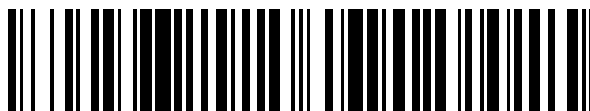


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 452 641**

51 Int. Cl.:

C12N 9/14 (2006.01)

C07K 14/415 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2009** **E 09007069 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2013** **EP 2157175**

54 Título: **Proteína con la actividad de la enzima biosintética piretrina, gen codificador de la proteína y vector portador del gen**

30 Prioridad:

13.08.2008 JP 2008208295

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

02.04.2014

73 Titular/es:

EDUCATIONAL FOUNDATION KINKI UNIVERSITY
(50.0%)

3-4-1 Kowakae Higashiosaka-shi

Osaka, JP y

DAINIHON JOCHUGIKU CO., LTD. (50.0%)

72 Inventor/es:

MATSUDA, KAZUHIKO y

KIKUTA, YUKIO

74 Agente/Representante:

AZNÁREZ URBIETA, Pablo

ES 2 452 641 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

Proteína con la actividad de la enzima biosintética piretrina, gen codificador de la proteína y vector portador del gen

CAMPO TÉCNICO

- 5 La presente invención se refiere a una proteína que tiene la actividad de la enzima biosintética piretrina, a un gen codificador de la proteína y a un vector que porta el gen.

ANTECEDENTES TÉCNICOS

- 10 La piretrina, un metabolito secundario contenido en el piretro, tiene una excelente actividad insecticida contra insectos, siendo una característica ideal como constituyente insecticida que su toxicidad para los mamíferos es baja, y se utiliza ampliamente en espirales anti-mosquitos y en espráis y polvos insecticidas. Recientemente, la demanda de piretrina ha disminuido debido al extraordinario desarrollo de los piretroides sintéticos. Sin embargo, la piretrina sigue teniendo un alto valor útil como material vegetal respetuoso con el medio ambiente para insecticidas y se han seguido las investigaciones para poder obtener piretrina de forma económica y eficaz. En particular, el valor de existencia de la piretrina arriba indicada, un metabolito secundario, se ha acentuado de nuevo debido al aumento del precio del aceite, que es una materia prima de los piretroides sintéticos, y similares.

- 15 La piretrina se extrae fundamentalmente de la parte de la flor del piretro. Sin embargo, el tiempo de crecimiento del piretro hasta su floración es muy largo, más de tres años. Se considera que la selección y el cultivo de cepas de alta producción de piretro y la promoción de la biosíntesis de piretrina en células vegetales de la misma especie o de especies diferentes tienen un efecto beneficioso como medio para aumentar la eficiencia de la producción de piretrina.

- 20 La piretrina tiene una estructura con un enlace éster entre el ácido crisantémico, que es un ácido carboxílico de monoterpeneo, y retrolonas (alcoholes), que son un metabolito de la oxidación de ácidos grasos (Fig. 3). Es sabido que en la biosíntesis de piretrina se biosintetizan ácido crisantémico y retrolonas en diferentes vías metabólicas y finalmente se forma un enlace éster entre éstos.

- 25 Los métodos para aumentar la eficiencia de la biosíntesis de piretrina arriba descrita incluyen el uso de genes que intervienen en la biosíntesis. Para llevar a cabo la biosíntesis de la piretrina es crucial aislar e identificar el gen pertinente.

Entre tanto, diversos compuestos éster producidos por células vegetales se biosintetizan mediante catálisis de aciltransferasa a partir de CoA tioéster de ácido carboxílico (acil- CoA, RCO-S- CoA) y alcohol (R'-OH) como sustratos (Fig. 4), estas biosíntesis se describen, por ejemplo, en los Documentos No de Patente 1 y 2.

- 30 Como ejemplo de tal aciltransferasa en la biosíntesis de la piretrina se ha predicho la existencia de crisantemoil/piretroil-transferasa (enzima biosintética de piretrina) que utiliza (1R)-trans-crisantemoil-CoA y (S)-piretrolona como sustratos; sin embargo ésta no se ha aislado y no se ha buscado una composición específica basada en una secuencia de aminoácidos ni en ningún gen natural codificador de la proteína basada en una secuencia de aminoácidos de este tipo.

- 35 La Publicación de Solicitud de Patente Japonesa nº H9-504684 describe una secuencia de aminoácidos de crisantemil-difosfato-sintasa, una enzima que puede catalizar la síntesis de crisantemil difosfato, que se utiliza como materia prima para la síntesis química de piretrina, así como una secuencia de un gen codificador de una proteína basada en dicha secuencia de aminoácidos. Sin embargo, no existe ninguna divulgación ni sugerencia sobre el gen codificador de la enzima *per se* que puede catalizar la biosíntesis de piretrina arriba indicada, ni del gen codificador de la proteína basada en dicha secuencia de aminoácidos. Tal como es obvio por el estado de la técnica convencional, hasta ahora no se ha logrado elucidar el gen codificador de la proteína de la enzima arriba indicada mediante la identificación de la enzima que interviene en la biosíntesis de piretrina, ni la biosíntesis efectiva de piretrina basada en conocimientos de ingeniería genética.

Documento de Patente 1: Publicación de solicitud de patente japonesa nº H9-504684

- 45 Documento No de Patente 1: R. Kalscheuer y A. Steinbuchel, A novel bifunctional wax ester synthase/acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase mediates wax ester and triacylglycerol biosynthesis in *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1. J. Biol. Chem. 278:8075-8082 (2003)

- 50 Documento No de Patente 2: J. Luo y col., Convergent evolution in the BAHD family of acyl transferases: identification and characterization of anthocyanin acyl transferases from *Arabidopsis thaliana*. Plant J. 50:678-695 (2007)

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION Y PROBLEMAS A RESOLVER POR LA MISMA

La presente invención tiene el objetivo de determinar secuencias de aminoácidos de la enzima que interviene en la biosíntesis de la piretrina y una secuencia de bases del gen de la misma, construir vectores que porten el gen y transformantes, así como proporcionar métodos para producir la piretrina eficazmente mediante la aplicación de estas técnicas creativas a plantas de crecimiento más rápido.

Para resolver las cuestiones arriba indicadas, los presentes inventores han purificado una proteína de la enzima de síntesis de piretrina utilizando la flor de piretro como material de partida y la actividad de síntesis de piretrina I como indicador, y llevando a cabo un fraccionamiento de una proteína y una purificación cruda mediante un método en lotes utilizando una resina hidrófoba, y después una purificación con una combinación predeterminada de cromatografía; y finalmente han analizado una secuencia de aminoácidos interna y una secuencia amino terminal de la proteína pertinente tal como se describe más abajo. Se ha llevado a cabo una RACE-PCR y se ha amplificado un fragmento de polinucleótido de una parte desconocida de la secuencia utilizando una librería de ADNc obtenida de una parte de la flor del piretro como cebadores temperados y degenerados diseñados en base a las secuencias de aminoácidos crudas, que han sido clarificadas mediante los análisis arriba indicados.

Se ha analizado un fragmento de polinucleótido amplificado de la secuencia de bases con un secuenciador de ADN. Como resultado, se ha determinado una secuencia genética de longitud completa de una enzima biosintética de piretrina, incluyendo la secuencia mostrada en la Fig. 2, es decir, la Secuencia nº 5, y una secuencia de aminoácidos codificada por el gen, secuencia mostrada en la Fig. 1 (a), es decir, la Secuencia nº 1. La presente invención se ha completado en base a dicha determinación de las secuencias.

La presente invención adopta la siguiente constitución:

(1) Un método para producir una enzima biosintética de piretrina de una proteína con un peso molecular de aproximadamente 40.000, siendo el material de partida de la enzima una solución enzimática cruda preparada a partir de flor de piretro; donde la enzima biosintética de piretro se obtiene mediante un procedimiento de purificación que incluye los pasos secuenciales de:

obtener un precipitado del fraccionamiento de la proteína cruda con precipitación de sulfato de amonio;
someter el precipitado a una purificación cruda mediante un método por lotes utilizando una resina hidrófoba;
purificar la solución enzimática obtenida por la purificación cruda mediante cromatografía de intercambio aniónico;
purificar mediante cromatografía hidrófoba; y
purificar mediante filtración por gel;

y donde la enzima producida es una proteína con un peso molecular de aproximadamente 40.000.

(2) Una de las siguientes proteínas (i) o (ii), correspondiente a una enzima extraíble de cuerpos de plantas productoras de piretrina:

(i) una proteína consistente en la secuencia de aminoácidos mostrada en la Secuencia nº 1; o

(ii) una proteína consistente en una secuencia de aminoácidos que incluye una o más modificaciones consistentes en sustitución, delección, inserción y/o adición de un aminoácido en la secuencia de aminoácidos mostrada en la Secuencia nº 1, presentando la proteína la actividad de una enzima biosintética de piretrina.

(3) Una proteína consistente en la secuencia de aminoácidos mostrada en la Secuencia nº 2, o una proteína consistente en la secuencia de aminoácidos mostrada en la Secuencia nº 3, o una proteína consistente en la secuencia de aminoácidos mostrada en la Secuencia nº 4, correspondientes a una enzima extraíble de cuerpos de plantas productoras de piretrina.

(4) Un gen codificador de una de las siguientes proteínas (i) o (ii), correspondiente a una enzima extraíble de cuerpos de plantas productoras de piretrina:

(i) una proteína consistente en la secuencia de aminoácidos mostrada en la Secuencia nº 1; o

(ii) una proteína consistente en una secuencia de aminoácidos que incluye piretrina.

(4) Un gen codificador de una de las siguientes proteínas (i) o (ii), correspondiente a una enzima extraíble de cuerpos de plantas productoras de piretrina:

(i) una proteína consistente en la secuencia de aminoácidos mostrada en la Secuencia nº 1; o

(ii) una proteína consistente en una secuencia de aminoácidos que incluye una o más modificaciones consistentes en sustitución, delección, inserción y/o adición de un aminoácido en la secuencia de aminoácidos mostrada en la Secuencia nº 1, presentando la proteína la actividad de una enzima biosintética de piretrina, utilizándose (1R)-trans-crisantemoil-CoA y (S)-piretrolona como sustratos en un ensayo para confirmar la función activa de la enzima biosintética de piretro.

