C.J. (2004). Reconstitution of the entry point of plant phenylpropanoid metabolism in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*): implications for control of metabolic flux into the phenylpropanoid pathway. *J. Biol. Chem.* 279, 2600-2607.

25 Rosler J, Krekel F, Amrhein N, Schmid J. (1997). Maize phenylalanine ammonia-lyase has tyrosine ammonia-lyase activity. *Plant Physiol.* 113, 175-179. activity. *Plant physiol.* 113, 175-179.

Samappito, S., Page, J.E., Schmidt, J., De-Eknamkul, W. y Kutchan, T.M. (2003). Aromatic and pyrone polyketides synthesized by a stilbene synthase from *Rheum tataricum*. *Phytochemistry* 62, 313-323.

30 Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor, N.Y.

Schoppner, A.; Kindl, H. (1984) Purification and properties of a stilbene synthase from induced cell suspension cultures of peanut. *J. Biol. Chem.* 259, 6806-6811.

Seshime, Y., Juvvadi, P.R., Fujii, I. y Kitamoto, K. (2005). Genomic evidences for the existence of a phenylpropanoid metabolic pathway in *Aspergillus oryzae*. *Biochem Biophys Res Commun.* 337, 747-51.

35 Urban P., Mignotte, C., Kazmaier M., Delorme F. y Pompon D. (1997). Cloning, Yeast Expression, and Characterization of the Coupling of Two Distantly Related *Arabidopsis thaliana* NADPH-Cytochrome 450 Reductases with P450 CYP73A5. *J. Biol. Chem.* 272, 19176-19186.

Watts, K.T., Lee, P.C. y Schmidt-Dannert, C. (2004). Exploring recombinant flavonoid biosynthesis in metabolically engineered *Escherichia coli*. *ChemBiochem* 5, 500-507.

40 Lo siguiente es un resumen de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos que aparecen en la presente memoria:

SEQ ID N°: 1 es una secuencia de nucleótidos de *Arabidopsis thaliana* que codifica una fenilalanina amoniaco liasa (PAL2).

SEQ ID N°: 2 es la secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID N°: 1.

45 SEQ ID N°: 3 es una secuencia de nucleótidos de *Arabidopsis thaliana* que codifica una cinamato 4-hidroxilasa (C4H).

SEQ ID N°: 4 es la secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID N°: 3.

SEQ ID N°: 5 es una secuencia de nucleótidos de *Arabidopsis thaliana* que codifica una 4-cumarato:CoenzimaA

ligasa (4CL1).

SEQ ID N°: 6 es la secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID N°: 5.

SEQ ID N°: 7 es una secuencia de nucleótidos de *Rheum tataricum* que codifica una resveratrol sintasa (VST).

SEQ ID N°: 8 es la secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID N°: 7.

- 5 SEQ ID N°: 9 es una secuencia de nucleótidos de *Rheum tataricum* que codifica una resveratrol sintasa (VST), que tiene optimizados los codones para la expresión en *S. cerevisiae*.

SEQ ID N°: 10 es la secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID N°: 9.

SEQ ID N°: 11 es una secuencia de nucleótidos de *Rhodobacter capsulatus* que codifica una tirosina amoniaco liasa (TAL).

- 10 SEQ ID N°: 12 es la secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID N°: 11.

SEQ ID N°: 13 es una secuencia de nucleótidos de *Rhodobacter capsulatus* que codifica una tirosina amoniaco liasa (TAL), que tiene optimizados los codones para la expresión en *S. cerevisiae*.

SEQ ID N°: 14 es la secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID N°: 13.

- 15 SEQ ID N°: 15 es una secuencia de nucleótidos de *S. cerevisiae* que codifica una NADPH:citocromo P450 reductasa (CPR1).

SEQ ID N°: 16 es la secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID N°: 15.

SEQ ID N°: 17 es una secuencia de nucleótidos de *Arabidopsis thalianus* que codifica una NADPH:citocromo P450 reductasa (AR2).

SEQ ID N°: 18 es la secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID N°: 17.

- 20 SEQ ID N°s 19-32 son las secuencias de los cebadores que aparecen en la Tabla 1, Ejemplo 1.

SEQ ID N°s 33-34 son las secuencias de los cebadores que aparecen en el Ejemplo 16.

SEQ ID N°s 35-38 son las secuencias de los cebadores que aparecen en el Ejemplo 17

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110>	Fluxome Sciences A/S	
5	<120>	CÉLULAS MODIFICADAS MEDIANTE INGENIERÍA GENÉTICA DESDE EL PUNTO DE VISTA METABÓLICO PARA LA PRODUCCIÓN DE RESVERATROL O UN DERIVADO DEL MISMO OLIGOMÉRICO O CON UNIÓN GLUCOSÍDICA	
	<130>	PJS/P10686WO	
	<150>	GB0503657.9	
	<151>	22-02-2005	
10	<160>	38	
	<170>	Patent In versión 3.3	
	<210>	1	
	<211>	2154	
	<212>	ADN	
15	<213>	Arabidopsis thaliana	
	<400>	1	
		atggatcaaa tcgaagcaat gttgtgcggc ggaggagaga agacaaaagt ggcggttact	60
		acgaagactt tggcagatcc attgaattgg ggttagcag cggatcaaat gaaaggaagt	120
		catttagatg aagtgaagaa gatggtcgaa gagtatcgta gaccagtcgt gaatcttggc	180
		ggagaaacac tgacgatcgg acaagttgct gccatctcca ccgtaggagg cagcgttaag	240
		gttgagttag cggagacttc aagagccggg gtgaaagcta gcagtgattg ggttatggag	300
		agcatgaaca aaggtactga cagttacgga gtcaccaccg gctttggtgc tacttctcac	360
		cggagaacca aaaacggcac cgcattacaa acagaactca ttagatTTTT gaacgccgga	420
		atattcggaa acacgaagga gacatgtcac aactgccgc aatccgccac aagagccgcc	480
		atgctcgtca gagtcaacac tcttctccaa ggatactccg ggatccgatt cgagatcctc	540
		gaagcgatta caagtctcct caaccacaac atctctccgt cactacctct ccgtggaacc	600
		attaccgctt ccggcgatct cgttctcttc tttacatcg ccggacttct caccggccgt	660
		cctaattcca aagccaccgg tcccgaacgg gaatcgctaa ccgcgaaaga agcttttgag	720
		aaagccggaa tcagtactgg attcttcgat ttacaacctt aggaaggttt agctctcgtt	780
		aatggcacgg cggttggatc tggaatggcg tcgatggttc tattcgaagc gaatgtccaa	840
		gcggtgtag cggaggtttt atcagcgcgc ttcgcggagg ttatgagcgg gaaacctgag	900
		ttaccgatc atctgactca tcgtttaaaa catcatcccg gacaaatcga agcggcggcg	960
		ataatggagc acatactcga cggaaactca tacatgaaat tagctcaaaa ggttcacgag	1020
		atggatccat tgcagaaacc aaaacaagat cgttacgctc ttogtacatc tctcaatgg	1080
		ctaggctctc aaattgaagt aatccgtcaa gctacgaaat cgatagagcg tgaaatcaac	1140

ES 2 397 282 T3

tccgttaacg ataatccggt gatcgatggt tcgaggaaca aggcgattca cggtggtaac 1200
 ttccaaggaa caccaatcgg agtttctatg gataaacacga gattggcgat tgctgcgatt 1260
 gggaagctaa tgtttgctca attctctgag cttgttaatg atttctacaa caatggactt 1320
 ccttcgaatc taactgcttc gagtaatcca agtttggatt atggattcaa aggagcagag 1380
 attgctatgg cttcttattg ttctgagctt caatacttgg ctaatccagt cacaagccat 1440
 gttcaatcag ctgagcaaca taatcaagat gtgaactctc ttggtttgat ctcgctctcg 1500
 aaaacatctg aagctgtgga tattcttaag ctaatgtcaa caacgttctt tgtggggata 1560
 tgtcaagctg ttgatttgag acatttggag gagaatctga gacaaactgt gaagaacaca 1620
 gtttctcaag ttgctaagaa agtggttaacc actggaatca acggtgagtt acatccgtca 1680
 aggttttgcg agaaggactt gcttaagggt gttgatcgtg agcaagtgtt cacgtatgtg 1740
 gatgatcctt gtagcgctac gtaccggtt atgcagagac taagacaagt tattgttgat 1800
 cacgctttgt ccaacggtga gactgagaag aatgcagtga cttcgatctt tcaaaagatt 1860
 ggagcttttg aagaggagct taaggctgtg cttccaaagg aagttgaagc ggctagagcg 1920
 gcttatggga atggaactgc gccgattcct aaccggatta aggaatgtag gtcgtatccg 1980
 ttgtataggt tcgtgagggg agagcttggg acgaagttgt tgactggaga aaaggttgtg 2040
 tctccgggag aggagtttga taaggctctc actgctatgt gtgaaggtaa acttattgat 2100
 ccgttgatgg attgtctcaa ggaatggaac ggagctccga ttccgatttg ctaa 2154

<210> 2

<211> 717

<212> PRT

5 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

Met Asp Gln Ile Glu Ala Met Leu Cys Gly Gly Gly Glu Lys Thr Lys
 1 5 10 15

Val Ala Val Thr Thr Lys Thr Leu Ala Asp Pro Leu Asn Trp Gly Leu
 20 25 30

Ala Ala Asp Gln Met Lys Gly Ser His Leu Asp Glu Val Lys Lys Met
 35 40 45

Val Glu Glu Tyr Arg Arg Pro Val Val Asn Leu Gly Gly Glu Thr Leu
 50 55 60

ES 2 397 282 T3

Thr Ile Gly Gln Val Ala Ala Ile Ser Thr Val Gly Gly Ser Val Lys
 65 70 75 80
 Val Glu Leu Ala Glu Thr Ser Arg Ala Gly Val Lys Ala Ser Ser Asp
 85 90 95
 Trp Val Met Glu Ser Met Asn Lys Gly Thr Asp Ser Tyr Gly Val Thr
 100 105 110
 Thr Gly Phe Gly Ala Thr Ser His Arg Arg Thr Lys Asn Gly Thr Ala
 115 120 125
 Leu Gln Thr Glu Leu Ile Arg Phe Leu Asn Ala Gly Ile Phe Gly Asn
 130 135 140
 Thr Lys Glu Thr Cys His Thr Leu Pro Gln Ser Ala Thr Arg Ala Ala
 145 150 155 160
 Met Leu Val Arg Val Asn Thr Leu Leu Gln Gly Tyr Ser Gly Ile Arg
 165 170 175
 Phe Glu Ile Leu Glu Ala Ile Thr Ser Leu Leu Asn His Asn Ile Ser
 180 185 190
 Pro Ser Leu Pro Leu Arg Gly Thr Ile Thr Ala Ser Gly Asp Leu Val
 195 200 205
 Pro Leu Ser Tyr Ile Ala Gly Leu Leu Thr Gly Arg Pro Asn Ser Lys
 210 215 220
 Ala Thr Gly Pro Asp Gly Glu Ser Leu Thr Ala Lys Glu Ala Phe Glu
 225 230 235 240
 Lys Ala Gly Ile Ser Thr Gly Phe Phe Asp Leu Gln Pro Lys Glu Gly
 245 250 255
 Leu Ala Leu Val Asn Gly Thr Ala Val Gly Ser Gly Met Ala Ser Met
 260 265 270
 Val Leu Phe Glu Ala Asn Val Gln Ala Val Leu Ala Glu Val Leu Ser
 275 280 285
 Ala Ile Phe Ala Glu Val Met Ser Gly Lys Pro Glu Phe Thr Asp His
 290 295 300