(5) Un gen de acuerdo con (4), que consiste en la secuencia de bases mostrada en la Secuencia nº 5; codificando el gen la proteína de (i).

(6) Un gen según (5), que incluye una secuencia de bases de 85 a 1.179 de la secuencia de bases mostrada en la Secuencia nº 5 como marco de lectura abierto.

(7) Un gen codificador de cualquiera de las siguientes proteínas: una proteína consistente en la secuencia de aminoácidos mostrada en la Secuencia nº 2, o una proteína consistente en la secuencia de aminoácidos mostrada en la Secuencia nº 3, o una proteína consistente en la secuencia de aminoácidos mostrada en la Secuencia nº 4, correspondiente a una enzima extraíble de cuerpos de plantas productoras de piretrina.

(8) Un vector que porta un gen de acuerdo con uno cualquiera de los puntos (4) a (7).

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1: muestra un ejemplo ilustrativo de una secuencia de aminoácidos de una enzima biosintética de piretrina de la presente invención. (a) un ejemplo típico de una enzima obtenida de una flor de piretro, (b) un ejemplo ilustrativo de delección de una secuencia señal para la translocación de la secuencia de aminoácidos de (a), y (c) y (d) muestran secuencias de aminoácidos donde se ha añadido otra secuencia señal para la translocación de la secuencia de (a). Las partes subrayadas en (c) y (d) representan la secuencia señal añadida a la secuencia de (a). Tal como se describe en una sección de una realización de la invención, la Fig. 1 (a) muestra la secuencia de aminoácidos de la Secuencia nº 1, la Fig. 1 (b) muestra la secuencia de aminoácidos de la Secuencia nº 2, la Fig. 1 (c) muestra la secuencia de aminoácidos de la Secuencia nº 3, y la Fig. 1 (d) muestra la secuencia de aminoácidos de la Secuencia nº 4.

Fig. 2: muestra una secuencia de un gen codificador de la proteína de la secuencia de aminoácidos de la Fig. 1 (a), y se corresponde con una figura que muestra la secuencia de bases de la Secuencia nº 5.

Fig. 3: una fórmula de constitución química y una lista que indica concretamente que las estructuras de piretrinas incluyen cadenas laterales de fracciones de ácido crisantémico (R_1) y de retrolona (R_2).

Fig. 4: fórmula general de una reacción química que muestra que los compuestos éster de las células vegetales se biosintetizan mediante catálisis de aciltransferasa a partir de un CoA tioéster de ácido carboxílico (acil-CoA, $RCO-S-CoA$) y un alcohol ($R'-OH$) como sustratos.

Fig. 5: fórmula de reacción que muestra un ejemplo ilustrativo de una reacción biosintética de piretrina catalizada por una transferasa del grupo crisantemoilo.

Fig. 6: gráficos de los resultados de medir la actividad de la enzima biosintética de piretrina con HPLC del Ejemplo 1. (a) y (b) muestran ejemplos sin y con actividad enzimática en un paso de purificación de proteína, respectivamente.

Fig. 7: lista que muestra el procedimiento para la producción enzimática a partir de una flor de piretro en el Ejemplo 1.

Fig. 8: imagen fotográfica de electroforesis (SDS-PAGE) que califica el grado de identificación de peso molecular para confirmar el grado de purificación de una enzima biosintética de piretrina producida en el Ejemplo 1.

Fig. 9: un ejemplo de las secuencias de aminoácidos crudas obtenidas mediante el análisis de cada parte de los aminoácidos que construye una proteína de la enzima biosintética de piretrina. (a) muestra la secuencia de aminoácidos de la Secuencia nº 6, (b) muestra la secuencia de aminoácidos de la Secuencia nº 7, y (c) muestra la secuencia de aminoácidos de la Secuencia nº 8.

MEJORES FORMAS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

A continuación se explican las secuencias de aminoácidos basadas en la extracción y separación de enzimas biosintéticas de piretrina, un proceso que conduce a un procedimiento de determinación de la secuencia de bases del gen de la misma, vectores que portan el gen basados en la secuencia de bases así determinada y transformantes que introducen dichos vectores de la presente invención.

Es esencial asegurar proteínas que componen una enzima biosintética de piretrina antes de la realización de acuerdo con los siguientes pasos (a) a (d) en este orden.

Los presentes inventores han llevado a cabo el fraccionamiento y la purificación de una enzima biosintética de piretrina utilizando una solución enzimática cruda preparada a partir de flor de pelitre como materia prima, (1R)-trans-crisantemoil-CoA y (S)-piretrolona como sustratos para confirmar una función activa de la enzima biosintética de piretrina y la actividad de síntesis de piretrina I como indicador. Dicho de otro modo, tal como se describe más arriba en el punto (1), se llevó a cabo un fraccionamiento, una purificación cruda y una purificación en el orden consistente en fraccionamiento por precipitación de sulfato de amonio, purificación cruda mediante un método por lotes utilizando una resina hidrófoba, purificación por cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía hidrófoba y columna de filtración en gel, y en cada paso se realizaron reacciones enzimáticas en el sustrato arriba descrito. Se obtuvo una enzima mediante fraccionamiento, se comprobó que las fracciones purificadas tenían la actividad de la enzima biosintética de piretrina. Mediante SDS-PAGE de la enzima (Fig. 8) se detectó una banda proteica de peso molecular 40.000, que se espera que contribuya a la reacción de esterificación como una enzima.

Se aseguró una proteína de enzima biosintética de piretrina producida con éxito mediante transferencia de la proteína obtenida confirmando la banda arriba indicada en una membrana de PVDF.

Más adelante, en el Ejemplo 1 se describe un proceso específico mediante confirmación de la banda arriba indicada.

15 (a) Análisis de las secuencias de aminoácidos crudas de la proteína de la enzima

Una enzima purificada asegurada tal como se describe más arriba se digirió con tripsina, una proteasa, y se fragmentó en péptidos. Después, los fragmentos peptídicos digeridos se separaron por HPLC y los residuos aminoácidos de los péptidos separados se desmontaron por separado y se disociaron del extremo amino terminal mediante el método de Edman.

20 Los residuos de aminoácidos se determinaron analizando por HPLC derivados de feniltiohidantoína producidos. Esta serie de procesos se llevó a cabo utilizando un secuenciador de péptidos, un instrumento analítico especial automatizado para repetir estos procedimientos de reacción y análisis.

Tal como se describe más arriba, se obtuvieron satisfactoriamente secuencias de aminoácidos crudas que constituyen la proteína de enzima biosintética de piretrina.

25 (b) Diseño de cebadores y determinación de la secuencia genética de un ADNc de longitud completa

Se diseñaron cebadores degenerados basados en las secuencias de bases estimadas a partir de las secuencias de aminoácidos determinadas.

30 Las secuencias de bases desconocidas entre las secuencias conocidas se determinaron por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) utilizando los cebadores arriba indicados (por ejemplo, cuatro pares de cebadores degenerados).

35 Seguidamente se añadió previamente un polinucleótido que sirve como adaptador a un ADN utilizado como sustrato para la PCR. Simultáneamente se llevó a cabo una RACE-PCR utilizando cebadores diseñados en una secuencia adaptadora y una secuencia conocida, y se amplificaron los fragmentos de ADN que contenían las secuencias de los dos extremos. Los fragmentos de ADN amplificados se secuenciaron con un secuenciador de ADN y se determinó una secuencia de longitud completa.

40 La secuencia de longitud completa de la enzima biosintética de piretrina determinada tal como se describe más arriba se muestra en la Secuencia nº 5 de la Fig. 2, tal como se describe más arriba en el punto (5). La secuencia de longitud completa de la Secuencia nº 5, tal como se describe más arriba en el punto (6), se caracteriza porque contiene una secuencia de 85 a 1.179 bases como marco de lectura abierto. La determinación de una secuencia de longitud completa de la Secuencia nº 5 se puede lograr también mediante otros métodos de detección génica, como métodos de selección inmunológica para la proteína de enzima arriba descrita transferida a una membrana de PVDF y métodos de hibridación utilizando sondas de ácidos nucleicos, así como por la PCR arriba descrita.

(c) Determinación de una secuencia de aminoácidos de longitud completa

45 Se determinó una secuencia de aminoácidos codificada por el gen arriba descrito correspondiente a la secuencia de bases arriba indicada de la Secuencia nº 5.

En la Secuencia nº 1 de la Fig. 1 se muestra una secuencia de aminoácidos de una enzima biosintética de piretrina determinada en la presente invención, tal como se describe más arriba en el punto (2).

50 Aunque una secuencia de aminoácidos contenga una o más de las modificaciones consistentes en una sustitución, delección, inserción y/o adición de un aminoácido en la secuencia de aminoácidos mostrada en la Secuencia nº 1, la proteína está incluida en proteínas de una enzima biosintética de piretrina de la presente invención siempre que la

proteína pueda ser extraída de plantas que contienen la enzima biosintética de piretrina utilizando técnicas y procesos similares con una secuencia de aminoácidos de Secuencia nº 1, y siempre que la proteína muestre una función como una enzima biosintética de piretrina porque la proteína puede actuar del mismo modo que la proteína de enzima mostrada con la Secuencia nº 1. Además, tal como se describe en el punto (3), las secuencias de aminoácidos de acuerdo con las siguientes secuencias también corresponden a la proteína como una enzima biosintética de piretrina de la presente invención:

- La secuencia mostrada como Secuencia nº 2 en la Fig. 1 (b): una secuencia de aminoácidos donde se ha eliminado una secuencia señal para translocación (del extremo N al residuo Ser (S) 27) de la secuencia de aminoácidos de Secuencia nº 1.
- La secuencia mostrada como Secuencia nº 3 en la Fig. 1 (c): una secuencia de aminoácidos donde en el extremo C se ha añadido un marcador de histidina y una secuencia de engarce para la expresión en *E. coli*.
- La secuencia mostrada como Secuencia nº 4 en la Fig. 1 (d): una secuencia de aminoácidos donde en el extremo N se ha añadido una secuencia de GST para expresar la proteína como proteína de fusión de glutatión-S-transferasa (GST) en *E. coli*.