ES 2 397 282 T3

Leu Thr His Arg Leu Lys His His Pro Gly Gln Ile Glu Ala Ala Ala
 305 310 315 320

Ile Met Glu His Ile Leu Asp Gly Ser Ser Tyr Met Lys Leu Ala Gln
 325 330 335

Lys Val His Glu Met Asp Pro Leu Gln Lys Pro Lys Gln Asp Arg Tyr
 340 345 350

Ala Leu Arg Thr Ser Pro Gln Trp Leu Gly Pro Gln Ile Glu Val Ile
 355 360 365

Arg Gln Ala Thr Lys Ser Ile Glu Arg Glu Ile Asn Ser Val Asn Asp
 370 375 380

Asn Pro Leu Ile Asp Val Ser Arg Asn Lys Ala Ile His Gly Gly Asn
 385 390 395 400

Phe Gln Gly Thr Pro Ile Gly Val Ser Met Asp Asn Thr Arg Leu Ala
 405 410 415

Ile Ala Ala Ile Gly Lys Leu Met Phe Ala Gln Phe Ser Glu Leu Val
 420 425 430

Asn Asp Phe Tyr Asn Asn Gly Leu Pro Ser Asn Leu Thr Ala Ser Ser
 435 440 445

Asn Pro Ser Leu Asp Tyr Gly Phe Lys Gly Ala Glu Ile Ala Met Ala
 450 455 460

Ser Tyr Cys Ser Glu Leu Gln Tyr Leu Ala Asn Pro Val Thr Ser His
 465 470 475 480

Val Gln Ser Ala Glu Gln His Asn Gln Asp Val Asn Ser Leu Gly Leu
 485 490 495

Ile Ser Ser Arg Lys Thr Ser Glu Ala Val Asp Ile Leu Lys Leu Met
 500 505 510

Ser Thr Thr Phe Leu Val Gly Ile Cys Gln Ala Val Asp Leu Arg His
 515 520 525

Leu Glu Glu Asn Leu Arg Gln Thr Val Lys Asn Thr Val Ser Gln Val
 530 535 540

ES 2 397 282 T3

Ala Lys Lys Val Leu Thr Thr Gly Ile Asn Gly Glu Leu His Pro Ser
545 550 555 560

Arg Phe Cys Glu Lys Asp Leu Leu Lys Val Val Asp Arg Glu Gln Val
565 570 575

Phe Thr Tyr Val Asp Asp Pro Cys Ser Ala Thr Tyr Pro Leu Met Gln
580 585 590

Arg Leu Arg Gln Val Ile Val Asp His Ala Leu Ser Asn Gly Glu Thr
595 600 605

Glu Lys Asn Ala Val Thr Ser Ile Phe Gln Lys Ile Gly Ala Phe Glu
610 615 620

Glu Glu Leu Lys Ala Val Leu Pro Lys Glu Val Glu Ala Ala Arg Ala
625 630 635 640

Ala Tyr Gly Asn Gly Thr Ala Pro Ile Pro Asn Arg Ile Lys Glu Cys
645 650 655

Arg Ser Tyr Pro Leu Tyr Arg Phe Val Arg Glu Glu Leu Gly Thr Lys
660 665 670

Leu Leu Thr Gly Glu Lys Val Val Ser Pro Gly Glu Glu Phe Asp Lys
675 680 685

Val Phe Thr Ala Met Cys Glu Gly Lys Leu Ile Asp Pro Leu Met Asp
690 695 700

Cys Leu Lys Glu Trp Asn Gly Ala Pro Ile Pro Ile Cys
705 710 715

<210> 3

<211> 1518

<212> ADN

5 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 3

atggacctcc tcttgctgga gaagtcttta atcgccgtct tcgtggcggt gattctcgcc 60
acggtgattt caaagctccg cggcaagaaa ttgaagctac ctccaggtec tataccaatt 120
ccgatcttcg gaaactggct tcaagtcgga gatgatctca accaccgtaa tctcgtcgat 180
tacgctaaga aattcggcga tctcttctct ctccgtatgg gtcagcgaaa cctagtcgtc 240

ES 2 397 282 T3

gtctcctcac cggatctaac aaaggaagtg ctctcactc aaggcgttga gtttggatcc 300
 agaacgagaa acgtcgtggt cgacattttc accgggaaag gtcaagatat ggtgttcact 360
 gtttacggcg agcattggag gaagatgaga agaatcatga cggttccttt cttcaccaac 420
 aaagtgttc aacagaatcg tgaaggttgg gagtttgaag cagctagtgt tgttgaagat 480
 gttaagaaga atccagattc tgctacgaaa ggaatcgtgt tgaggaaacg tttgcaattg 540
 atgatgtata acaatatggt ccgtatcatg ttcgatagaa gatttgagag tgaggatgat 600
 cctcttttcc ttaggcttaa ggctttgaat ggtgagagaa gtcgattagc tcagagcttt 660
 gagtataact atggagattt cattcctatc cttagaccat tcctcagagg ctatttgaag 720
 atttgtcaag atgtgaaaga tcgaagaatc gctcttttca agaagtactt tgttgatgag 780
 aggaagcaaa ttgcgagttc taagcctaca ggtagtgaag gattgaaatg tgccattgat 840
 cacatccttg aagctgagca gaagggagaa atcaacgagg acaatgttct ttacatcgtc 900
 gagaacatca atgtcgccgc gattgagaca acattgtggt ctatcgagtg ggaattgca 960
 gagctagtga accatcctga aatccagagt aagctaagga acgaactcga cacagttctt 1020
 ggaccgggtg tgcaagtcac cgagcctgat cttcacaac ttccatacct tcaagctgtg 1080
 gttaaggaga ctcttcgtct gagaatggcg attcctctcc tcgtgcctca catgaacctc 1140
 catgatgcca agctcgctgg ctacgatatc ccagcagaaa gcaaaatcct tgттаatgct 1200
 tgggtggctag caaacaacc caacagctgg aagaagcctg aagagtttag accagagagg 1260
 ttctttgaag aagaatcgca cgtggaagct aacggtaatg acttcaggta tgtgccattt 1320
 ggtgttgac gtcgaagctg tcccgggatt atattggcat tgcctatfff ggggatcacc 1380
 attggtagga tgggtccagaa cttcgagctt cttcctcctc caggacagtc taaagtggat 1440
 actagtgaga aaggtggaca attcagcttg cacatcctta accactccat aatcgttatg 1500
 aaaccaagga actgttaa 1518

<210> 4
 <211> 505
 <212> PRT
 5 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 4

Met Asp Leu Leu Leu Leu Glu Lys Ser Leu Ile Ala Val Phe Val Ala
 1 5 10 15

Val Ile Leu Ala Thr Val Ile Ser Lys Leu Arg Gly Lys Lys Leu Lys
 20 25 30

ES 2 397 282 T3

Leu Pro Pro Gly Pro Ile Pro Ile Pro Ile Phe Gly Asn Trp Leu Gln
 35 40 45
 Val Gly Asp Asp Leu Asn His Arg Asn Leu Val Asp Tyr Ala Lys Lys
 50 55 60
 Phe Gly Asp Leu Phe Leu Leu Arg Met Gly Gln Arg Asn Leu Val Val
 65 70 75 80
 Val Ser Ser Pro Asp Leu Thr Lys Glu Val Leu Leu Thr Gln Gly Val
 85 90 95
 Glu Phe Gly Ser Arg Thr Arg Asn Val Val Phe Asp Ile Phe Thr Gly
 100 105 110
 Lys Gly Gln Asp Met Val Phe Thr Val Tyr Gly Glu His Trp Arg Lys
 115 120 125
 Met Arg Arg Ile Met Thr Val Pro Phe Phe Thr Asn Lys Val Val Gln
 130 135 140
 Gln Asn Arg Glu Gly Trp Glu Phe Glu Ala Ala Ser Val Val Glu Asp
 145 150 155 160
 Val Lys Lys Asn Pro Asp Ser Ala Thr Lys Gly Ile Val Leu Arg Lys
 165 170 175
 Arg Leu Gln Leu Met Met Tyr Asn Asn Met Phe Arg Ile Met Phe Asp
 180 185 190
 Arg Arg Phe Glu Ser Glu Asp Asp Pro Leu Phe Leu Arg Leu Lys Ala
 195 200 205
 Leu Asn Gly Glu Arg Ser Arg Leu Ala Gln Ser Phe Glu Tyr Asn Tyr
 210 215 220
 Gly Asp Phe Ile Pro Ile Leu Arg Pro Phe Leu Arg Gly Tyr Leu Lys
 225 230 235 240
 Ile Cys Gln Asp Val Lys Asp Arg Arg Ile Ala Leu Phe Lys Lys Tyr
 245 250 255
 Phe Val Asp Glu Arg Lys Gln Ile Ala Ser Ser Lys Pro Thr Gly Ser

ES 2 397 282 T3

260					265					270					
Glu	Gly	Leu	Lys	Cys	Ala	Ile	Asp	His	Ile	Leu	Glu	Ala	Glu	Gln	Lys
		275					280					285			
Gly	Glu	Ile	Asn	Glu	Asp	Asn	Val	Leu	Tyr	Ile	Val	Glu	Asn	Ile	Asn
	290					295					300				
Val	Ala	Ala	Ile	Glu	Thr	Thr	Leu	Trp	Ser	Ile	Glu	Trp	Gly	Ile	Ala
305					310					315					320
Glu	Leu	Val	Asn	His	Pro	Glu	Ile	Gln	Ser	Lys	Leu	Arg	Asn	Glu	Leu
				325					330					335	
Asp	Thr	Val	Leu	Gly	Pro	Gly	Val	Gln	Val	Thr	Glu	Pro	Asp	Leu	His
			340					345					350		
Lys	Leu	Pro	Tyr	Leu	Gln	Ala	Val	Val	Lys	Glu	Thr	Leu	Arg	Leu	Arg
		355					360					365			
Met	Ala	Ile	Pro	Leu	Leu	Val	Pro	His	Met	Asn	Leu	His	Asp	Ala	Lys
	370					375					380				
Leu	Ala	Gly	Tyr	Asp	Ile	Pro	Ala	Glu	Ser	Lys	Ile	Leu	Val	Asn	Ala
385					390					395					400
Trp	Trp	Leu	Ala	Asn	Asn	Pro	Asn	Ser	Trp	Lys	Lys	Pro	Glu	Glu	Phe
				405					410					415	
Arg	Pro	Glu	Arg	Phe	Phe	Glu	Glu	Glu	Ser	His	Val	Glu	Ala	Asn	Gly
			420					425					430		
Asn	Asp	Phe	Arg	Tyr	Val	Pro	Phe	Gly	Val	Gly	Arg	Arg	Ser	Cys	Pro
		435					440					445			
Gly	Ile	Ile	Leu	Ala	Leu	Pro	Ile	Leu	Gly	Ile	Thr	Ile	Gly	Arg	Met
	450					455					460				
Val	Gln	Asn	Phe	Glu	Leu	Leu	Pro	Pro	Pro	Gly	Gln	Ser	Lys	Val	Asp
465					470					475					480
Thr	Ser	Glu	Lys	Gly	Gly	Gln	Phe	Ser	Leu	His	Ile	Leu	Asn	His	Ser
				485					490					495	

ES 2 397 282 T3

Ile Ile Val Met Lys Pro Arg Asn Cys
 500 505

<210> 5
 <211> 1686
 <212> ADN
 5 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 5
 atggcgccac aagaacaagc agtttctcag gtgatggaga aacagagcaa caacaacaac 60
 agtgacgtca ttttccgatc aaagttaccg gatatttaca tcccgaacca cctatctctc 120
 cacgactaca tcttcaaaa catctccgaa ttcgccacta agccttgctt aatcaacgga 180
 ccaaccggcc acgtgtacac ttactccgac gtccacgtca tctcccgcca aatcgccgcc 240
 aattttcaca aactcggcgt taacccaaac gacgtcgtca tgctctctct cccaaaactgt 300
 cccgaattcg tcctctcttt cctcgcgcgc tccttccgcg gcgcaaccgc caccgcccga 360
 aaccctttct tcaactccggc ggagatagct aaacaagcca aagcctccaa cacccaaactc 420
 ataatcaccg aagctcgtta cgtcgcacaaa atcaaaccac ttcaaaacga cgacggagta 480
 gtcacgtctt gcacgcgacg caacgaatcc gtgccaatcc ctgaaggctg cctccgcttc 540
 accgagttga ctcagtcgac aaccgaggca tcagaagtca tcgactcggg ggagatttca 600
 ccggacgacg tgggtggcact accttactcc tctggcacga cgggattacc aaaaggagtg 660
 atgctgactc acaagggact agtcacgagc gttgctcagc aagtcgacgg cgagaacccg 720
 aatctttatt tccacagcga tgacgtcata ctctgtgttt tgcccatggt tcatatctac 780
 gctttgaact cgatcatggt gtgtggtctt agagttggtg cggcgattct gataatgccg 840
 aagtttgaga tcaatctgct attggagctg atccagaggt gtaaagtgac ggtggctccg 900
 atggttccgc cgattgtggt ggccattgcg aagtcttcgg agacggagaa gtatgatttg 960
 agctcgataa gagtggtgaa atctggtgct gctcctcttg gtaaagaact tgaagatgcc 1020
 gttaatgcca agtttcctaa tgccaaactc ggtcagggat acggaatgac ggaagcaggt 1080
 ccagtgctag caatgtcgtt aggttttgca aaggaacctt ttccggttaa gtcaggagct 1140
 tgtgggtactg ttgtaagaaa tgctgagatg aaaatagttg atccagacac cggagattct 1200
 ctttcgagga atcaaccggg tgagatttgt attcgtggtc accagatcat gaaaggttac 1260
 ctcaacaatc cggcagctac agcagagacc attgataaag acggttggct tcatactgga 1320
 gatattggat tgatcgatga cgatgacgag cttttcatcg ttgatcgatt gaaagaactt 1380
 atcaagtata aaggttttca ggtagctccg gctgagctag aggctttgct catcgggtcat 1440
 cctgacatta ctgatgttgc tgttgtcgca atgaaagaag aagcagctgg tgaagttcct 1500