Tal como se describe más abajo en el Ejemplo 1, la secuencia de aminoácidos mostrada como Secuencia nº 2 se extrae de una flor de piretro, por lo que se puede purificar de forma natural. Las enzimas correspondientes a las secuencias de aminoácidos mostradas como Secuencias nº 3 y 4 se obtuvieron mediante la introducción de un vector que porta una secuencia codificadora de la secuencia de aminoácidos de Secuencia nº 1 en *E. coli* y expresión de la proteína en *E. coli*. Sin embargo, cuando una enzima se puede expresar en *E. coli* como huésped, es altamente previsible que la enzima también exista realmente como enzima biosintética de piretrina en plantas que pueden producir piretrina. Si la enzima existe, evidentemente se puede extraer y purificar del cuerpo de la planta arriba indicada utilizando técnicas y procesos similares con la secuencia de aminoácidos de Secuencia nº 2.

Dado que la proteína de acuerdo con la secuencia de aminoácidos indicada más arriba en el punto (2) que tiene actividad de biosíntesis de piretrina ejerce la misma función que una proteína de este tipo así como una proteína de acuerdo con la secuencia de aminoácidos de la Secuencia nº 1, y está incluida como proteína producible en el concepto técnico y el alcance de la presente invención, en consecuencia el gen de la presente invención no sólo incluye el gen arriba indicado más arriba en el punto (4) que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada como Secuencia nº 1, sino que también incluye los genes indicados más arriba en los puntos (5) y (6) que codifican la proteína arriba indicada en el punto (2) en el concepto técnico de la presente invención. Además, el gen indicado más arriba (7) que codifica una proteína de secuencia de aminoácidos de Secuencias nº 2, 3 y 4 indicadas más arriba en el punto (3) también está incluido en el concepto técnico de la presente invención.

Se examinó una base de datos de secuencias de aminoácidos de proteínas conocidas en cuanto a secuencias similares a la Secuencia nº 1. Como resultado, una secuencia de este tipo no era una aciltransferasa conocida prevista, no obstante algunas lipasas de motivo GDSL eran similares a la secuencia de aminoácidos. Por consiguiente, se supone que las proteínas de enzima biosintética de piretrina de (2) y (3) son proteínas similares a la lipasa de motivo GDSL.

Para confirmar la actividad de biosíntesis de los genes de la enzima biosintética de piretrina indicados más arriba en los puntos (4), (5), (6) y (7) resulta apropiado, por ejemplo, insertar primero estos genes en un ADN-vector, introducir éste en *E. coli*, expresar las enzimas biosintéticas de piretrina como una proteína de fusión con un marcador de histidina en *E. coli*, purificar la enzima biosintética de piretrina expresada mediante cromatografía de afinidad de Ni-NTA y después evaluar la actividad utilizando (1R)-trans-crisantemoil-CoA y (S)-piretrolona como sustrato y la actividad de síntesis de piretrina I como indicador.

(d) Producción de un vector y transformantes que introducen el vector

El vector indicado más arriba en el punto (8) se produce insertando cualquiera de los genes indicados más arriba en los puntos (4), (5), (6) y (7), y presenta actividad de enzima biosintética de piretrina. El vector arriba indicado puede expresar el gen o fragmento de gen insertado en huéspedes como plantas y microorganismos mediante su introducción en los huéspedes por métodos de transformación bien conocidos.

Además, un transformante que tiene introducido en el mismo el vector arriba indicado en el punto (8) se refiere a un transformante que introduce un gen o fragmento de gen relacionado con la biosíntesis de piretrina en un huésped. El concepto "que tiene introducido el vector arriba indicado" aquí utilizado se refiere a que el gen insertado en el vector se introduce en un huésped de un modo capaz de expresar dicho gen utilizando técnicas de ingeniería genética bien conocidas.

Los métodos para introducir genes incluyen métodos de transformación con *Agrobacterium*, métodos con pistola genética, métodos de microinyección y métodos de electroporación.

Cuando se utiliza el método de transformación con *Agrobacterium*, el gen pertinente se inserta en un vector plásmido Ti, el vector se introduce en *Agrobacterium* y después el *Agrobacterium* se utiliza para infectar la planta apropiada. En el sitio de la introducción del gen se forma una agalla (agalla del cuello). Después de la eliminación del *Agrobacterium*, muchos cuerpos de planta regenerados de la agalla del cuello se evalúan en cuanto a su actividad, y se pueden seleccionar los cuerpos de planta que presentan una alta expresión de la enzima biosintética de piretrina.

Estos transformantes pueden expresar genes relacionados con la biosíntesis de piretrina en sus cuerpos. Por consiguiente, es posible producir la enzima biosintética de piretrina en grand cantidad mediante la construcción de transformantes que tienen el vector arriba indicado en el punto (8), que porta un promotor para expresar dicha enzima en grandes cantidades mediante el uso de cromosoma bacteriano y/o cloroplasto de plantas, algas verde-azuladas, levaduras o bacterias, como *E. coli*, como huésped.

Dado que el vector arriba descrito contiene un gen (o un fragmento de gen) de una enzima biosintética de piretrina derivada de piretro, como huéspedes para la construcción de transformantes son preferentes cromosomas y/o cloroplastos de plantas, en particular cromosomas y/o cloroplastos de plantas asteráceas que pertenecen a la misma familia que el piretro son especialmente preferentes. Dichas plantas asteráceas incluyen maravilla, clavelón de la India, caléndula y zinnia.

Las plantas arriba descritas no sólo incluyen cuerpos de planta enteros, sino también partes de los cuerpos de planta, por ejemplo hojas, semillas, tubérculos, injertos y similares. Además, las plantas arriba indicadas también incluyen materiales vegetales (una parte de una planta incluyendo la flor, el tallo, el fruto, la hoja y la raíz) con potencial de crecimiento, como tejido vegetal, protoplastos, células, callos, órganos, semillas, gérmenes, polen, óvulos y cigotos, derivados de plantas modificadas genéticamente y la descendencia de los mismos previamente transformada.

La piretrina se puede producir utilizando la proteína arriba indicada en el punto (2) o los transformantes arriba indicados. La presente invención proporciona un método para la producción de piretrina de este tipo. De acuerdo con dicho método, la piretrina se puede producir eficaz y fácilmente utilizando las plantas asteráceas arriba indicadas u otras plantas con un crecimiento claramente más rápido que el del piretro, y, en consecuencia, la presente invención podría satisfacer en gran medida la demanda social de un insecticida seguro y respetuoso del medio ambiente.

Ejemplos

A continuación se describen detalles concretos de la presente invención con referencia a los siguientes Ejemplos.

Ejemplo 1

A partir de flores de piretro se purificó una enzima de acuerdo con los procedimientos mostrados en la Fig. 7 para analizar la secuencia de aminoácidos de (a) arriba descrita.

A continuación se proporcionan explicaciones detalladas con respecto a los procedimientos.

Composiciones tampón utilizadas para la purificación

En las Tablas 1 a 6 se muestran las composiciones de tampones utilizadas para la purificación.

Tabla 1

Tampón A	
Constituyente	Concentración (mM)
Tris-HCl, pH 8,0	50
EDTA	1
DTT	5
Ascorbato de sodio	100
PMSF	2

Tabla 2

Tampón B	
Constituyente	Concentración (mM)
Tris-HCl, pH 8,0	20
EDTA	1
DTT	5

Tabla 3

Tampón C	
Constituyente	Concentración (mM)
Tris-HCl, pH 8,0	20
EDTA	1
DTT	5
NaCl	500

Tabla 4

Tampón D	
Constituyente	Concentración (mM)
Tris-HCl, pH 8,0	20
EDTA	1
DTT	5
NaCl	150

5

Tabla 5

Tampón E	
Constituyente	Concentración (mM)
Tris-HCl, pH 8,0	20
EDTA	1
DTT	5
(NH ₄) ₂ SO ₄	400

Tabla 6

Tampón F	
Constituyente	Concentración (mM)
Tris-HCl, pH 8,0	50
EDTA	1
DTT	5
Ascorbato de sodio	100
(NH ₄) ₂ SO ₄	1000

10 Reacción de la enzima biosintética de piretrina

En cada paso de purificación se ensayó una reacción enzimática y se evaluó la actividad enzimática de la enzima biosintética de piretrina en fracciones purificadas. Se llevó a cabo una reacción a 25°C durante 1 hora utilizando la composición de reacción mostrada en la siguiente Tabla 7. Después de la reacción enzimática, se añadieron 200 µl de hexano a la solución de reacción. Luego se separó y recogió la fase orgánica y se utilizaron 10 µl de cada muestra para análisis por HPLC.

15

Tabla 7

Composición para la reacción de enzima biosintética de piretrina		
	Volumen (µl)	Concentración (mM)
Solución de enzima	20	
(1R)- <i>trans</i> -crisantemoil-CoA (solución acuosa 10 mM)	10	0,5
(S)-piretrolona (solución en DMSO 20 mM)	4	1
Tris-HCl 250 mM (pH 7,5), EDTA 1 mM	40	50
Agua	126	
Volumen total	200	

Medida de la actividad de la enzima de biosíntesis de piretrina por HPLC

Se llevó a cabo un análisis por HPLC utilizando SCL-10A VP (unidad de programación), DGU-14A (unidad de desaireación), LC-6AD (bomba), CTO-10AS VP (unidad de inyección de muestra y horno de columna) y SPD-10AV VP (detector óptico) producidos por SHIMADZU, y los datos se procesaron con un *software* CLASS-VP de

20

SHIMADZU. Se utilizó una columna Cadenza C-18 de IMTAKT (0,46 cm I.D. x 10 cm L.) y se midió la absorción a 230 nm a 40°C, a un caudal de 1 ml/min. Como fase móvil se empleó acetonitrilo:H₂O (65:35).

En la Fig. 6 se ilustran los resultados del análisis por HPLC. En las Fig. 6 (a) y (b) se muestran los resultados de fracciones sin y con actividad enzimática en el paso de purificación de proteína, respectivamente. Tal como se indica en la figura, se detectó un pico de piretrina I con 4,9 minutos de tiempo de retención durante el tiempo de elución cuando la solución fraccionada contiene la enzima.

Preparación de enzima cruda

A partir de 500 g de capullos de piretro se preparó una enzima cruda de acuerdo con los siguientes procedimientos. A los capullos se añadió 1,5 l de Tampón A helado y polivinilpirrolidona (1/10 volúmenes (p/v) de Tampón A), y los capullos se homogeneizaron en una mezcladora. El homogeneizado se filtró con una gasa de cuatro capas y el filtrado se centrifugó a 8.000 x g durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante recogido se mezcló con 100 ml de DOWEX (1 x 4, 100-200 CI FORM) (Muromachi technos CO., LTD), se agitó con un agitador durante 10 minutos y se centrifugó a 8.000 x g durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante se recogió como una solución enzimática cruda y se dispuso para posterior purificación.

Fraccionamiento mediante precipitación con sulfato de amonio

El sulfato de amonio se molió previamente utilizando un mazo y un mortero y se disolvió y mezcló utilizando un agitador en la solución enzimática cruda obtenida mediante la preparación arriba descrita, a una concentración de un 30% de saturación de sulfato de amonio. Después de dejar reposar durante 30 minutos, la solución se centrifugó a 8.000 x g durante 20 minutos a 4°C (g representa la aceleración gravitatoria). El sobrenadante se recogió y se añadió sulfato de amonio de modo que la concentración de sulfato de amonio llegó a un 80% de saturación. Después de dejar reposar durante una noche, la solución se centrifugó a 8.000 x g durante 20 minutos a 4°C y la fracción enzimática se obtuvo en forma de un precipitado.

Purificación cruda mediante un método por lotes utilizando una resina hidrófoba

El precipitado obtenido mediante el fraccionamiento arriba descrito se suspendió en Tampón F y se añadió Phenyl Sepharose (GE Healthcare) a la solución. Después de mezclar la solución con un agitador durante 30 minutos, la mezcla se separó utilizando un embudo Buchner. La Phenyl Sepharose que quedaba en el embudo Buchner se lavó con 500 ml de Tampón F y después la proteína absorbida por la resina se eluyó con 500 ml de Tampón B. Al producto eluido recogido se añadió sulfato de amonio hasta una concentración 1M y después se añadió Phenyl Sepharose (GE Healthcare) a la solución. Después de mezclar la solución con un agitador durante 30 minutos, la mezcla se transfirió y asentó en una columna Econo-Column (Bio-Rad) y la proteína absorbida por la resina se eluyó con 50 ml de Tampón B. El producto de elución se transfirió a un tubo de diálisis de celofán, se dializó en 2 l de tampón de desalinización durante 2 horas agitando el tampón con un agitador y a continuación se desalinizó de nuevo durante 3 horas después de cambiar el tampón. La solución enzimática desalinizada se purificó adicionalmente mediante cromatografía en columna utilizando un sistema AKTA explorer (GE Healthcare).

Purificación con cromatografía de intercambio aniónico

La solución enzimática obtenida mediante la purificación cruda arriba descrita con el método discontinuo se purificó adicionalmente mediante cromatografía de intercambio aniónico utilizando una columna Q Sepharose de acuerdo con las siguientes condiciones.

Tabla 8

Sistema	ÅKTA explorer 10s
Columna	HiPrep™ 16/10 Q FF (GE Healthcare)
Bomba A	Tampón B
Bomba B	Tampón C
Equilibrado	(A) 100%
Muestra	Solución enzimática desalinizada después de tratamiento discontinuo con Phenyl Sepharose
Enjuague	(A) 100%, 100 ml
Elución	(B) 0 - 100% en 400 ml
Caudal	4 ml/min
Fracción	10 ml/tubo

Purificación por cromatografía hidrófoba

La solución enzimática obtenida mediante la cromatografía de intercambio aniónico arriba descrita se purificó adicionalmente mediante cromatografía hidrófoba utilizando una columna Phenyl Superose de acuerdo con las siguientes condiciones.

5

Tabla 9

Sistema	ÄKTA explorer 10s
Columna	Phenyl Superose FPLC® (GE Healthcare)
Bomba A	Tampón E
Bomba B	Tampón B
Equilibrado	(A) 100%, 10 ml
Muestra	Solución enzimática purificada con cromatografía de intercambio aniónico
Enjuague	(A) 100%,
Elución	(B) 0 - 100% en 20 ml
Caudal	0,4 ml/min
Fracción	2 ml/tubo

Purificación con filtración por gel

La solución enzimática obtenida mediante la cromatografía hidrófoba arriba descrita se purificó mediante filtración por gel utilizando una columna Superdex 75 de acuerdo con las siguientes condiciones.

10

Tabla 10

Sistema	ÄKTA explorer 10s
Columna	Superdex 75 HR 10/30 (GE Healthcare)
Tampón	Tampón D
Muestra	Fracciones activas purificadas con Phenyl Sepharose
Caudal	0,5 ml/min
Fracción	0,5 ml/tubo

La enzima purificada mediante los métodos arriba descritos se separó con SDS-PAGE, y el grado de purificación se confirmó mediante tinción con plata. La Fig. 8 muestra el resultado de la tinción con plata. Se detectó una banda de proteína simple de la enzima biosintética de piretrina con un peso molecular de aproximadamente 40.000.

15 Ejemplo 2

Se llevaron a cabo procedimientos de análisis de la secuencia de aminoácidos cruda arriba descrita (a) o (b) para determinar la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la enzima biosintética de piretrina obtenida en el Ejemplo 1, y también se preparó un transformante que introduce un vector que porta un gen, que codifica la proteína de la secuencia de aminoácidos arriba descrita, tal como se describe a continuación.

20 Análisis de los segmentos de aminoácidos que incluyen la proteína de enzima biosintética de piretrina

La banda proteínica obtenida en el Ejemplo 1 se separó del gel y se utilizó como muestra para un análisis de secuencia de aminoácidos interna. Además, la banda de un SDS-PAGE se transfirió a una membrana de PVDF, se detectó con tinción con azul de Coomassie, y la banda separada se utilizó para el análisis de aminoácidos N-terminales. Esta serie de manipulaciones se llevó a cabo de acuerdo con métodos bien conocidos.

25 Como resultado de los análisis de aminoácidos arriba descritos, se confirmaron ejemplos de secuencias de aminoácidos crudas, Secuencias nº 6, 7 y 8, incluyendo la proteína de enzima mostrada en las Fig. 9 (a), (b) y (c), respectivamente.

Diseño de cebadores y determinación de una secuencia de ADNc de longitud completa

30 Se determinó la secuencia de ADNc de longitud completa (Fig. 2, Secuencia nº 5) y la secuencia de aminoácidos (Fig. 1, Secuencia nº 1) de acuerdo con los métodos arriba descritos basados en secuencias de aminoácidos determinadas mediante análisis de aminoácidos. Los métodos utilizados en esta serie de manipulaciones, incluyendo la preparación de ADNc, la PCR y los análisis de secuencias utilizando un secuenciador de ADN, se llevaron a cabo de acuerdo con métodos bien conocidos.

Determinación de una secuencia de aminoácidos de longitud completa

La secuencia de aminoácidos N-terminal de la enzima biosintética de piretrina determinada mediante los análisis arriba indicados es una secuencia sin una porción desde el extremo N hasta la serina (S) 27 de la secuencia de aminoácidos de la Secuencia nº 1, como muestra la Fig. 1 (b) Secuencia nº 2. Y, tal como se describe más arriba, mientras que la secuencia de aminoácidos troncada mostrada en la Secuencia nº 2 corresponde a la secuencia de la proteína que tiene actividad enzimática en el piretro, los 27 residuos de aminoácidos eliminados son una secuencia señal para la translocación, que tiene la función de asegurar las condiciones para una biosíntesis sin problemas de la piretrina. Por consiguiente, la secuencia de la Fig. 1 (a), que incluye los 27 residuos de aminoácidos arriba indicados, es decir, la secuencia de aminoácidos de Secuencia nº 1, corresponde a la secuencia de la enzima biosintética de piretrina incluyendo dicha secuencia señal para la translocación.

Además, la proteína con las secuencias de aminoácidos de las Secuencias nº 3 y 4 se obtiene mediante expresión abundante de un gen codificador de una proteína con la secuencia de aminoácidos de Secuencia nº 1, que se integran en un vector y se introducen en *E. coli*. Ya se ha señalado en una realización (c) de la presente invención que esta proteína tiene muchas posibilidades de presentar la actividad de una enzima biosintética de piretrina y de estar presente en plantas capaces de producir piretrina.

Producción de vector y transformante

La construcción de un vector y un transformante que portan el gen de la enzima biosintética de piretrina arriba descrito se llevó a cabo tal como se describe a continuación.

Los vectores disponibles en la presente invención incluyen vectores existentes utilizados para la transformación de microorganismos, plantas y células vegetales. En base al conocimiento común del experto en la materia, es esencialmente previsible que dichos vectores pueden contener un promotor constitutivo o inducible para expresar genes conocidos; una proteína de facilitación de solubilización y purificación de la proteína expresada tal como un marcador de histidina, glutatión S-transferasa; una proteína de fusión tal como una proteína de unión de maltosa; un gen de resistencia a un fármaco que facilita la selección de transformantes, y orígenes de replicación para un sistema de vector binario de *Agrobacterium* además de una parte del gen de longitud completa arriba indicado que codifica la enzima biosintética de piretrina arriba indicada.