ES 2 397 282 T3

gttgcaattg tggtgaaatc gaaggattcg gagttatcag aagatgatgt gaagcaattc 1560
 gtgtcgaaac aggttgtggt ttacaagaga atcaacaaag tgtttcttcac tgaatccatt 1620
 cctaaagctc catcagggaa gatattgagg aaagatctga gggcaaaact agcaaatgga 1680
 ttgtga 1686

<210> 6
 <211> 561
 <212> PRT
 5 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 6

Met Ala Pro Gln Glu Gln Ala Val Ser Gln Val Met Glu Lys Gln Ser
 1 5 10 15

Asn Asn Asn Asn Ser Asp Val Ile Phe Arg Ser Lys Leu Pro Asp Ile
 20 25 30

Tyr Ile Pro Asn His Leu Ser Leu His Asp Tyr Ile Phe Gln Asn Ile
 35 40 45

Ser Glu Phe Ala Thr Lys Pro Cys Leu Ile Asn Gly Pro Thr Gly His
 50 55 60

Val Tyr Thr Tyr Ser Asp Val His Val Ile Ser Arg Gln Ile Ala Ala
 65 70 75 80

Asn Phe His Lys Leu Gly Val Asn Gln Asn Asp Val Val Met Leu Leu
 85 90 95

Leu Pro Asn Cys Pro Glu Phe Val Leu Ser Phe Leu Ala Ala Ser Phe
 100 105 110

Arg Gly Ala Thr Ala Thr Ala Ala Asn Pro Phe Phe Thr Pro Ala Glu
 115 120 125

Ile Ala Lys Gln Ala Lys Ala Ser Asn Thr Lys Leu Ile Ile Thr Glu
 130 135 140

Ala Arg Tyr Val Asp Lys Ile Lys Pro Leu Gln Asn Asp Asp Gly Val
 145 150 155 160

Val Ile Val Cys Ile Asp Asp Asn Glu Ser Val Pro Ile Pro Glu Gly
 165 170 175

ES 2 397 282 T3

Cys Leu Arg Phe Thr Glu Leu Thr Gln Ser Thr Thr Glu Ala Ser Glu
 180 185 190

Val Ile Asp Ser Val Glu Ile Ser Pro Asp Asp Val Val Ala Leu Pro
 195 200 205

Tyr Ser Ser Gly Thr Thr Gly Leu Pro Lys Gly Val Met Leu Thr His
 210 215 220

Lys Gly Leu Val Thr Ser Val Ala Gln Gln Val Asp Gly Glu Asn Pro
 225 230 235 240

Asn Leu Tyr Phe His Ser Asp Asp Val Ile Leu Cys Val Leu Pro Met
 245 250 255

Phe His Ile Tyr Ala Leu Asn Ser Ile Met Leu Cys Gly Leu Arg Val
 260 265 270

Gly Ala Ala Ile Leu Ile Met Pro Lys Phe Glu Ile Asn Leu Leu Leu
 275 280 285

Glu Leu Ile Gln Arg Cys Lys Val Thr Val Ala Pro Met Val Pro Pro
 290 295 300

Ile Val Leu Ala Ile Ala Lys Ser Ser Glu Thr Glu Lys Tyr Asp Leu
 305 310 315 320

Ser Ser Ile Arg Val Val Lys Ser Gly Ala Ala Pro Leu Gly Lys Glu
 325 330 335

Leu Glu Asp Ala Val Asn Ala Lys Phe Pro Asn Ala Lys Leu Gly Gln
 340 345 350

Gly Tyr Gly Met Thr Glu Ala Gly Pro Val Leu Ala Met Ser Leu Gly
 355 360 365

Phe Ala Lys Glu Pro Phe Pro Val Lys Ser Gly Ala Cys Gly Thr Val
 370 375 380

Val Arg Asn Ala Glu Met Lys Ile Val Asp Pro Asp Thr Gly Asp Ser
 385 390 395 400

Leu Ser Arg Asn Gln Pro Gly Glu Ile Cys Ile Arg Gly His Gln Ile

ES 2 397 282 T3

				405						410						415
Met	Lys	Gly	Tyr	Leu	Asn	Asn	Pro	Ala	Ala	Thr	Ala	Glu	Thr	Ile	Asp	
			420					425					430			
Lys	Asp	Gly	Trp	Leu	His	Thr	Gly	Asp	Ile	Gly	Leu	Ile	Asp	Asp	Asp	
		435					440					445				
Asp	Glu	Leu	Phe	Ile	Val	Asp	Arg	Leu	Lys	Glu	Leu	Ile	Lys	Tyr	Lys	
	450					455					460					
Gly	Phe	Gln	Val	Ala	Pro	Ala	Glu	Leu	Glu	Ala	Leu	Leu	Ile	Gly	His	
465					470					475					480	
Pro	Asp	Ile	Thr	Asp	Val	Ala	Val	Val	Ala	Met	Lys	Glu	Glu	Ala	Ala	
				485					490					495		
Gly	Glu	Val	Pro	Val	Ala	Phe	Val	Val	Lys	Ser	Lys	Asp	Ser	Glu	Leu	
			500					505					510			
Ser	Glu	Asp	Asp	Val	Lys	Gln	Phe	Val	Ser	Lys	Gln	Val	Val	Phe	Tyr	
		515					520					525				
Lys	Arg	Ile	Asn	Lys	Val	Phe	Phe	Thr	Glu	Ser	Ile	Pro	Lys	Ala	Pro	
	530					535					540					
Ser	Gly	Lys	Ile	Leu	Arg	Lys	Asp	Leu	Arg	Ala	Lys	Leu	Ala	Asn	Gly	
545					550					555					560	

Leu

<210> 7

<211> 1176

<212> ADN

5 <213> Rheum tataricum

<400> 7

atggcaccgg	aggagtccag	gcatgctgaa	actgcagtta	acagagccgc	caccgtcctg	60
gccatcggca	ctgccaacc	gccaaactgc	tactatcaag	cggactttcc	tgacttctac	120
ttcogtgcca	ccaacagcga	ccacctcag	cacctcaagc	aaaaatttaa	gcgcatattgt	180
gagaaatcga	tgattgaaaa	acgttatctc	catttgacgg	aagaaattct	caaggagaat	240
ccaaatattg	cttccttcga	ggcgccatca	ttggatgtaa	gacataacat	tcaagtgaaa	300

ES 2 397 282 T3

gaagtgggtgc tgctcggaaa agaggcagct ttgaaggcca tcaatgagtg gggccaaccc 360
aagtcaaaga tcacgcgcct cattgtgtgt tgtattgccg gcgttgacat gcccggcgca 420
gactatcaac tcactaaact ccttggetta caactttctg ttaagcgatt tatgttttac 480
cacctaggat gctatgccgg tggcacgctc cttcgccttg cgaaggacat agcagaaaac 540
aacaaggaag ctcgtgttct catcgttcgc tctgagatga cgccaatctg tttccgtggg 600
ccatccgaaa cccacataga ctccatggta gggcaagcaa tatttggatga cggtgctgcy 660
gctgttatag ttggtgcaaa tcccgcacta tccatcgaaa ggccgatttt cgagttgatt 720
tctacatccc aaactatcat acctgaatcc gatgggtgcga ttgagggaca tttgcttgaa 780
gttggactca gtttccaact ctaccagact gttccctcat taatctctaa ttgtatcgaa 840
acttgtcttt caaaggcttt cacacctctt aacattagtg attggaactc actattctgg 900
attgcacacc ctggtggccg tgctatcctt gacgatatcg aggctactgt tggctcctcaag 960
aaggagaaac ttaaggcaac aagacaagtt ttgaacgact atgggaacat gtcaagtgtc 1020
tgcgtatttt tcatcatgga tgagatgagg aagaagtcgc tcgcaaacgg tcaagtaacc 1080
actggagaag gactcaagtg ggggtgttctt tttgggttcg ggccaggtgt tactgtggaa 1140
actgtggttc taagcagtgt gccgctaatt acctga 1176

<210> 8
<211> 391
<212> PRT
5 <213> Rheum tataricum

<400> 8

Met Ala Pro Glu Glu Ser Arg His Ala Glu Thr Ala Val Asn Arg Ala
1 5 10 15

Ala Thr Val Leu Ala Ile Gly Thr Ala Asn Pro Pro Asn Cys Tyr Tyr
20 25 30

Gln Ala Asp Phe Pro Asp Phe Tyr Phe Arg Ala Thr Asn Ser Asp His
35 40 45

Leu Thr His Leu Lys Gln Lys Phe Lys Arg Ile Cys Glu Lys Ser Met
50 55 60

Ile Glu Lys Arg Tyr Leu His Leu Thr Glu Glu Ile Leu Lys Glu Asn
65 70 75 80

Pro Asn Ile Ala Ser Phe Glu Ala Pro Ser Leu Asp Val Arg His Asn

ES 2 397 282 T3

				85						90						95
Ile	Gln	Val	Lys	Glu	Val	Val	Leu	Leu	Gly	Lys	Glu	Ala	Ala	Leu	Lys	
			100					105						110		
Ala	Ile	Asn	Glu	Trp	Gly	Gln	Pro	Lys	Ser	Lys	Ile	Thr	Arg	Leu	Ile	
		115					120					125				
Val	Cys	Cys	Ile	Ala	Gly	Val	Asp	Met	Pro	Gly	Ala	Asp	Tyr	Gln	Leu	
	130					135					140					
Thr	Lys	Leu	Leu	Gly	Leu	Gln	Leu	Ser	Val	Lys	Arg	Phe	Met	Phe	Tyr	
145					150					155					160	
His	Leu	Gly	Cys	Tyr	Ala	Gly	Gly	Thr	Val	Leu	Arg	Leu	Ala	Lys	Asp	
				165					170					175		
Ile	Ala	Glu	Asn	Asn	Lys	Glu	Ala	Arg	Val	Leu	Ile	Val	Arg	Ser	Glu	
			180					185						190		
Met	Thr	Pro	Ile	Cys	Phe	Arg	Gly	Pro	Ser	Glu	Thr	His	Ile	Asp	Ser	
		195					200					205				
Met	Val	Gly	Gln	Ala	Ile	Phe	Gly	Asp	Gly	Ala	Ala	Ala	Val	Ile	Val	
	210					215					220					
Gly	Ala	Asn	Pro	Asp	Leu	Ser	Ile	Glu	Arg	Pro	Ile	Phe	Glu	Leu	Ile	
225					230					235					240	
Ser	Thr	Ser	Gln	Thr	Ile	Ile	Pro	Glu	Ser	Asp	Gly	Ala	Ile	Glu	Gly	
				245						250				255		
His	Leu	Leu	Glu	Val	Gly	Leu	Ser	Phe	Gln	Leu	Tyr	Gln	Thr	Val	Pro	
			260					265					270			
Ser	Leu	Ile	Ser	Asn	Cys	Ile	Glu	Thr	Cys	Leu	Ser	Lys	Ala	Phe	Thr	
		275					280					285				
Pro	Leu	Asn	Ile	Ser	Asp	Trp	Asn	Ser	Leu	Phe	Trp	Ile	Ala	His	Pro	
	290					295					300					
Gly	Gly	Arg	Ala	Ile	Leu	Asp	Asp	Ile	Glu	Ala	Thr	Val	Gly	Leu	Lys	
305					310					315					320	

ES 2 397 282 T3

Lys Glu Lys Leu Lys Ala Thr Arg Gln Val Leu Asn Asp Tyr Gly Asn
 325 330 335

Met Ser Ser Ala Cys Val Phe Phe Ile Met Asp Glu Met Arg Lys Lys
 340 345 350

Ser Leu Ala Asn Gly Gln Val Thr Thr Gly Glu Gly Leu Lys Trp Gly
 355 360 365

Val Leu Phe Gly Phe Gly Pro Gly Val Thr Val Glu Thr Val Val Leu
 370 375 380

Ser Ser Val Pro Leu Ile Thr
 385 390

- <210> 9
- <211> 1176
- <212> ADN
- 5 <213> Rheum tataricum

<400> 9

atggccccag aagagagcag gcacgcagaa acggccgtta acagagctgc aactgttttg 60
 gctattggta cggccaatcc acccaattgt tactatcaag ctgactttcc tgatttttat 120
 ttcagagcca caaatagcga tcatttgact catcttaagc aaaaatttaa aaggatatgc 180
 gagaagtcca tgattgaaaa gagatacttg caccttaccg aagagatctt aaaagaaaac 240
 ccaaatatag cttcttttga agctccctcc ttagatgtac gtcacaacat tcaagtcaag 300
 gaggtggttt tacttggtaa ggaagccgca ttgaaagcta taaacgaatg gggacagcct 360
 aaaagtaaga taaccagatt gatcgtatgt tgcatagctg gcgttgacat gcctggtgca 420
 gattatcaac taacaaaatt gctgggtcta caattatccg taaaaagggt tatgttctac 480
 catttaggct gttacgctgg tggcacagtt ttaagactgg ctaaggatat agcagaaaat 540
 aacaaggagg ctagagtctt aatagtgcgt agtgaaatga ctctatttg ctttagaggt 600
 ccatcagaaa cacatatcga cagcatggta ggtcaggcaa ttttcggtga tgggtgctgca 660
 gccgtaattg tgggagctaa tcctgattta agtatcgaaa gacctathtt tgaacttatt 720
 tctacttcgc aaaccattat ccccgaatca gatggtgcaa ttgaaggcca tttattggag 780
 gttggtttgt ctttcaatt gtatcagaca gtgccatctt taatttcaaa ctgtatagaa 840
 acctgtctaa gtaaagcatt tacaccatta aacatttctg actggaattc tttgttctgg 900
 attgctcatc caggtggaag agccatctta gatgacatcg aagctactgt gggactgaaa 960
 aaggaaaaac taaaagctac tagacaagtt ttaaagact acggtaatat gtcactgct 1020