Específicamente, por ejemplo, el vector pET (Novagen), el vector pGEX (GE Healthcare) y el vector pMAL (New England Biolab) pueden utilizarse para la introducción en microorganismos como *E. coli*. Los vectores apropiados para la introducción en plantas con *Agrobacterium* incluyen pBI101 y pBI121. No hay ninguna limitación específica en cuanto al tipo de vectores cuando el vector se introduce en células vegetales mediante electroporación o el método de pistola genética. Además, los genes de resistencia a fármacos arriba indicados incluyen genes de resistencia a la ampicilina, kanamicina e higromicina. Como ejemplos de los promotores arriba indicados se pueden utilizar el promotor 35S derivado de un virus mosaico de la coliflor (promotor constitutivo) o promotores de proteínas inducidas por choque térmico (promotor inducible). Los orígenes de replicación incluyen orígenes de replicación derivados de plásmidos Ti o Ri. Es esencialmente previsible que la construcción de estos transformantes será factible en base al conocimiento medio del experto en la materia.

Cuando los transformantes arriba descritos se construyen con microorganismos tales como *E. coli* y levadura, es posible convertir una sustancia utilizando un sistema de células microbianas. Además, la construcción de los transformantes arriba descritos utilizando plantas asteráceas, tales como clavelón de la India, caléndula y zinnia, que son conocidas por producir una pequeña cantidad de piretrina inferior a la necesaria para un uso práctico, y la mejora de la capacidad de síntesis de piretrina posibilitan una producción eficaz de piretrina en plantas con un crecimiento más rápido que el del piretro. Por consiguiente, esto resulta útil para la producción de insecticidas.

EFFECTO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona secuencias de aminoácidos de enzimas relacionadas con la biosíntesis de piretrina y una secuencia de bases de un gen de la misma y, en consecuencia, ofrece perspectivas para producir de forma económica y eficaz piretrina, altamente útil y segura como materia prima en insecticidas, mediante el uso de plantas de crecimiento rápido. Por consiguiente, esto indica una posibilidad de que la presente invención puede hacer una gran contribución a la industria de los insecticidas.

Además, la presente invención puede utilizarse en todas las áreas industriales en las que se utilizan piretroides para insecticidas, en particular en el área de los dispositivo insecticidas que utilizan piretroides como ingredientes activos, tales como espirales anti-mosquitos/moscas, espráis insecticidas, dispositivos de calor y transpiración para insecticidas líquidos, y esterillas electrotérmicas anti-mosquitos.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Dainihon Jochugiku Co., Ltd.

<110> Educational Foundation Kinki University

5 <120> Proteína que presenta actividad de enzima biosintética piretrina, gen codificador de la proteína, y vector que porta el gen

<150> 2008-208295

<151> 13 de agosto de 2008

<160> 8

<170> Patentboy Version 3.41

10 <210>

<211> 365

<212> PRT

<213> Flor de insecto

<400> 1

```

Met Ala Val Ala Ser Ser Lys Arg Gly Ala Leu Val Leu Val Ala
1          5          10          15
Val Leu Cys Leu Ser Leu Pro Thr Gly Cys Leu Ser Ser Gln Gln
20        25        30
Ala Ala Ala Leu Phe Ile Phe Gly Asp Ser Val Phe Asp Pro Gly
35        40        45
Asn Asn Asn His Ile Asn Thr His Val Asn Phe Lys Ala Asn Phe
50        55        60
Trp Pro Tyr Gly Gln Ser Tyr Phe Ser Ser Pro Thr Gly Arg Phe
65        70        75
Ser Asp Gly Arg Ile Ile Pro Asp Phe Ile Ala Glu Tyr Ala Ser
80        85        90
Leu Pro Ile Ile Pro Ala Tyr Leu Glu Pro Asn Asn Asp Phe Thr
95        100       105
His Gly Ala Asn Phe Ala Ser Ala Gly Ala Gly Ala Leu Ile Ala
110       115       120
Ser His Ala Gly Leu Ala Val Gly Leu Gln Thr Gln Leu His Tyr
125       130       135
Phe Gly Asp Leu Val Asp His Tyr Arg Gln Asn Leu Gly Asp Ile
140       145       150
Lys Ser Arg Gln Leu Leu Ser Asp Ala Val Tyr Leu Phe Ser Cys
155       160       165
Gly Gly Asn Asp Tyr Gln Ser Pro Tyr Tyr Pro Tyr Thr Gln Glu
170       175       180
Gln Tyr Val Asp Ile Val Ile Gly Asn Met Thr Asn Val Ile Lys
185       190       195
Gly Ile Tyr Glu Lys Gly Gly Arg Lys Phe Gly Val Val Asn Val
200       205       210
Pro Leu Ile Gly Cys Trp Pro Gly Met Arg Ala Lys Gln Pro Gly
215       220       225

```

15

Asn	Ala	Cys	Asn	Thr	Glu	Val	Asp	Glu	Leu	Thr	Arg	Leu	His	Asn
				230					235					240
Gln	Ala	Phe	Ala	Lys	Thr	Leu	Glu	His	Leu	Glu	Lys	Gln	Leu	Glu
				245					250					255
Gly	Phe	Val	Tyr	Ala	Lys	Phe	Asp	Leu	Ser	Thr	Ala	Ile	Leu	Asn
				260					265					270
Arg	Met	Lys	Asn	Pro	Ser	Lys	Tyr	Gly	Phe	Lys	Glu	Gly	Glu	Ser
				275					280					285
Ala	Cys	Cys	Gly	Ser	Gly	Pro	Phe	Gly	Gly	Asn	Tyr	Asp	Cys	Gly
				290					295					300
Arg	Ile	Lys	Glu	Phe	Gly	Leu	Cys	Asp	Asn	Ala	Thr	Glu	Tyr	Phe
				305					310					315
Phe	Phe	Asp	Pro	Phe	His	Pro	Asn	Glu	Leu	Ala	Ser	Arg	Gln	Phe
				320					325					330
Ala	Glu	Met	Phe	Trp	Asp	Gly	Asp	Ser	Met	Val	Thr	Gln	Pro	Tyr
				335					340					345
Asn	Leu	Lys	Ala	Leu	Phe	Glu	Gly	Lys	Pro	Ser	Thr	Lys	Tyr	Leu
				350					355					360
Pro	Asn	Asp	Glu	Leu										
				365										

<210> 2

<211> 338

5 <212> PRT

<213> Flor de insecto

<400> 2

Ser	Gln	Gln	Ala	Ala	Ala	Leu	Phe	Ile	Phe	Gly	Asp	Ser	Val	Phe
1			5						10					15
Asp	Pro	Gly	Asn	Asn	Asn	His	Ile	Asn	Thr	His	Val	Asn	Phe	Lys
			20						25					30
Ala	Asn	Phe	Trp	Pro	Tyr	Gly	Gln	Ser	Tyr	Phe	Ser	Ser	Pro	Thr
			35						40					45
Gly	Arg	Phe	Ser	Asp	Gly	Arg	Ile	Ile	Pro	Asp	Phe	Ile	Ala	Glu
			50						55					60
Tyr	Ala	Ser	Leu	Pro	Ile	Ile	Pro	Ala	Tyr	Leu	Glu	Pro	Asn	Asn
			65						70					75
Asp	Phe	Thr	His	Gly	Ala	Asn	Phe	Ala	Ser	Ala	Gly	Ala	Gly	Ala
			80						85					90
Leu	Ile	Ala	Ser	His	Ala	Gly	Leu	Ala	Val	Gly	Leu	Gln	Thr	Gln
			95						100					105
Leu	His	Tyr	Phe	Gly	Asp	Leu	Val	Asp	His	Tyr	Arg	Gln	Asn	Leu
			110						115					120
Gly	Asp	Ile	Lys	Ser	Arg	Gln	Leu	Leu	Ser	Asp	Ala	Val	Tyr	Leu
			125						130					135
Phe	Ser	Cys	Gly	Gly	Asn	Asp	Tyr	Gln	Ser	Pro	Tyr	Tyr	Pro	Tyr
			140						145					150
Thr	Gln	Glu	Gln	Tyr	Val	Asp	Ile	Val	Ile	Gly	Asn	Met	Thr	Asn
			155						160					165
Val	Ile	Lys	Gly	Ile	Tyr	Glu	Lys	Gly	Gly	Arg	Lys	Phe	Gly	Val
			170						175					180
Val	Asn	Val	Pro	Leu	Ile	Gly	Cys	Trp	Pro	Gly	Met	Arg	Ala	Lys
			185						190					195

Gln	Pro	Gly	Asn	Ala	Cys	Asn	Thr	Glu	Val	Asp	Glu	Leu	Thr	Arg
			200						205					210
Leu	His	Asn	Gln	Ala	Phe	Ala	Lys	Thr	Leu	Glu	His	Leu	Glu	Lys
			215						220					225
Gln	Leu	Glu	Gly	Phe	Val	Tyr	Ala	Lys	Phe	Asp	Leu	Ser	Thr	Ala
			230						235					240
Ile	Leu	Asn	Arg	Met	Lys	Asn	Pro	Ser	Lys	Tyr	Gly	Phe	Lys	Glu
			245						250					255
Gly	Glu	Ser	Ala	Cys	Cys	Gly	Ser	Gly	Pro	Phe	Gly	Gly	Asn	Tyr
			260						265					270
Asp	Cys	Gly	Arg	Ile	Lys	Glu	Phe	Gly	Leu	Cys	Asp	Asn	Ala	Thr
			275						280					285
Glu	Tyr	Phe	Phe	Phe	Asp	Pro	Phe	His	Pro	Asn	Glu	Leu	Ala	Ser
			290						295					300
Arg	Gln	Phe	Ala	Glu	Met	Phe	Trp	Asp	Gly	Asp	Ser	Met	Val	Thr
			305						310					315
Gln	Pro	Tyr	Asn	Leu	Lys	Ala	Leu	Phe	Glu	Gly	Lys	Pro	Ser	Thr
			320						325					330
Lys	Tyr	Leu	Pro	Asn	Asp	Glu	Leu							
			335											

<210> 3

<211> 376

<212> PRT

5 <213> Flor de insecto

<400> 3

Met	Ala	Val	Ala	Ser	Ser	Lys	Arg	Gly	Ala	Leu	Val	Leu	Val	Ala
1				5					10					15
Val	Leu	Cys	Leu	Ser	Leu	Pro	Thr	Gly	Cys	Leu	Ser	Ser	Gln	Gln
				20					25					30
Ala	Ala	Ala	Leu	Phe	Ile	Phe	Gly	Asp	Ser	Val	Phe	Asp	Pro	Gly
				35					40					45
Asn	Asn	Asn	His	Ile	Asn	Thr	His	Val	Asn	Phe	Lys	Ala	Asn	Phe
				50					55					60
Trp	Pro	Tyr	Gly	Gln	Ser	Tyr	Phe	Ser	Ser	Pro	Thr	Gly	Arg	Phe
				65					70					75
Ser	Asp	Gly	Arg	Ile	Ile	Pro	Asp	Phe	Ile	Ala	Glu	Tyr	Ala	Ser
				80					85					90
Leu	Pro	Ile	Ile	Pro	Ala	Tyr	Leu	Glu	Pro	Asn	Asn	Asp	Phe	Thr
				95					100					105
His	Gly	Ala	Asn	Phe	Ala	Ser	Ala	Gly	Ala	Gly	Ala	Leu	Ile	Ala
				110					115					120
Ser	His	Ala	Gly	Leu	Ala	Val	Gly	Leu	Gln	Thr	Gln	Leu	His	Tyr
				125					130					135
Phe	Gly	Asp	Leu	Val	Asp	His	Tyr	Arg	Gln	Asn	Leu	Gly	Asp	Ile
				140					145					150
Lys	Ser	Arg	Gln	Leu	Leu	Ser	Asp	Ala	Val	Tyr	Leu	Phe	Ser	Cys
				155					160					165
Gly	Gly	Asn	Asp	Tyr	Gln	Ser	Pro	Tyr	Tyr	Pro	Tyr	Thr	Gln	Glu
				170					175					180
Gln	Tyr	Val	Asp	Ile	Val	Ile	Gly	Asn	Met	Thr	Asn	Val	Ile	Lys
				185					190					195
Gly	Ile	Tyr	Glu	Lys	Gly	Gly	Arg	Lys	Phe	Gly	Val	Val	Asn	Val
				200					205					210
Pro	Leu	Ile	Gly	Cys	Trp	Pro	Gly	Met	Arg	Ala	Lys	Gln	Pro	Gly
				215					220					225
Asn	Ala	Cys	Asn	Thr	Glu	Val	Asp	Glu	Leu	Thr	Arg	Leu	His	Asn
				230					235					240
Gln	Ala	Phe	Ala	Lys	Thr	Leu	Glu	His	Leu	Glu	Lys	Gln	Leu	Glu
				245					250					255
Gly	Phe	Val	Tyr	Ala	Lys	Phe	Asp	Leu	Ser	Thr	Ala	Ile	Leu	Asn
				260					265					270
Arg	Met	Lys	Asn	Pro	Ser	Lys	Tyr	Gly	Phe	Lys	Glu	Gly	Glu	Ser
				275					280					285
Ala	Cys	Cys	Gly	Ser	Gly	Pro	Phe	Gly	Gly	Asn	Tyr	Asp	Cys	Gly
				290					295					300
Arg	Ile	Lys	Glu	Phe	Gly	Leu	Cys	Asp	Asn	Ala	Thr	Glu	Tyr	Phe
				305					310					315
Phe	Phe	Asp	Pro	Phe	His	Pro	Asn	Glu	Leu	Ala	Ser	Arg	Gln	Phe
				320					325					330
Ala	Glu	Met	Phe	Trp	Asp	Gly	Asp	Ser	Met	Val	Thr	Gln	Pro	Tyr
				335					340					345
Asn	Leu	Lys	Ala	Leu	Phe	Glu	Gly	Lys	Pro	Ser	Thr	Lys	Tyr	Leu
				350					355					360
Pro	Asn	Asp	Glu	Leu	Ala	Ala	Ala	Leu	Glu	His	His	His	His	His
				365					370					375
His														

<211> 599
 <212> PRT
 <213> Flor de insecto

<400> 4

Met	Ser	Pro	Ile	Leu	Gly	Tyr	Trp	Lys	Ile	Lys	Gly	Leu	Val	Gln
1				5				10						15
Pro	Thr	Arg	Leu	Leu	Leu	Glu	Tyr	Leu	Glu	Glu	Lys	Tyr	Glu	Glu
			20					25						30
His	Leu	Tyr	Glu	Arg	Asp	Glu	Gly	Asp	Lys	Trp	Arg	Asn	Lys	Lys
			35					40						45
Phe	Glu	Leu	Gly	Leu	Glu	Phe	Pro	Asn	Leu	Pro	Tyr	Tyr	Ile	Asp
			50					55						60
Gly	Asp	Val	Lys	Leu	Thr	Gln	Ser	Met	Ala	Ile	Ile	Arg	Tyr	Ile
			65					70						75
Ala	Asp	Lys	His	Asn	Met	Leu	Gly	Gly	Cys	Pro	Lys	Glu	Arg	Ala
			80					85						90
Glu	Ile	Ser	Met	Leu	Glu	Gly	Ala	Val	Leu	Asp	Ile	Arg	Tyr	Gly
			95					100						105
Val	Ser	Arg	Ile	Ala	Tyr	Ser	Lys	Asp	Phe	Glu	Thr	Leu	Lys	Val
			110					115						120
Asp	Phe	Leu	Ser	Lys	Leu	Pro	Glu	Met	Leu	Lys	Met	Phe	Glu	Asp
			125					130						135
Arg	Leu	Cys	His	Lys	Thr	Tyr	Leu	Asn	Gly	Asp	His	Val	Thr	His
			140					145						150

Pro Asp Phe Met	Leu Tyr Asp Ala Leu	Asp Val Val Leu Tyr Met
155		160 165
Asp Pro Met Cys	Leu Asp Ala Phe Pro	Lys Leu Val Cys Phe Lys
170		175 180
Lys Arg Ile Glu	Ala Ile Pro Gln Ile	Asp Lys Tyr Leu Lys Ser
185		190 195
Ser Lys Tyr Ile	Ala Trp Pro Leu Gln	Gly Trp Gln Ala Thr Phe
200		205 210
Gly Gly Gly Asp	His Pro Pro Lys Ser	Asp Leu Glu Val Leu Phe
215		220 225
Gln Gly Pro Leu	Gly Ser Pro Glu Phe	Met Ala Val Ala Ser Ser
230		235 240
Lys Arg Gly Ala	Leu Val Leu Val Ala	Val Leu Cys Leu Ser Leu
245		250 255
Pro Thr Gly Cys	Leu Ser Ser Gln Gln	Ala Ala Ala Leu Phe Ile
260		265 270
Phe Gly Asp Ser	Val Phe Asp Pro Gly	Asn Asn Asn His Ile Asn
275		280 285
Thr His Val Asn	Phe Lys Ala Asn Phe	Trp Pro Tyr Gly Gln Ser
290		295 300
Tyr Phe Ser Ser	Pro Thr Gly Arg Phe	Ser Asp Gly Arg Ile Ile
305		310 315
Pro Asp Phe Ile	Ala Glu Tyr Ala Ser	Leu Pro Ile Ile Pro Ala
320		325 330
Tyr Leu Glu Pro	Asn Asn Asp Phe Thr	His Gly Ala Asn Phe Ala
335		340 345
Ser Ala Gly Ala	Gly Ala Leu Ile Ala	Ser His Ala Gly Leu Ala
350		355 360
Val Gly Leu Gln	Thr Gln Leu His Tyr	Phe Gly Asp Leu Val Asp
365		370 375
His Tyr Arg Gln	Asn Leu Gly Asp Ile	Lys Ser Arg Gln Leu Leu
380		385 390
Ser Asp Ala Val	Tyr Leu Phe Ser Cys	Gly Gly Asn Asp Tyr Gln
395		400 405
Ser Pro Tyr Tyr	Pro Tyr Thr Gln Glu	Gln Tyr Val Asp Ile Val
410		415 420
Ile Gly Asn Met	Thr Asn Val Ile Lys	Gly Ile Tyr Glu Lys Gly
425		430 435
Gly Arg Lys Phe	Gly Val Val Asn Val	Pro Leu Ile Gly Cys Trp
440		445 450
Pro Gly Met Arg	Ala Lys Gln Pro Gly	Asn Ala Cys Asn Thr Glu
455		460 465
Val Asp Glu Leu	Thr Arg Leu His Asn	Gln Ala Phe Ala Lys Thr
470		475 480
Leu Glu His Leu	Glu Lys Gln Leu Glu	Gly Phe Val Tyr Ala Lys
485		490 495
Phe Asp Leu Ser	Thr Ala Ile Leu Asn	Arg Met Lys Asn Pro Ser
500		505 510
Lys Tyr Gly Phe	Lys Glu Gly Glu Ser	Ala Cys Cys Gly Ser Gly
515		520 525
Pro Phe Gly Gly	Asn Tyr Asp Cys Gly	Arg Ile Lys Glu Phe Gly
530		535 540

Leu	Cys	Asp	Asn	Ala	Thr	Glu	Tyr	Phe	Phe	Phe	Asp	Pro	Phe	His
				545					550	~				555
Pro	Asn	Glu	Leu	Ala	Ser	Arg	Gln	Phe	Ala	Glu	Met	Phe	Trp	Asp
				560					565					570
Gly	Asp	Ser	Met	Val	Thr	Gln	Pro	Tyr	Asn	Leu	Lys	Ala	Leu	Phe
				575					580					585
Glu	Gly	Lys	Pro	Ser	Thr	Lys	Tyr	Leu	Pro	Asn	Asp	Glu	Leu	
				590					595					