ES 2 397 282 T3

tgtgtatntt tcattatgga tgagatgaga aaaaagtcac ttgcaaattg ccaggtcacg 1080

acaggtgagg gtctaaaatg gggagtecta ttccgattcg gccaggtgt cactgttgaa 1140

accgttggtcc tgtcttcggt tccattgatc acttaa 1176

<210> 10
 <211> 391
 <212> PRT
 5 <213> Rheum tataricum

<400> 10

Met Ala Pro Glu Glu Ser Arg His Ala Glu Thr Ala Val Asn Arg Ala
 1 5 10 15

Ala Thr Val Leu Ala Ile Gly Thr Ala Asn Pro Pro Asn Cys Tyr Tyr
 20 25 30

Gln Ala Asp Phe Pro Asp Phe Tyr Phe Arg Ala Thr Asn Ser Asp His
 35 40 45

Leu Thr His Leu Lys Gln Lys Phe Lys Arg Ile Cys Glu Lys Ser Met
 50 55 60

Ile Glu Lys Arg Tyr Leu His Leu Thr Glu Glu Ile Leu Lys Glu Asn
 65 70 75 80

Pro Asn Ile Ala Ser Phe Glu Ala Pro Ser Leu Asp Val Arg His Asn
 85 90 95

Ile Gln Val Lys Glu Val Val Leu Leu Gly Lys Glu Ala Ala Leu Lys
 100 105 110

Ala Ile Asn Glu Trp Gly Gln Pro Lys Ser Lys Ile Thr Arg Leu Ile
 115 120 125

Val Cys Cys Ile Ala Gly Val Asp Met Pro Gly Ala Asp Tyr Gln Leu
 130 135 140

Thr Lys Leu Leu Gly Leu Gln Leu Ser Val Lys Arg Phe Met Phe Tyr
 145 150 155 160

His Leu Gly Cys Tyr Ala Gly Gly Thr Val Leu Arg Leu Ala Lys Asp
 165 170 175

ES 2 397 282 T3

Ile Ala Glu Asn Asn Lys Glu Ala Arg Val Leu Ile Val Arg Ser Glu
 180 185 190

Met Thr Pro Ile Cys Phe Arg Gly Pro Ser Glu Thr His Ile Asp Ser
 195 200 205

Met Val Gly Gln Ala Ile Phe Gly Asp Gly Ala Ala Ala Val Ile Val
 210 215 220

Gly Ala Asn Pro Asp Leu Ser Ile Glu Arg Pro Ile Phe Glu Leu Ile
 225 230 235 240

Ser Thr Ser Gln Thr Ile Ile Pro Glu Ser Asp Gly Ala Ile Glu Gly
 245 250 255

His Leu Leu Glu Val Gly Leu Ser Phe Gln Leu Tyr Gln Thr Val Pro
 260 265 270

Ser Leu Ile Ser Asn Cys Ile Glu Thr Cys Leu Ser Lys Ala Phe Thr
 275 280 285

Pro Leu Asn Ile Ser Asp Trp Asn Ser Leu Phe Trp Ile Ala His Pro
 290 295 300

Gly Gly Arg Ala Ile Leu Asp Asp Ile Glu Ala Thr Val Gly Leu Lys
 305 310 315 320

Lys Glu Lys Leu Lys Ala Thr Arg Gln Val Leu Asn Asp Tyr Gly Asn
 325 330 335

Met Ser Ser Ala Cys Val Phe Phe Ile Met Asp Glu Met Arg Lys Lys
 340 345 350

Ser Leu Ala Asn Gly Gln Val Thr Thr Gly Glu Gly Leu Lys Trp Gly
 355 360 365

Val Leu Phe Gly Phe Gly Pro Gly Val Thr Val Glu Thr Val Val Leu
 370 375 380

Ser Ser Val Pro Leu Ile Thr
 385 390

<210> 11
 <211> 1596

ES 2 397 282 T3

<212> ADN
 <213> Rhodobacter capsulatus

<400> 11

atgaccctgc agtcacagac ggccaaggac tgcctcgcgc tggacggggc gctgacactt 60
 gtccaatgcg aggccatcgc gacacatcgc agccggattt cggtgacccc cgcgctgcgc 120
 gagcgtcgcg cgcgggcccga tgcccggctt gagcacgcca tcgcccagca gcgccacatt 180
 tacggcatca ccaccggctt cggcccgcgtg gcgaaccgtc tgatcggggc cgatcagggg 240
 gcggagctgc agcagaacct gatctatcat ctggccaccg gcgtcggggc gaaactgagc 300
 tgggccgagg cgcgggcggt gatgctggcg cggctcaact cgatcctgca aggcgcgtcg 360
 ggggcctcgc cggagacgat cgaccggatc gttgcgggtg tcaatgcggg gtttgcccc 420
 gaggttcogg cgcagggaac ggtgggcgcc tcgggcgatc tgaccccgt tgcgcatatg 480
 gtgctggcgc tgcagggacg ggggcggatg atcgaccctt cgggcgcgt gcaggaggcc 540
 ggggcgggtga tggatcggt ctgcggcggc ccgctgacgc tggcggcccg tgacgggctg 600
 gcgctggtga atggcacctc ggcgatgacc gcgattgcgg ccctgaccgg ggtcagggcg 660
 gcgcgggcga tcgacgcgc gcttcggcac agcgcggtcc tgatggaggt cttgtccggt 720
 catgocgaag cctggcatcc ggctttcgca gagctgcgcc cgcacccgg gcagctgcgg 780
 gcgaccgagc ggctggcgca ggcgctggat ggggcggggc gggctctgctg gaccctgacc 840
 gcggcgcggc ggctgaccgc cgcggatctg cggcccgaag atcatccggc gcaggatgcc 900
 tacagtctgc gcgtggtgcc gcaactggtc ggcgcggctt gggacacgct ggactggcac 960
 gatcgtgctg tcacctgcga gctcaattcc gtcaccgaca atccgatctt tcccaggggc 1020
 tgcgcgggtg cgcacctgca cggcggcaat ttcattggcg tgcatgtcgc ccttgccctcc 1080
 gatgcgctga acgcggcgt ggtgacgctg gcgggcctgg tcgagcgtca gatcgcccgg 1140
 ctgaccgacg aaaagctgaa caagggcctg cccgccttcc tgcacggggg gcaggcgggg 1200
 ctgcaatcgg gcttcatggg ggcgcaggtc acggcgacgg cgcttctggc ggaaatgcgg 1260
 gcgaatgcca cgcgggttc ggtgcagtcg ctgtcgacca atggcgcaa tcaggatgtg 1320
 gtctcgatgg gaacgattgc cgcgcggagg gcgcgggcgc agctgctgcc cctgtcgcag 1380
 atccaggoga tcctggcgt tgccttgcc caggcgatgg atctgcttga cgaccccag 1440
 gggcaggccg gatggtcgt tacggcgcgg gatctgcggg accggatccg ggcggtctcg 1500
 cccgggcttc gcgccgacag accgcttgc gggcatatcg aagcgggtggc acagggtctg 1560
 cgatcatcct ccgcgcgcgc cgatcccccg gcatga 1596

5 <210> 12
 <211> 531
 <212> PRT
 <213> Rhodobacter capsulatus

ES 2 397 282 T3

<400> 12

Met Thr Leu Gln Ser Gln Thr Ala Lys Asp Cys Leu Ala Leu Asp Gly
1 5 10 15

Ala Leu Thr Leu Val Gln Cys Glu Ala Ile Ala Thr His Arg Ser Arg
20 25 30

Ile Ser Val Thr Pro Ala Leu Arg Glu Arg Cys Ala Arg Ala His Ala
35 40 45

Arg Leu Glu His Ala Ile Ala Glu Gln Arg His Ile Tyr Gly Ile Thr
50 55 60

Thr Gly Phe Gly Pro Leu Ala Asn Arg Leu Ile Gly Ala Asp Gln Gly
65 70 75 80

Ala Glu Leu Gln Gln Asn Leu Ile Tyr His Leu Ala Thr Gly Val Gly
85 90 95

Pro Lys Leu Ser Trp Ala Glu Ala Arg Ala Leu Met Leu Ala Arg Leu
100 105 110

Asn Ser Ile Leu Gln Gly Ala Ser Gly Ala Ser Pro Glu Thr Ile Asp
115 120 125

Arg Ile Val Ala Val Leu Asn Ala Gly Phe Ala Pro Glu Val Pro Ala
130 135 140

Gln Gly Thr Val Gly Ala Ser Gly Asp Leu Thr Pro Leu Ala His Met
145 150 155 160

Val Leu Ala Leu Gln Gly Arg Gly Arg Met Ile Asp Pro Ser Gly Arg
165 170 175

Val Gln Glu Ala Gly Ala Val Met Asp Arg Leu Cys Gly Gly Pro Leu
180 185 190

Thr Leu Ala Ala Arg Asp Gly Leu Ala Leu Val Asn Gly Thr Ser Ala
195 200 205

Met Thr Ala Ile Ala Ala Leu Thr Gly Val Glu Ala Ala Arg Ala Ile

ES 2 397 282 T3

210						215						220					
Asp 225	Ala	Ala	Leu	Arg	His 230	Ser	Ala	Val	Leu	Met 235	Glu	Val	Leu	Ser	Gly 240		
His	Ala	Glu	Ala	Trp 245	His	Pro	Ala	Phe	Ala 250	Glu	Leu	Arg	Pro	His 255	Pro		
Gly	Gln	Leu	Arg 260	Ala	Thr	Glu	Arg	Leu 265	Ala	Gln	Ala	Leu	Asp 270	Gly	Ala		
Gly	Arg	Val 275	Cys	Arg	Thr	Leu	Thr 280	Ala	Ala	Arg	Arg	Leu 285	Thr	Ala	Ala		
Asp 290	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp 295	His	Pro	Ala	Gln	Asp 300	Ala	Tyr	Ser	Leu	Arg		
Val 305	Val	Pro	Gln	Leu	Val 310	Gly	Ala	Val	Trp	Asp 315	Thr	Leu	Asp	Trp	His 320		
Asp	Arg	Val	Val	Thr 325	Cys	Glu	Leu	Asn	Ser 330	Val	Thr	Asp	Asn	Pro	Ile 335		
Phe	Pro	Glu	Gly 340	Cys	Ala	Val	Pro	Ala 345	Leu	His	Gly	Gly	Asn 350	Phe	Met		
Gly	Val	His 355	Val	Ala	Leu	Ala	Ser 360	Asp	Ala	Leu	Asn	Ala 365	Ala	Leu	Val		
Thr 370	Leu	Ala	Gly	Leu	Val	Glu 375	Arg	Gln	Ile	Ala	Arg 380	Leu	Thr	Asp	Glu		
Lys 385	Leu	Asn	Lys	Gly	Leu 390	Pro	Ala	Phe	Leu	His 395	Gly	Gly	Gln	Ala	Gly 400		
Leu	Gln	Ser	Gly	Phe 405	Met	Gly	Ala	Gln	Val 410	Thr	Ala	Thr	Ala	Leu	Leu 415		
Ala	Glu	Met	Arg 420	Ala	Asn	Ala	Thr	Pro 425	Val	Ser	Val	Gln	Ser 430	Leu	Ser		
Thr	Asn	Gly 435	Ala	Asn	Gln	Asp 440	Val	Val	Ser	Met	Gly	Thr 445	Ile	Ala	Ala		