<210> 5
 <211> 1479
 <212> ADN
 5 <213> Flor de insecto
 <400> 5

```

ttaaacggga tgtccaaagw catttaactt ccactagcaa gttagagcat 50
ttttcacacc tcttgatctg agcacatata agctatggct gttgcaagca 100
gcaawcgggg tgctcttggt ttgggtgctg ttttgtgtct ttcactacct 150
acaggttgcc tgagttctca acaagctgct gcactattta tatttgggtga 200
ttcggttttc gatcctggta acaataacca catcaacacc catgttaatt 250
ttaaagcgaa cttttggcca tatgttcaat cctacttcag ttcaccaact 300
ggtagattct ctgatggcgg tatcatccct gatttcattg ctgagtatgc 350
aagtctgcct atcatctctg cgtatctcga gccaaacaat gattttacgc 400
atggagcmaa ctttgcgtca gcaggagcgg gtgccttgat tgcctcccat 450
gctggacttg cagttggcct tcaaacacaa ctacattact ttggcgattt 500
agtagaccat tatcggcaga atttagggtga tattaatatc aggcagctac 550
tatccgatgc tgtctacttg tttagctgtg gaggtaacga ctaccaaagc 600
ccttactatc catatactca agagcaatac gtggacattg tgattggaaa 650
catgactaac gtcatacaag gaatatacga aaaagggtga agaaaatttg 700
gggttggtga tgtcccgctt ataggctgtt ggccgggaat gcgagcaaaa 750
caacctggaa atgcttgcaa cacagaggtc gatgaactta ctgactaca 800
caatcaagca tttgcaaaaa cactagaaca tttggagaaa cagttggaag 850
gctttgtgta tgctaaattc gatctttcaa ctgccattct caatagaatg 900
aagaaccctt caaaatatgg ttttaaggaa ggcgagagcg catgttgagg 950
tagtggtcct tttggaggga attatgattg tggcagaata aaagagtttg 1000
gactatgtga taatgcaact gagtattttt tctttgacct ttttcatcct 1050
aatgaattgg cgagtcgcca atttgcagag atgttttggg atggggattc 1100
catggtcaca cagccttaca atttgaaagc actctttgaa gggaagccat 1150
caacaaaata tctcccaaat gatgagctct aatgtagagc atgttgactc 1200
ggttctttct ccatgatcga rccattagca aaataataat atgaggtcac 1250
actagcaaca taatggaatg atcttaataa tgccatggtc ttcttcatga 1300
ttgttccgtc tttttagttt gactttttta tttgatcttg ttgaaccgaa 1350
tcaagggaact tttgatgacc atgattcgat tcatattctt tagttgtcat 1400
gttggcttta aaaaactatc tacgtatgtc aatgtagcaa cttctgggtta 1450
ttaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1479
    
```

<210> 6
 <211> 33
 <212> PRT
 10 <213> Flor de insecto
 <400> 6

ES 2 452 641 T3

Ser Gln Gln Ala Ala Ala Leu Phe Ile Phe Gly Asp Ser Val Phe
1 5 10 15

Asp Pro Gly Asn Asn Asn His Ile Asn Thr His Val Asn Phe Lys
20 25 30
Ala Asn Phe

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

5 <213> Flor de insecto

<400> 7

Gln Asn Leu Gly Asp Ile Lys
1 5

<210> 8

<211> 9

10 <212> PRT

<213> Flor de insecto

<400> 8

Gln Leu Glu Gly Phe Val Tyr Ala Lys
1 5

15

REIVINDICACIONES

1. Método para producir una enzima biosintética de piretrina de una proteína con un peso molecular de aproximadamente 40.000, donde la materia prima de la enzima es una solución enzimática cruda preparada a partir de una flor de piretro;
- 5 donde se utiliza (1R)-trans-crisantemoil-CoA y (S)-piretrolona como sustratos para una ensayo que confirma una función activa de la enzima biosintética del piretro;
- donde la enzima biosintética de piretro se produce mediante un procedimiento de purificación que incluye los pasos secuenciales de:
 - 10 obtener un precipitado de fraccionamiento de proteína cruda con precipitación de sulfato de amonio;
 - someter el precipitado a una purificación cruda mediante un método por lotes utilizando una resina hidrófoba;
 - purificar la solución enzimática obtenida mediante la purificación cruda por cromatografía de intercambio aniónico;
 - 15 purificar por cromatografía hidrófoba; y
 - purificar por filtración en gel.
2. Una de las siguientes proteínas (i) o (ii), correspondiente a una enzima extraíble de cuerpos de plantas productoras de piretrina:
 - (i) una proteína consistente en la secuencia de aminoácidos mostrada en la Secuencia nº 1; o
 - 20 (ii) una proteína consistente en la secuencia de aminoácidos que incluye una o más de las modificaciones consistentes en sustitución, delección, inserción y/o adición de un aminoácido en la secuencia de aminoácidos mostrada en la Secuencia nº 1, presentando la proteína la actividad de una enzima biosintética de piretrina, utilizándose (1R)-trans-crisantemoil-CoA y (S)-piretrolona como sustratos para un ensayo para confirmar la función activa de la enzima biosintética del piretro.
 - 25
3. Proteína consistente en la secuencia de aminoácidos mostrada en la Secuencia nº 2, o proteína consistente en la secuencia de aminoácidos mostrada en la Secuencia nº 3, o proteína consistente en la secuencia de aminoácidos mostrada en la Secuencia nº 4, correspondientes a una enzima extraíble de cuerpos de plantas productoras de piretrina.
- 30 4. Gen codificador de una de las siguientes proteínas (i) o (ii), correspondiente a una enzima extraíble de cuerpos de plantas productoras de piretrina:
 - (i) una proteína consistente en la secuencia de aminoácidos mostrada en la Secuencia nº 1; o
 - 35 (ii) una proteína consistente en la secuencia de aminoácidos que incluye una o más de las modificaciones consistentes en sustitución, delección, inserción y/o adición de un aminoácido de la secuencia de aminoácidos mostrada en la Secuencia nº 1, presentando la proteína la actividad de una enzima biosintética de piretrina, utilizándose (1R)-trans-crisantemoil-CoA y (S)-piretrolona como sustratos para una prueba para confirmar la función activa de la enzima biosintética de piretro.
- 40 5. Gen según la reivindicación 4, que consiste en la secuencia de bases mostrada en la Secuencia nº 5; codificando el gen la proteína de (i).
6. Gen según la reivindicación 5, que incluye la secuencia de bases de 85 a 1.179 de la secuencia de bases mostrada en la Secuencia nº 5 como marco de lectura abierto.
7. Gen codificador de cualquiera de las siguientes proteínas: una proteína consistente en la secuencia de aminoácidos mostrada en la Secuencia nº 2, o una proteína consistente en la secuencia de aminoácidos mostrada en la Secuencia nº 3, o una proteína consistente en la secuencia de aminoácidos mostrada en la Secuencia nº 4, correspondiente a una enzima extraíble de cuerpos de plantas productoras de piretrina.
- 45

8. Vector que porta un gen de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7.

Fig. 1

(,Secuencia nº 1 o. 1

MAVASSKRGALVLVAVLCLSLPTGCLSSQQAALFIFGDSVFDPGNNNHINTHVNEKA
NFWPYGQSYFSSPTGRFSDGRIIPDFIAEYASLPIIPAYLEPNNDFTHGANSFASAGAGA
LIASHAGLAVGLQTQLHYFGDLVDHYRQNLGDIKSRQLLSDAVYLFSCGGNDYQSPY
YPYTQEYVVDIVIGNMTNVIKGIYEKGGRKFGVVNVPLIGCWPGMRAKQPGNACNT
EVDELTRLHNQAFKTLHLEKQLEGFVYAKFDLSTAILNRMKNPSKYGFKEGESAC
CGSGPFGGNYDCGRIKEFGLCDNATEYFFFDPPHPNELASRQFAEMFWDGDSMVTQ
PYNLKALFEGKPSTKYLPNDEL

(,Secuencia nº 2 o. 2

SQQAALFIFGDSVFDPGNNNHINTHVNFKANFWPYGQSYFSSPTGRFSDGRIIPDFI
AEYASLPIIPAYLEPNNDFTHGANSFASAGAGALIASHAGLAVGLQTQLHYFGDLVDHY
RQNLGDIKSRQLLSDAVYLFSCGGNDYQSPYYPYTQEYVVDIVIGNMTNVIKGIYEKG
GRKFGVVNVPLIGCWPGMRAKQPGNACNTEVDELTRLHNQAFKTLHLEKQLEGF
VYAKFDLSTAILNRMKNPSKYGFKEGESACCGSGPFGGNYDCGRIKEFGLCDNATEY
FFFDPPHPNELASRQFAEMFWDGDSMVTQPYNLKALFEGKPSTKYLPNDEL

(,Secuencia nº 3 o. 3

MAVASSKRGALVLVAVLCLSLPTGCLSSQQAALFIFGDSVFDPGNNNHINTHVNFKA
NFWPYGQSYFSSPTGRFSDGRIIPDFIAEYASLPIIPAYLEPNNDFTHGANSFASAGAGA
LIASHAGLAVGLQTQLHYFGDLVDHYRQNLGDIKSRQLLSDAVYLFSCGGNDYQSPY
YPYTQEYVVDIVIGNMTNVIKGIYEKGGRKFGVVNVPLIGCWPGMRAKQPGNACNT
EVDELTRLHNQAFKTLHLEKQLEGFVYAKFDLSTAILNRMKNPSKYGFKEGESAC
CGSGPFGGNYDCGRIKEFGLCDNATEYFFFDPPHPNELASRQFAEMFWDGDSMVTQ
PYNLKALFEGKPSTKYLPNDELAAALEHHHHHH