ES 2 397 282 T3

Arg Arg Ala Arg Ala Gln Leu Leu Pro Leu Ser Gln Ile Gln Ala Ile
 450 455 460

Leu Ala Leu Ala Leu Ala Gln Ala Met Asp Leu Leu Asp Asp Pro Glu
 465 470 475 480

Gly Gln Ala Gly Trp Ser Leu Thr Ala Arg Asp Leu Arg Asp Arg Ile
 485 490 495

Arg Ala Val Ser Pro Gly Leu Arg Ala Asp Arg Pro Leu Ala Gly His
 500 505 510

Ile Glu Ala Val Ala Gln Gly Leu Arg His Pro Ser Ala Ala Ala Asp
 515 520 525

Pro Pro Ala
 530

- <210> 13
- <211> 1596
- <212> ADN
- 5 <213> Rhodobacter capsulatus

<400> 13

```

atgaccctgc aatctcaaac agctaaagat tgtttggctt tggatggtgc cttgacatta      60
gttcaatgcg aagcgatagc aacccataga agtagaatct ctgtaacacc agccctacgt      120
gagagatgtg ctagagcaca tgctaggtta gaacatgcaa tagccgaaca gcgacacata      180
tatgggataa cgacaggctt cgggccactt gctaacaggc tgatcggagc agaccagggt      240
gctgaattac aacagaacct tatctacat ttggcaaccg gagttggccc caaattatca      300
tgggccgaag ccagagcttt aatgctcgtc cgtttgaata gtatactaca aggtgcttct      360
ggtgctagcc ctgaaacaat tgataggatc gttgcagtct taaatgccgg atttgccccg      420
gaagtccag cccaaggaac cgttggtgct tcgggtgact taactcogtt agcacacatg      480
gtattagcat tgcaaggcag aggtcgtatg attgatcctt caggagagat tcaagaagcc      540
ggcgctgtca tggatagggt gtgtggaggc ctttaacat tggctgccag agatggcctc      600
gccttagtaa atggtacatc tgccatgaca gctattgccg cattgaccgg tgtggaggct      660
gcaagagcga ttgatgcagc gcttagacat tccgcagtct tgatggagggt cctgtcaggg      720
catgctgagg cttggcaccc tgcctttgcg gaattgcgtc cgcacccagg acaattacgc      780
gccactgaga ggtagctca agcattggac ggcgaggta gactctgccg gactcttaca      840
gccgctagge gtctaactgc agctgatctg agaccagaag atcatocagc tcaagatgca      900
    
```

ES 2 397 282 T3

tattcacttc gagtagttcc tcagctgggt ggtgccgtat gggatacggt ggattggcac 960
gacagggttg tgacttgcca acttaactcc gtgaccgaca atccaatttt ccccgagggt 1020
tgtgcggttc cagcactaca cggtggaaac tttatgggcg tacatgtggc actagcttct 1080
gacgctttaa atgcagcgtt ggttacatta gctggcttag ttgaaaggca gattgcaaga 1140
cttactgatg agaagttgaa taagggtttg cctgcttttt tgcattggagg ccaagcaggt 1200
ttacaatcag gtttcatggg agctcaggtt actgctactg ctttgctagc ggaaatgaga 1260
gctaacgcga ctcccgtgtc cgttcaaagc ctcagcacca atggtgcaaa tcaagacgtg 1320
gtaagtatgg gtacgattgc cgcgagacga gcaagagctc aacttttacc tctgtctcaa 1380
atccaagcga ttttggcact ggctcttgca caagccatgg atctcctaga cgatcctgaa 1440
ggacaagccg gttggtcctt aacggcaaga gatttaagag accgtatacg ggctgtcagt 1500
ccagggttgc gcgcagatag accactagcg ggtcatattg aagctgtggc tcaaggtcta 1560
agacaccct cggcagctgc cgatccacct gcttaa 1596

<210> 14

<211> 531

<212> PRT

5 <213> Rhodobacter capsulatus

<400> 14

Met Thr Leu Gln Ser Gln Thr Ala Lys Asp Cys Leu Ala Leu Asp Gly
1 5 10 15

Ala Leu Thr Leu Val Gln Cys Glu Ala Ile Ala Thr His Arg Ser Arg
20 25 30

Ile Ser Val Thr Pro Ala Leu Arg Glu Arg Cys Ala Arg Ala His Ala
35 40 45

Arg Leu Glu His Ala Ile Ala Glu Gln Arg His Ile Tyr Gly Ile Thr
50 55 60

Thr Gly Phe Gly Pro Leu Ala Asn Arg Leu Ile Gly Ala Asp Gln Gly
65 70 75 80

Ala Glu Leu Gln Gln Asn Leu Ile Tyr His Leu Ala Thr Gly Val Gly
85 90 95

Pro Lys Leu Ser Trp Ala Glu Ala Arg Ala Leu Met Leu Ala Arg Leu
100 105 110

ES 2 397 282 T3

Asn Ser Ile Leu Gln Gly Ala Ser Gly Ala Ser Pro Glu Thr Ile Asp
 115 120 125

Arg Ile Val Ala Val Leu Asn Ala Gly Phe Ala Pro Glu Val Pro Ala
 130 135 140

Gln Gly Thr Val Gly Ala Ser Gly Asp Leu Thr Pro Leu Ala His Met
 145 150 155 160

Val Leu Ala Leu Gln Gly Arg Gly Arg Met Ile Asp Pro Ser Gly Arg
 165 170 175

Val Gln Glu Ala Gly Ala Val Met Asp Arg Leu Cys Gly Gly Pro Leu
 180 185 190

Thr Leu Ala Ala Arg Asp Gly Leu Ala Leu Val Asn Gly Thr Ser Ala
 195 200 205

Met Thr Ala Ile Ala Ala Leu Thr Gly Val Glu Ala Ala Arg Ala Ile
 210 215 220

Asp Ala Ala Leu Arg His Ser Ala Val Leu Met Glu Val Leu Ser Gly
 225 230 235 240

His Ala Glu Ala Trp His Pro Ala Phe Ala Glu Leu Arg Pro His Pro
 245 250 255

Gly Gln Leu Arg Ala Thr Glu Arg Leu Ala Gln Ala Leu Asp Gly Ala
 260 265 270

Gly Arg Val Cys Arg Thr Leu Thr Ala Ala Arg Arg Leu Thr Ala Ala
 275 280 285

Asp Leu Arg Pro Glu Asp His Pro Ala Gln Asp Ala Tyr Ser Leu Arg
 290 295 300

Val Val Pro Gln Leu Val Gly Ala Val Trp Asp Thr Leu Asp Trp His
 305 310 315 320

Asp Arg Val Val Thr Cys Glu Leu Asn Ser Val Thr Asp Asn Pro Ile
 325 330 335

Phe Pro Glu Gly Cys Ala Val Pro Ala Leu His Gly Gly Asn Phe Met

ES 2 397 282 T3

340 345 350

Gly Val His Val Ala Leu Ala Ser Asp Ala Leu Asn Ala Ala Leu Val
 355 360 365

Thr Leu Ala Gly Leu Val Glu Arg Gln Ile Ala Arg Leu Thr Asp Glu
 370 375 380

Lys Leu Asn Lys Gly Leu Pro Ala Phe Leu His Gly Gly Gln Ala Gly
 385 390 395 400

Leu Gln Ser Gly Phe Met Gly Ala Gln Val Thr Ala Thr Ala Leu Leu
 405 410 415

Ala Glu Met Arg Ala Asn Ala Thr Pro Val Ser Val Gln Ser Leu Ser
 420 425 430

Thr Asn Gly Ala Asn Gln Asp Val Val Ser Met Gly Thr Ile Ala Ala
 435 440 445

Arg Arg Ala Arg Ala Gln Leu Leu Pro Leu Ser Gln Ile Gln Ala Ile
 450 455 460

Leu Ala Leu Ala Leu Ala Gln Ala Met Asp Leu Leu Asp Asp Pro Glu
 465 470 475 480

Gly Gln Ala Gly Trp Ser Leu Thr Ala Arg Asp Leu Arg Asp Arg Ile
 485 490 495

Arg Ala Val Ser Pro Gly Leu Arg Ala Asp Arg Pro Leu Ala Gly His
 500 505 510

Ile Glu Ala Val Ala Gln Gly Leu Arg His Pro Ser Ala Ala Ala Asp
 515 520 525

Pro Pro Ala
 530

- <210> 15
- <211> 2076
- <212> ADN
- <213> Saccharomyces cerevisiae

5

<400> 15

atgccgtttg gaatagacaa caccgacttc actgtcctgg cggggctagt gcttgccgtg 60

ES 2 397 282 T3

ctactgtacg taaagagaaa ctccatcaag gaactgctga tgtccgatga cggagatata 120
acagctgtca gctcgggcaa cagagacatt gctcaggtgg tgaccgaaaa caacaagaac 180
tacttggtgt tgtatgcgtc gcagactggg actgccgagg attacgcaa aaagttttcc 240
aaggagctgg tggccaagtt caacctaaac gtgatgtgcg cagatgttga gaactacgac 300
tttgagtgc taaacgatgt gcccgtcata gtctcgattt ttatctctac atatggtgaa 360
ggagacttcc ccgacggggc ggtcaacttt gaagacttta tttgtaatgc ggaagcgggt 420
gcactatcga acctgaggta taatatgttt ggtctgggaa attctactta tgaattcttt 480
aatggtgccg ccaagaaggc cgagaagcat ctctccgccg cgggcgctat cagactaggc 540
aagctcggtg aagctgatga tgggtgcagga actacagacg aagattacat ggcttggag 600
gactccatcc tggaggtttt gaaagacgaa ctgcatttgg acgaacagga agccaagtcc 660
acctctcaat tccagtacac tgtgttgaac gaaatcactg actccatgtc gcttggtgaa 720
ccctctgctc actatttgcc ctgcacatcag ttgaaccgca acgcagacgg catccaattg 780
ggtcccttcg atttgtctca accgtatatt gcacccatcg tgaatctcg cgaactgttc 840
tcttccaatg accgtaattg catccactct gaatttgact tgtccggctc taacatcaag 900
tactccactg gtgaccatct tgctgtttgg ccttccaacc cattggaaaa ggtcgaacag 960
ttcttatcca tattcaacct ggaccctgaa accatttttg acttgaagcc cctggatccc 1020
accgtcaaag tgcccttccc aacgccaact actattggcg ctgctattaa aactatttg 1080
gaaattacag gacctgtctc cagacaattg ttttcatctt tgattcagtt cgcccccaac 1140
gctgacgtca aggaaaaatt gactctgctt togaaagaca aggaccaatt cgccgtcgag 1200
ataacctcca aatatttcaa catcgcagat gctctgaaat atttgtctga tggcgccaaa 1260
tgggacaccg taccatgca attcttggtc gaatcagttc cccaaatgac tctctgttac 1320
tactctatct ctctctctc tctgtctgaa aagcaaaccg tccatgtcac ctccattgtg 1380
gaaaactttc ctaaccaga attgcctgat gctcctccag ttgttggtgt tacgactaac 1440
ttgttaagaa acattcaatt ggctcaaac aatgttaaca ttgccgaaac taacctacct 1500
gttcaactag atttaaattg ccacgtaaa cttttcgcca attacaaatt gcccgccac 1560
gttcgtcgtt ctaactcag attgccttcc aacccttcca cccagttat catgatcggg 1620
ccaggatccg gtgttgcccc attccgtggg tttatcagag agcgtgtcgc gttctcga 1680
tcacaaaaga agggcggtaa caacgtttcg ctaggtaagc atatactgtt ttatggatcc 1740
cgtaacactg atgatttctt gtaccaggac gaatggccag aatacgcaa aaaattggat 1800
ggttcggttcg aatggtcgt ggccattcc aggttgccaa acacaaaaa agtttatggt 1860

ES 2 397 282 T3

caagataaat taaaggatta cgaagaccaa gtatttgaaa tgattaacaa cgggtgcattt 1920
 atctacgtct gtgggtgatgc aaaggggatg gcccaaggggtg tgtcaaccgc attggttggc 1980
 atcttatccc gtggtaaadc cattaccact gatgaagcaa cagagctaata caagatgctc 2040
 aagacttcag gtagatacca agaagatgctc tggtaa 2076

<210> 16

<211> 691

<212> PRT

5 <213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 16

Met Pro Phe Gly Ile Asp Asn Thr Asp Phe Thr Val Leu Ala Gly Leu
 1 5 10 15

Val Leu Ala Val Leu Leu Tyr Val Lys Arg Asn Ser Ile Lys Glu Leu
 20 25 30

Leu Met Ser Asp Asp Gly Asp Ile Thr Ala Val Ser Ser Gly Asn Arg
 35 40 45

Asp Ile Ala Gln Val Val Thr Glu Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Val Leu
 50 55 60