(,Secuencia nº 4 o. 4

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLLEYLEEKYEELHYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPY
YIDGDVKLTQSMARIYIADKHNMLGGCPKERAIEISMLEGAVLDIRYGVSRISYKDFE
TLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCLD
AFPKLVCFKKRIEAIPIQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFCGGDHPPKSDLEVLFGGPL
QSPFEMAVASSKRGALVLVAVLCLSLPTGCLSSQQAALFIFGDSVFDPGNNNHINTH
VNFKANFWPYGQSYFSSPTGRFSDGRIIPDFIAEYASLPIIPAYLEPNNDFTHGANSFAS
AGAGALIASHAGLAVGLQTQLHYFGDLVDHYRQNLGDIKSRQLLSDAVYLFSCGGND
YQSPYYPYTQEYVVDIVIGNMTNVIKGIYEKGGRKFGVVNVPLIGCWPGMRAKQPGN
ACNTEVDELTRLHNQAFKTLHLEKQLEGFVYAKFDLSTAILNRMKNPSKYGFKEG
ESACCGSGPFGGNYDCGRIKEFGLCDNATEYFFFDPPHPNELASRQFAEMFWDGDS
MVTQPYNLKALFEGKPSTKYLPNDEL

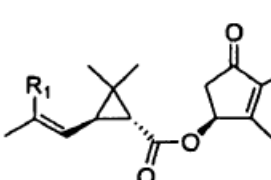
Fig. 2

Secuencia nº 5 o. 5

TTAAACGGGATGTCCAAAGWCATTTAACTTCCACTAGCAAGTTAGAGCATTTTTTCAC
 ACCTCTTGATCTGAGCACATATAAGCTATGGCTGTTGCAAGCAGCAAWCGGGGTGCT
 CTTGTTTTGGTTGCTGTTTTGTGTCTTTCACTACCTACAGGTTGCCTGAGTTCTCAA
 CAAGCTGCTGCACTATTTATATTTGGTGATTCCGGTTTTCGATCCTGGTAACAATAACC
 ACATCAACACCCATGTTAATTTTAAAGCGAACTTTTGGCCATATGGTCAATCCTACTT
 CAGTTCAACCACTGGTAGATTCTCTGATGGCCGTATCATCCCTGATTTTCATTGCTGA
 GTATGCAAGTCTGCCTATCATTCCTGCGTATCTCGAGCCAAACAATGATTTTACGCAT
 GGAGCMAACTTTGCGTCAGCAGGAGCCGGTGCCCTTGATTGCCTCCCATGCTGGACT
 TGCAGTTGGCCTTCAAACACAACACTACATTACTTTGGCGATTTAGTAGACCATTATCG
 GCAGAATTTAGGTGATATTAAATCTAGGCAGCTACTATCCGATGCTGTCTACTTGT
 AGCTGTGGAGGTAACGACTAECGAAAGCCCTTACTATCCATATACTCAAGAGCAATAC
 GTGGACATTGTGATTGGAAACATGACTAACGTCATCAAGGGAATATACGAAAAAGGT
 GGAAGAAAATTTGGGGTTGTGAATGTCCCGCTTATAGGCTGTTGGCCGGGAATGCG
 AGCAAAACAACCTGGAAATGCTTGCAACACAGAGGTCGATGAACTTACTAGACTACA
 CAATCAAGCATTTGCAAAACACTAGAACATTTGGAGAAACAGTTGGAAGGCTTTGT
 GTATGCTAAATTCGATCTTTCAACTGCCATTCTCAATAGAATGAAGAACCCCTCAAAA
 TATGGTTTTTAAGGAAGGCGAGAGCGCATGTTGCGGTAGTGGTCCTTTTGGAGGGAA
 TTATGATTGTGGCAGAAATAAAGAGTTTGGACTATGTGATAATGCAACTGAGTATTTT
 TTCTTTGACCCTTTTCATCCTAATGAATTGGCGAGTCGCCAATTTGCAGAGATGTTTT
 GGGATGGGGATTCCATGGTCACACAGCCTTACAATTTGAAAGCACTCTTTGAAGGGA
 AGCCATCAACAAAATATCTCCCAAATGATGAGCTCTAATGTAGAGCATGTTGACTCG
 GTTCTTTCTCCATGATCGARCCATTAGCAAAATAATAATATGAGGTCACACTAGCAAC
 ATAATGGAATGATCTTAATAATGCCATGGTCTTCTTCATGATTGTTCCGTCTTTTAG
 TTTGACTTTTTTATTTGATCTTGTGTAACCGAATCAAGGGACTTTTGATGACCATGAT
 TCGATTATATTTCTTTAGTTGTGATGTTGGCTTTAAAAAACTATCTACGTATGTCAAT
 GTAGCAACTTCTGGTTATTAAAAA

Fig 3

[Estructura de piretrinas] ins]



		Cadena lateral de fracción de ácido crisantémico (R ₁)	Cadena lateral de fracción de retrolona (R ₂)	R ₂)
Piretrina I	n I.	-CH ₃	-CH=CH ₂	
Piretrina II	II	-COOCH ₃	-CH=CH ₂	
Cinerina I	I	-CH ₃	-CH ₃	
Cinerina II	II	-COOCH ₃	-CH ₃	
Jasmolina I	n I	-CH ₃	-CH ₂ CH ₃	
Jasmolina II	n II	-COOCH ₃	-CH ₂ CH ₃	

Fracción de ácido crisantémico Fracción de retrolona

Fig. 4

[Reacción de biosíntesis de éster mediante aciltransferasa]

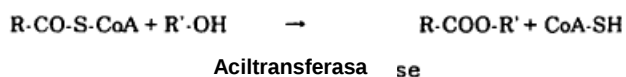


Fig. 5

[Reacción de biosíntesis de piretrina] rin]

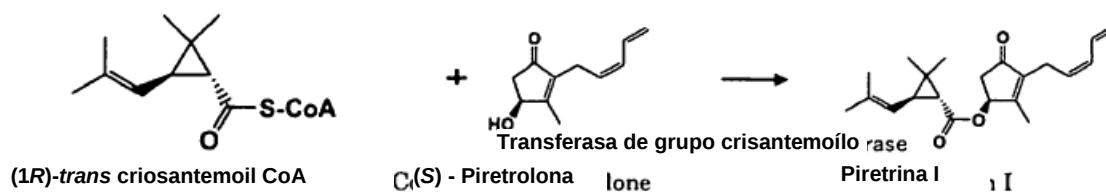


Fig. 6

[Ejemplos de resultados de análisis por HPLC de solución de reacción de biosíntesis de piretrina]

(a) Fracción sin actividad enzimática

(b) Fracción con actividad enzimática

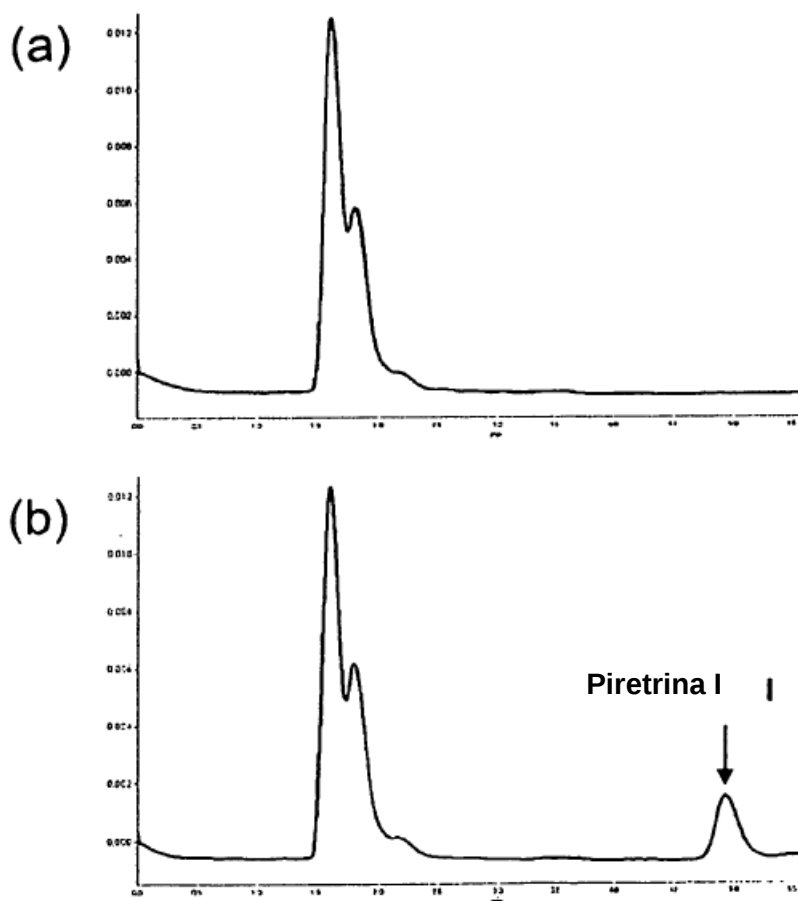


Fig. 7

[Flujo de purificación enzimática a partir de cuerpos de planta]

Preparación de solución enzimática cruda



Fraccionamiento mediante precipitación de sulfato de amonio



Purificación cruda mediante método discontinuo utilizando Phenyl Sepharose



Cromatografía de intercambio aniónico (Q Sepharose)



Cromatografía hidrófoba (Phenyl Superose)



Filtración en gel (Superdex 75)

Fig. 8

Imagen fotográfica de electroforesis (SDS-PAGE) de enzima
biosintética de piretrina purificada

Peso molecular (kDa)

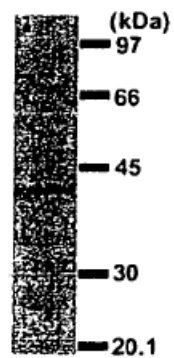


Fig. 9

(Secuencia de aminoácidos nº 6 a 6

SQQAALFIFGDSVFDPGNNNHINTHVNFKANF

(Secuencia de aminoácidos nº 7 a 7

QNLGDIK

(Secuencia de aminoácidos nº 8 a 8

QLEGFVYAK