Tyr Ala Ser Gln Thr Gly Thr Ala Glu Asp Tyr Ala Lys Lys Phe Ser
 65 70 75 80

Lys Glu Leu Val Ala Lys Phe Asn Leu Asn Val Met Cys Ala Asp Val
 85 90 95

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

Ile Phe Ile Ser Thr Tyr Gly Glu Gly Asp Phe Pro Asp Gly Ala Val
 115 120 125

Asn Phe Glu Asp Phe Ile Cys Asn Ala Glu Ala Gly Ala Leu Ser Asn
 130 135 140

Leu Arg Tyr Asn Met Phe Gly Leu Gly Asn Ser Thr Tyr Glu Phe Phe
 145 150 155 160

Asn Gly Ala Ala Lys Lys Ala Glu Lys His Leu Ser Ala Ala Gly Ala
 165 170 175

ES 2 397 282 T3

Ile Arg Leu Gly Lys Leu Gly Glu Ala Asp Asp Gly Ala Gly Thr Thr
 180 185 190

Asp Glu Asp Tyr Met Ala Trp Lys Asp Ser Ile Leu Glu Val Leu Lys
 195 200 205

Asp Glu Leu His Leu Asp Glu Gln Glu Ala Lys Phe Thr Ser Gln Phe
 210 215 220

Gln Tyr Thr Val Leu Asn Glu Ile Thr Asp Ser Met Ser Leu Gly Glu
 225 230 235 240

Pro Ser Ala His Tyr Leu Pro Ser His Gln Leu Asn Arg Asn Ala Asp
 245 250 255

Gly Ile Gln Leu Gly Pro Phe Asp Leu Ser Gln Pro Tyr Ile Ala Pro
 260 265 270

Ile Val Lys Ser Arg Glu Leu Phe Ser Ser Asn Asp Arg Asn Cys Ile
 275 280 285

His Ser Glu Phe Asp Leu Ser Gly Ser Asn Ile Lys Tyr Ser Thr Gly
 290 295 300

Asp His Leu Ala Val Trp Pro Ser Asn Pro Leu Glu Lys Val Glu Gln
 305 310 315 320

Phe Leu Ser Ile Phe Asn Leu Asp Pro Glu Thr Ile Phe Asp Leu Lys
 325 330 335

Pro Leu Asp Pro Thr Val Lys Val Pro Phe Pro Thr Pro Thr Thr Ile
 340 345 350

Gly Ala Ala Ile Lys His Tyr Leu Glu Ile Thr Gly Pro Val Ser Arg
 355 360 365

Gln Leu Phe Ser Ser Leu Ile Gln Phe Ala Pro Asn Ala Asp Val Lys
 370 375 380

Glu Lys Leu Thr Leu Leu Ser Lys Asp Lys Asp Gln Phe Ala Val Glu
 385 390 395 400

Ile Thr Ser Lys Tyr Phe Asn Ile Ala Asp Ala Leu Lys Tyr Leu Ser

ES 2 397 282 T3

				405						410							415
Asp	Gly	Ala	Lys	Trp	Asp	Thr	Val	Pro	Met	Gln	Phe	Leu	Val	Glu	Ser		
			420					425					430				
Val	Pro	Gln	Met	Thr	Pro	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Ile	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Leu	
		435					440					445					
Ser	Glu	Lys	Gln	Thr	Val	His	Val	Thr	Ser	Ile	Val	Glu	Asn	Phe	Pro		
	450					455					460						
Asn	Pro	Glu	Leu	Pro	Asp	Ala	Pro	Pro	Val	Val	Gly	Val	Thr	Thr	Asn		
465					470					475					480		
Leu	Leu	Arg	Asn	Ile	Gln	Leu	Ala	Gln	Asn	Asn	Val	Asn	Ile	Ala	Glu		
				485					490					495			
Thr	Asn	Leu	Pro	Val	His	Tyr	Asp	Leu	Asn	Gly	Pro	Arg	Lys	Leu	Phe		
			500					505					510				
Ala	Asn	Tyr	Lys	Leu	Pro	Val	His	Val	Arg	Arg	Ser	Asn	Phe	Arg	Leu		
		515					520					525					
Pro	Ser	Asn	Pro	Ser	Thr	Pro	Val	Ile	Met	Ile	Gly	Pro	Gly	Thr	Gly		
	530					535					540						
Val	Ala	Pro	Phe	Arg	Gly	Phe	Ile	Arg	Glu	Arg	Val	Ala	Phe	Leu	Glu		
545					550					555					560		
Ser	Gln	Lys	Lys	Gly	Gly	Asn	Asn	Val	Ser	Leu	Gly	Lys	His	Ile	Leu		
				565					570					575			
Phe	Tyr	Gly	Ser	Arg	Asn	Thr	Asp	Asp	Phe	Leu	Tyr	Gln	Asp	Glu	Trp		
			580					585					590				
Pro	Glu	Tyr	Ala	Lys	Lys	Leu	Asp	Gly	Ser	Phe	Glu	Met	Val	Val	Ala		
		595					600					605					
His	Ser	Arg	Leu	Pro	Asn	Thr	Lys	Lys	Val	Tyr	Val	Gln	Asp	Lys	Leu		
	610					615					620						
Lys	Asp	Tyr	Glu	Asp	Gln	Val	Phe	Glu	Met	Ile	Asn	Asn	Gly	Ala	Phe		
625					630					635					640		

ES 2 397 282 T3

Ile Tyr Val Cys Gly Asp Ala Lys Gly Met Ala Lys Gly Val Ser Thr
 645 650 655

Ala Leu Val Gly Ile Leu Ser Arg Gly Lys Ser Ile Thr Thr Asp Glu
 660 665 670

Ala Thr Glu Leu Ile Lys Met Leu Lys Thr Ser Gly Arg Tyr Gln Glu
 675 680 685

Asp Val Trp
 690

- <210> 17
- <211> 2136
- <212> ADN
- 5 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 17

```

atgtcctctt cttcttcttc gtcaacctcc atgatcgatc tcatggcagc aatcatcaaa      60
ggagagcctg taattgtctc cgaccagct  aatgcctccg cttacgagtc cgtagctgct      120
gaattatcct ctatgcttat agagaatcgt caattcgcca tgattgttac cacttccatt      180
gctgtttotta ttggttgcac cgttatgctc gtttggagga gatccggttc tgggaattca      240
aaacgtgtcg agcctcttaa gcctttggtt attaagcctc gtgaggaaga gattgatgat      300
gggcgtaaga aagtaccat ctttttcggt acacaaactg gtactgctga aggttttgca      360
aaggctttag gagaagaagc taaagcaaga tatgaaaaga ccagattcaa aatcgttgat      420
ttggatgatt acgcggctga tgatgatgag tatgaggaga aattgaagaa agaggatgtg      480
gctttcttct tcttagccac atatggagat ggtgagccta ccgacaatgc agcgagattc      540
tacaaatggt tcaccgaggg gaatgacaga ggagaatggc ttaagaactt gaagtatgga      600
gtgtttgat taggaaacag acaatatgag cattttaata aggttgccaa agttgtagat      660
gacattcttg tcgaacaagg tgcacagcgt cttgtacaag ttggtcttgg agatgatgac      720
cagtgtattg aagatgactt taccgcttgg cgagaagcat tgtggcccga gcttgataca      780
atactgaggg aagaagggga tacagctggt gccacacat  aactgcagc tgtgttagaa      840
tacagagttt ctattcacga ctctgaagat gccaaattca atgatataaa catggcaaat      900
gggaatggtt aactgtggt  tgatgctcaa catccttaca aagcaaatgt cgctgttaaa      960
aggagcttc  atactcccga gtctgatcgt tcttgtatcc atttgggaatt tgacattgct     1020
ggaagtggac ttacgtatga aactggagat catgttggtg tactttgtga taacttaagt     1080
gaaactgtag atgaagctct tagattgctg gatatgtcac ctgatactta tttctcactt     1140
    
```

ES 2 397 282 T3

cacgctgaaa aagaagacgg cacaccaatc agcagctcac tgcctcctcc cttcccacct 1200
 tgcaacttga gaacagcgcct tacacgatat gcatgtcttt tgagttctcc aaagaagtct 1260
 gctttagttg cgttggtgc tcatgcatct gatcctaccg aagcagaacg attaaaacac 1320
 cttgcttcac ctgctggaaa ggatgaatat tcaaagtggg tagtagagag tcaaagaagt 1380
 ctacttgagg tgatggccga gtttccttca gccaaagccac cacttgggtgt cttcttcgct 1440
 ggagttgctc caaggttgca gcctagggtc tattcgatat catcatcgcc caagattgct 1500
 gaaactagaa ttcacgtcac atgtgactg gtttatgaga aaatgccaac tggcaggatt 1560
 cataagggag tgtgttcac ttggatgaag aatgctgtgc cttacgagaa gagtgaaaac 1620
 tgttctcgcg cgccgatatt tgtaggcaa tccaacttca agcttcttc tgattctaag 1680
 gtaccgatca tcatgatcgg tccagggact ggattagctc cattcagagg attccttcag 1740
 gaaagactag cgttggtaga atctgggtgt gaacttgggc catcagtttt gttctttgga 1800
 tgcagaaacc gtagaatgga tttcatctac gaggaagagc tccagcgatt tgttgagagt 1860
 ggtgctctcg cagagctaag tgtcgccttc tctcgtgaag gaccaccaa agaatacgta 1920
 cagcacaaga tgatggacaa ggcttctgat atctggaata tgatctctca aggagcttat 1980
 ttatatgttt gtggtgacgc caaaggcatg gcaagagatg ttcacagatc tctccacaca 2040
 atagctcaag aacaggggtc aatggattca actaaagcag agggcttcgt gaagaatctg 2100
 caaacgagtg gaagatatct tagagatgta tggtaa 2136

<210> 18
 <211> 711
 <212> PRT
 5 <213> Arabidopsis thaliana
 <400> 18

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

ES 2 397 282 T3

Gly Cys Ile Val Met Leu Val Trp Arg Arg Ser Gly Ser Gly Asn Ser
65 70 75 80

Lys Arg Val Glu Pro Leu Lys Pro Leu Val Ile Lys Pro Arg Glu Glu
85 90 95

Glu Ile Asp Asp Gly Arg Lys Lys Val Thr Ile Phe Phe Gly Thr Gln
100 105 110

Thr Gly Thr Ala Glu Gly Phe Ala Lys Ala Leu Gly Glu Glu Ala Lys
115 120 125

Ala Arg Tyr Glu Lys Thr Arg Phe Lys Ile Val Asp Leu Asp Asp Tyr
130 135 140

Ala Ala Asp Asp Asp Glu Tyr Glu Glu Lys Leu Lys Lys Glu Asp Val
145 150 155 160

Ala Phe Phe Phe Leu Ala Thr Tyr Gly Asp Gly Glu Pro Thr Asp Asn
165 170 175

Ala Ala Arg Phe Tyr Lys Trp Phe Thr Glu Gly Asn Asp Arg Gly Glu
180 185 190

Trp Leu Lys Asn Leu Lys Tyr Gly Val Phe Gly Leu Gly Asn Arg Gln
195 200 205

Tyr Glu His Phe Asn Lys Val Ala Lys Val Val Asp Asp Ile Leu Val
210 215 220

Glu Gln Gly Ala Gln Arg Leu Val Gln Val Gly Leu Gly Asp Asp Asp
225 230 235 240

Gln Cys Ile Glu Asp Asp Phe Thr Ala Trp Arg Glu Ala Leu Trp Pro
245 250 255

Glu Leu Asp Thr Ile Leu Arg Glu Glu Gly Asp Thr Ala Val Ala Thr
260 265 270

Pro Tyr Thr Ala Ala Val Leu Glu Tyr Arg Val Ser Ile His Asp Ser
275 280 285

Glu Asp Ala Lys Phe Asn Asp Ile Asn Met Ala Asn Gly Asn Gly Tyr
290 295 300

ES 2 397 282 T3

Thr Val Phe Asp Ala Gln His Pro Tyr Lys Ala Asn Val Ala Val Lys
305 310 315 320

Arg Glu Leu His Thr Pro Glu Ser Asp Arg Ser Cys Ile His Leu Glu
325 330 335

Phe Asp Ile Ala Gly Ser Gly Leu Thr Tyr Glu Thr Gly Asp His Val
340 345 350

Gly Val Leu Cys Asp Asn Leu Ser Glu Thr Val Asp Glu Ala Leu Arg
355 360 365

Leu Leu Asp Met Ser Pro Asp Thr Tyr Phe Ser Leu His Ala Glu Lys
370 375 380

Glu Asp Gly Thr Pro Ile Ser Ser Ser Leu Pro Pro Pro Phe Pro Pro
385 390 395 400

Cys Asn Leu Arg Thr Ala Leu Thr Arg Tyr Ala Cys Leu Leu Ser Ser
405 410 415

Pro Lys Lys Ser Ala Leu Val Ala Leu Ala Ala His Ala Ser Asp Pro
420 425 430

Thr Glu Ala Glu Arg Leu Lys His Leu Ala Ser Pro Ala Gly Lys Asp
435 440 445

Glu Tyr Ser Lys Trp Val Val Glu Ser Gln Arg Ser Leu Leu Glu Val
450 455 460

Met Ala Glu Phe Pro Ser Ala Lys Pro Pro Leu Gly Val Phe Phe Ala
465 470 475 480

Gly Val Ala Pro Arg Leu Gln Pro Arg Phe Tyr Ser Ile Ser Ser Ser
485 490 495

Pro Lys Ile Ala Glu Thr Arg Ile His Val Thr Cys Ala Leu Val Tyr
500 505 510

Glu Lys Met Pro Thr Gly Arg Ile His Lys Gly Val Cys Ser Thr Trp
515 520 525

Met Lys Asn Ala Val Pro Tyr Glu Lys Ser Glu Asn Cys Ser Ser Ala
530 535 540

ES 2 397 282 T3

Pro Ile Phe Val Arg Gln Ser Asn Phe Lys Leu Pro Ser Asp Ser Lys
545 550 555 560

Val Pro Ile Ile Met Ile Gly Pro Gly Thr Gly Leu Ala Pro Phe Arg
565 570 575

Gly Phe Leu Gln Glu Arg Leu Ala Leu Val Glu Ser Gly Val Glu Leu
580 585 590

Gly Pro Ser Val Leu Phe Phe Gly Cys Arg Asn Arg Arg Met Asp Phe
595 600 605

Ile Tyr Glu Glu Glu Leu Gln Arg Phe Val Glu Ser Gly Ala Leu Ala
610 615 620

Glu Leu Ser Val Ala Phe Ser Arg Glu Gly Pro Thr Lys Glu Tyr Val
625 630 635 640

Gln His Lys Met Met Asp Lys Ala Ser Asp Ile Trp Asn Met Ile Ser
645 650 655

Gln Gly Ala Tyr Leu Tyr Val Cys Gly Asp Ala Lys Gly Met Ala Arg
660 665 670

Asp Val His Arg Ser Leu His Thr Ile Ala Gln Glu Gln Gly Ser Met
675 680 685

Asp Ser Thr Lys Ala Glu Gly Phe Val Lys Asn Leu Gln Thr Ser Gly
690 695 700

Arg Tyr Leu Arg Asp Val Trp
705 710

<210> 19
<211> 33
<212> ADN
5 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 19
cggaattctc atggatcaaa tcgaagcaat gtt 33

<210> 20
<211> 29
10 <212> ADN
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 20
cgactagttt agcaaatcgg aatcggagc 29

	<210> 21	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Arabidopsis thaliana	
5	<400> 21	
	cgctcgagat atggacctcc tcttgctgga	30
	<210> 22	
	<211> 32	
	<212> ADN	
10	<213> Arabidopsis thaliana	
	<400> 22	
	cgggtacctt aacagttcct tggttcata ac	32
	<210> 23	
	<211> 36	
15	<212> ADN	
	<213> Arabidopsis thaliana	
	<400> 23	
	gctctagacc tatggcgcca caagaacaag cagttt	36
	<210> 24	
20	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Arabidopsis thaliana	
	<400> 24	
	gcggatcccc ttcacaatcc atttgtagt tttgcc	36
25	<210> 25	
	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Rheum tataricum	
	<400> 25	
30	ccggatccaa atggccccag aagagagcag g	31
	<210> 26	
	<211> 35	
	<212> ADN	
	<213> Rheum tataricum	
35	<400> 26	
	cgctcgagtt aagtgatcaa tgaaccgaa gacag	35
	<210> 27	
	<211> 38	
	<212> ADN	
40	<213> Rhodobacter capsulatus	
	<400> 27	
	ccgaattccc atgacctgc aatctcaaac agctaaag	38
	<210> 28	
	<211> 30	
45	<212> ADN	
	<213> Rhodobacter capsulatus	
	<400> 28	

	ccactagttt aagcaggtgg atcggcagct	30
	<210> 29	
	<211> 37	
	<212> ADN	
5	<213> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
	<400> 29	
	ccctcgagat catgccgttt ggaatagaca acaccga	37
	<210> 30	
	<211> 36	
10	<212> ADN	
	<213> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
	<400> 30	
	ccaagcttat cgggctgatt accagacatc ttcttg	36
	<210> 31	
15	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> <i>Arabidopsis thaliana</i>	
	<400> 31	
	ccggatcccc atgtcctctt cttctcttc gtcaac	36
20	<210> 32	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> <i>Arabidopsis thaliana</i>	
	<400> 32	
25	ccctcgaggt gagtgtggtg ctcaatagt ttcg	34
	<210> 33	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> <i>Rhodobacter capsulatus</i>	
30	<400> 33	
	ccgctcgagc ggatgacctt gcaatctcaa acagctaaag	40
	<210> 34	
	<211> 30	
	<212> ADN	
35	<213> <i>Rhodobacter capsulatus</i>	
	<400> 34	
	gcggatcctt aagcaggtgg atcggcagct	30
	<210> 35	
	<211> 35	
40	<212> ADN	
	<213> <i>Arabidopsis thaliana</i>	
	<400> 35	
	tgccatggca atggcggccac aagaacaagc agttt	35
45	<210> 36	
	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> <i>Arabidopsis thaliana</i>	
	<400> 36	

	gcggatcccc ttcacaatcc attgctagt ttgccc	36
	<210> 37	
	<211> 37	
	<212> ADN	
5	<213> Arabidopsis thaliana	
	<400> 37	
	ttgcggccgc aaatctcgat cccgcgaaat taatagc	37
	<210> 38	
	<211> 36	
10	<212> ADN	
	<213> Arabidopsis thaliana	
	<400> 38	
	cgctcgagcc ttcacaatcc attgctagt ttgccc	36

REIVINDICACIONES

1. Un microorganismo que produce resveratrol, y dicho microorganismo tiene una ruta metabólica operativa que produce ácido 4-cumárico y que produce resveratrol a partir suyo, o un derivado oligomérico o con unión glicosídica del mismo, en cuya ruta se produce ácido 4-cumárico a partir de L-fenilalanina por la acción de una L-fenilalanina amoniaco liasa y una cinamato 4-hidroxilasa expresadas en dicho microorganismo, o a partir de tirosina por la acción de una L-fenilalanina amoniaco liasa o de una tirosina amoniaco liasa expresadas en dicho microorganismo, se forma 4-cumaroil-CoA a partir de dicho ácido cumárico en una reacción catalizada por una 4-cumarato-CoA ligasa expresada en dicho microorganismo,
- 5 y se produce resveratrol a partir de dicho 4-cumaroil-CoA en una reacción en la que el malonil-CoA endógeno es un sustrato mediante una resveratrol sintasa expresada en dicho microorganismo.
2. Un microorganismo según la reivindicación 1, en el que dicha resveratrol sintasa se expresa en dicho microorganismo a partir de un ácido nucleico que codifica dicha enzima que no es nativa en el microorganismo.
3. Un microorganismo según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que dicha cinamato 4-hidroxilasa se expresa en dicho microorganismo a partir de un ácido nucleico que codifica dicha enzima que no es nativa en el microorganismo.
- 15 4. Un microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que se expresa una tirosina amoniaco liasa en dicho microorganismo a partir de un ácido nucleico que codifica dicha enzima que no es nativa en el microorganismo.
5. Un microorganismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que se expresa una L-fenilalanina amoniaco liasa en dicho microorganismo a partir de un ácido nucleico que codifica dicha enzima que no es nativa en el microorganismo.
- 20 6. Un microorganismo según cualquier reivindicación precedente, en el que una NADPH:citocromo P450 reductasa (CPR) nativa se ha sobreexpresado en dicho microorganismo, o en el que una NADPH:citocromo P450 reductasa (CPR) se ha introducido de manera recombinante en dicho microorganismo.
- 25 7. Un microorganismo según cualquier reivindicación precedente, en el que al menos una copia de una secuencia genética que codifica una tirosina amoniaco liasa está unida de forma operable a una señal de expresión que no está asociada de manera nativa con dicha secuencia genética en dicho organismo.
8. Un microorganismo según cualquier reivindicación precedente, en el que al menos una copia de una secuencia genética que codifica una L-fenilalanina amoniaco liasa está unida de forma operable a una señal de expresión que no está asociada de manera nativa con dicha secuencia genética en dicho organismo.
- 30 9. Un microorganismo según cualquier reivindicación precedente, en el que al menos una copia de una secuencia genética que codifica una cinamato 4-hidroxilasa está unida de forma operable a una señal de expresión que no está asociada de manera nativa con dicha secuencia genética en dicho organismo.
10. Un microorganismo según cualquier reivindicación precedente, en el que al menos una copia de una secuencia genética que codifica una 4-cumarato-CoA ligasa está unida de forma operable a una señal de expresión que no está asociada de manera nativa con dicha secuencia genética en dicho organismo.
- 35 11. Un microorganismo según cualquier reivindicación precedente, en el que al menos una copia de una secuencia genética que codifica una resveratrol sintasa está unida de forma operable a una señal de expresión que no está asociada de manera nativa con dicha secuencia genética en dicho organismo.
- 40 12. Un microorganismo según cualquier reivindicación precedente, que es un hongo o bacteria.
13. Un microorganismo según la reivindicación 12, que es una levadura.
14. Un microorganismo según la reivindicación 13, que es una *Saccharomyces cerevisiae*.
15. Un microorganismo según la reivindicación 1, que contiene una o más copias de una secuencia de ADN heteróloga que codifica L-fenilalanina amoniaco liasa asociada de forma operable con una señal de expresión, y que contiene una o más copias de una secuencia de ADN heteróloga que codifica cinamato-4-hidroxilasa asociada de forma operable con una señal de expresión, y que contiene una o más copias de una secuencia de ADN heteróloga que codifica 4-cumarato CoA-ligasa asociada de forma operable con una señal de expresión, y que contiene una o más copias de una secuencia de ADN heteróloga que codifica resveratrol sintasa asociada de forma operable con una señal de expresión.
- 45 16. Un microorganismo según la reivindicación 1, que carece de actividad cinamato-4-hidroxilasa, y que contiene una o más copias de una secuencia de ADN heteróloga que codifica tirosina amoniaco liasa asociada de forma operable con una señal de expresión o L-fenilalanina amoniaco liasa asociada de forma operable con una señal de
- 50

expresión, y que contiene una o más copias de una secuencia de ADN heteróloga que codifica 4-cumarato CoA-ligasa asociada de forma operable con una señal de expresión, y que contiene una o más copias de una secuencia de ADN heteróloga que codifica resveratrol sintasa asociada de forma operable con una señal de expresión.

- 5 17. Un método para la producción de resveratrol o un derivado oligomérico o con unión glicosídica del mismo que comprende poner en contacto un microorganismo según cualquier reivindicación precedente con un sustrato de carbono.
18. Un método según la reivindicación 15, llevado a cabo en ausencia sustancial de una fuente externa de ácido 4-cumárico.
- 10 19. Un método según la reivindicación 15 o la reivindicación 16, en el que dicho sustrato de carbono se selecciona del grupo de sustratos de carbono fermentables que consiste en monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos.
20. Un método según la reivindicación 15 o la reivindicación 16, en el que dicho sustrato de carbono se selecciona del grupo de sustratos de carbono no fermentables que consiste en etanol, acetato, glicerol, lactato y aminoácidos.
21. Un método según la reivindicación 18, en el que dicho sustrato de carbono no fermentable se selecciona del grupo que consiste en fenilalanina y tirosina.
- 15 22. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 19, que incluye además el uso de dicho resveratrol producido o un derivado oligomérico o con unión glicosídica del mismo como un producto nutracéutico en un producto lácteo o una bebida.

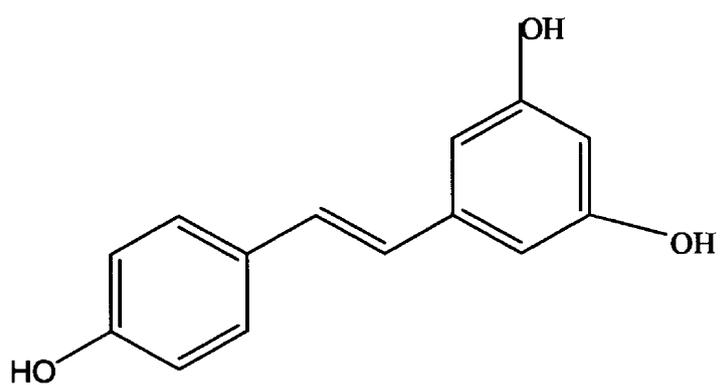


Figura 1

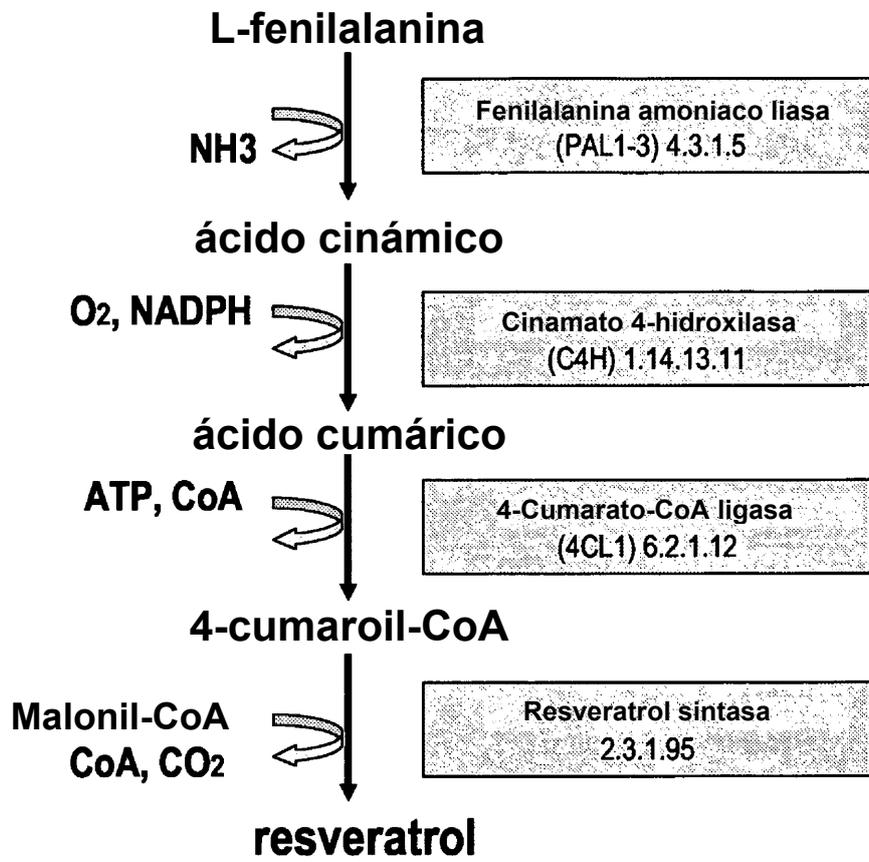


Figura 2

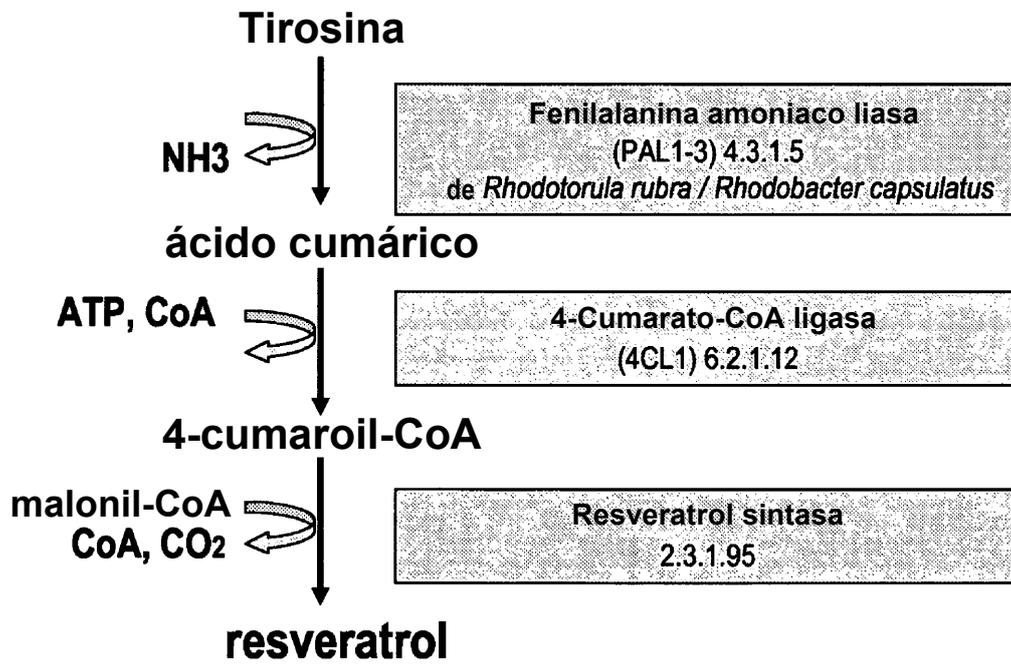


Figura 3

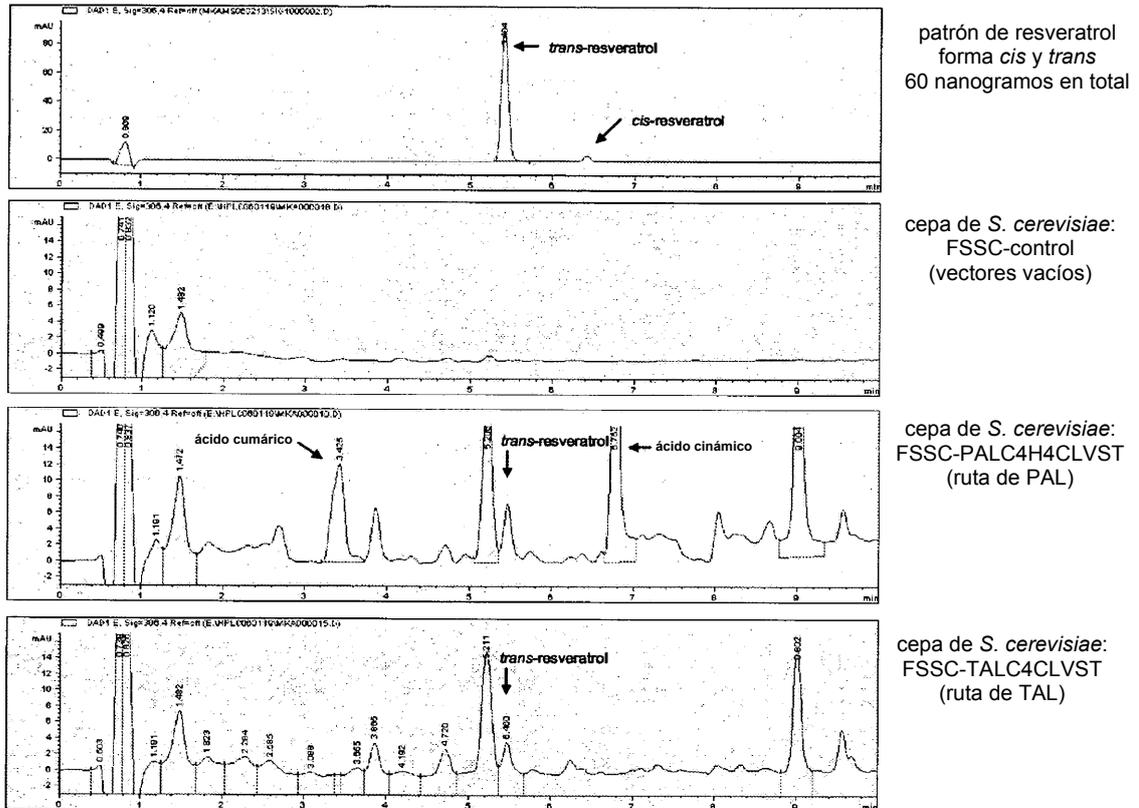
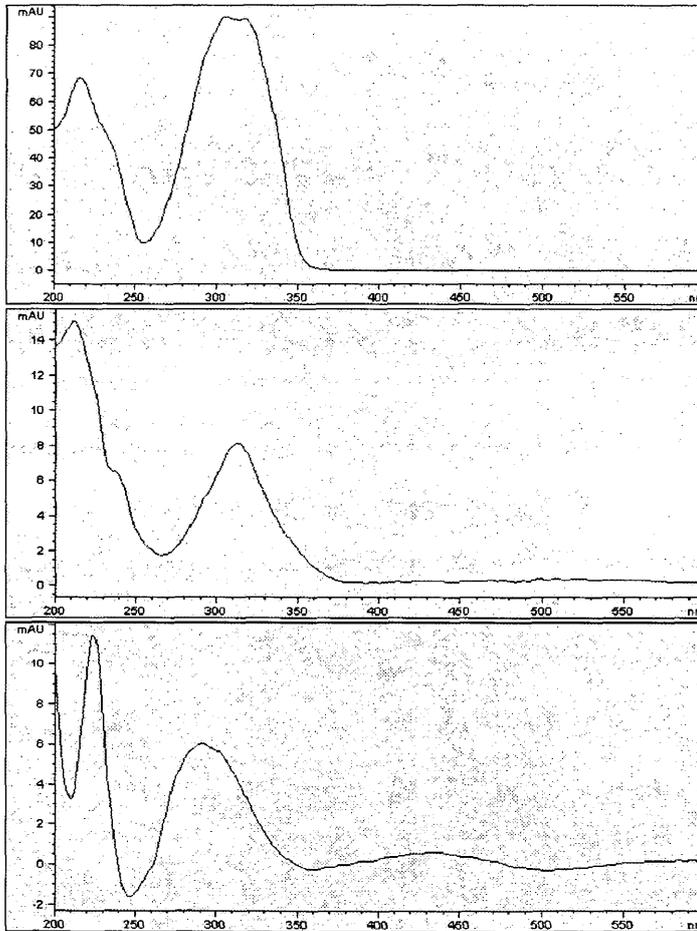


Figura 4



espectro UV de *trans*-resveratrol puro
60 nanogramos en total

espectro UV de *trans*-resveratrol en extracto de la cepa de *S. cerevisiae* FSSC-PALC4H4CLVST (ruta de PAL)

espectro UV de *trans*-resveratrol en extracto de la cepa de *S. cerevisiae* FSSC-TAL4CLVST (ruta de TAL)

Figura 5

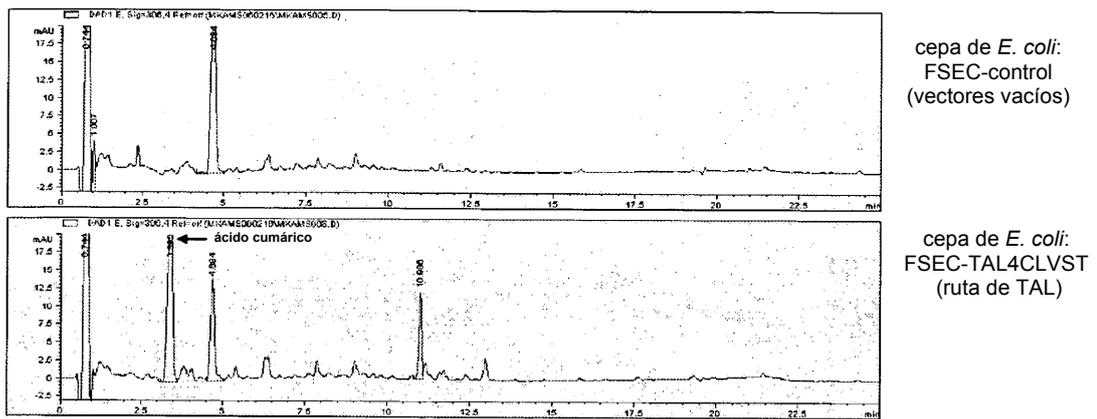


Figura 6

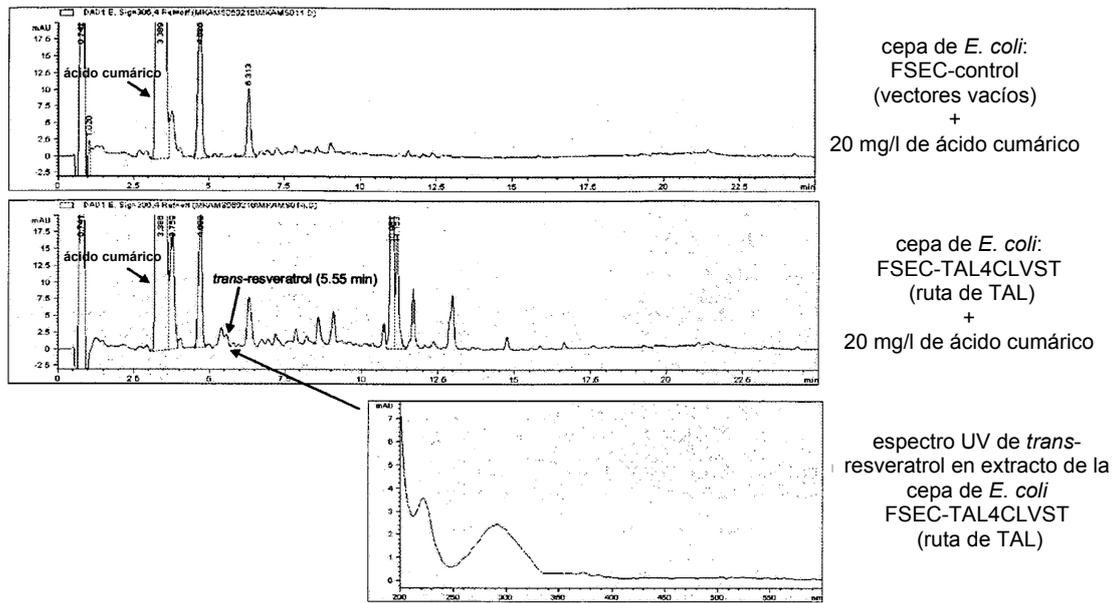


Figura 7