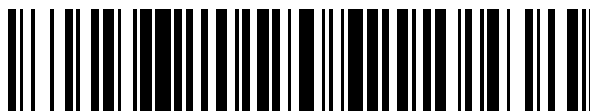


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 876**

51 Int. Cl.:

C12P 7/02 (2006.01)
C12P 7/04 (2006.01)
C12P 5/02 (2006.01)
C12P 5/00 (2006.01)
C12M 1/02 (2006.01)
C10L 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.05.2007 E 07777278 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.10.2014 EP 2021486**

54 Título: **Sistema de producción de compuestos bio-orgánicos**

30 Prioridad:

26.05.2006 US 808989 P
26.05.2006 US 808666 P
18.12.2006 US 870592 P
10.04.2007 US 922782 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.02.2015

73 Titular/es:

AMYRIS, INC. (100.0%)
5885 Hollis Street, Suite 100
Emeryville, CA 94608, US

72 Inventor/es:

RENNINGER, NEIL, STEPHEN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 527 876 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

Sistema de producción de compuestos bio-orgánicos

5 **Antecedentes de la invención**

Tradicionalmente, los compuestos bio-orgánicos de interés se han fabricado por extracción a partir de fuentes naturales tales como plantas, microbios y animales. Sin embargo, los rendimientos de la extracción son normalmente muy bajos ya que, de naturaleza, los compuestos bio-orgánicos se acumulan en pequeñas cantidades. Dado que estas cantidades son muchos menores en comparación con muchas aplicaciones comerciales, continúa existiendo una necesidad de sistemas y procedimientos que produzcan compuestos bio-orgánicos a escala industrial. Newman et al., *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 95, 28 de julio de 2006, páginas 684-691 describen la producción a alto nivel de amorfa-4,11-dieno en un bioreactor de división bifásico de *Escherichia coli* modificada metabólicamente por ingeniería genética.

La presente invención aborda esta necesidad. Se proporcionan diversos sistemas a escala industrial para elaborar compuestos bio-orgánicos usando células hospedadoras. Estos compuestos bio-orgánicos tienen al menos cinco átomos de carbono y pueden ser un hidrato de carbono, tal como, un mono o poli-alcohol, éster, éter, aldehído, acetona o un hidrocarburo tal como un alcano, alqueno o alquino. El compuesto bio-orgánico puede ser lineal o cíclico y puede estar saturado o insaturado.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona diversos sistemas de producción de compuestos bio-orgánicos de acuerdo con las reivindicaciones. En un aspecto, se proporciona un sistema de producción de compuestos bio-orgánicos que comprende:

- a. al menos un recipiente que tenga una capacidad de al menos 100 litros;
- b. un medio acuoso, dentro del recipiente, que comprenda una primera fase;
- c. una pluralidad de células hospedadoras bacterianas o fúngicas genéticamente modificadas, dentro del medio acuoso, capaz de convertir una fuente de carbono del hidrato de carbono presente en el medio acuoso, en al menos un compuesto bio-orgánico que tenga al menos diez átomos de carbono; y
- d. una segunda fase orgánica líquida, que comprenda el al menos un compuesto bio-orgánico en una cantidad de 40-99 % o al menos 90 %, en contacto con la primera fase; en la que el al menos un compuesto bio-orgánico es un compuesto isoprenoide; y en la que la segunda fase orgánica se forme espontáneamente.

En otro aspecto, se proporciona un método de producción de al menos un compuesto bio-orgánico. El método comprende:

- a. cultivar, en un medio acuoso, una pluralidad de células hospedadoras bacterianas o fúngicas genéticamente modificadas que produzcan al menos un compuesto bio-orgánico que tenga al menos diez átomos de carbono, en el que el medio acuoso forme una primera fase, y en el que las células en la pluralidad conviertan una fuente de carbono del hidrato de carbono presente en el medio acuoso en el al menos un compuesto bio-orgánico que tenga al menos diez átomos de carbono;
- b. formar una segunda fase orgánica líquida, que comprenda el al menos un compuesto bio-orgánico en una cantidad de 40-99 %, en contacto con la primera fase;
- c. separar de la primera fase al menos una parte de la segunda fase; y
- d. aislar el al menos un compuesto bio-orgánico de la segunda fase; en el que el al menos un compuesto bio-orgánico es un compuesto isoprenoide; y en el que la segunda fase orgánica se forma espontáneamente;

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un recipiente que tiene una capacidad de al menos 100 litros, para su uso en la presente invención.

La Figura 2 es otra realización del recipiente.

La Figura 3 es una representación esquemática de la ruta del mevalonato ("MEV") para la producción de isopentenil difosfato ("IPP").

La Figura 4 es una representación esquemática de la ruta DXP para la producción de IPP y dimetilalil pirofosfato ("DMAPP"). Dxs es 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa; Dxr es 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato reducto isomerasa (conocida también como IspC); IspD es 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol sintasa; IspE es 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol sintasa; IspF es 2C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato sintasa; IspG es 1-hidroxi-2-metil-2-(E)-butenil 4-difosfato sintasa (IspG); e IspH es isopentenil/dimetilalil difosfato sintasa.

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

La Figura 6 muestra un mapa del plásmido de expresión pMBIS-ggps.

La Figura 7 muestra un mapa del plásmido de expresión Pam00408.

La Figura 8 muestra un mapa del plásmido de expresión pAM424.

La Figura 9 muestra un mapa de los plásmidos de expresión pTrc99A-ADS, pTrc99A-FSA, pTrc99A-LLS, pTrc99A-LMS, pTrc99AGTS, pTrc99A-APS, pTrc99A-BPS, pTrc99A-PHS, pTrc99A-TS, pTrc99A-CS, pTrc99A-SS y pAM373.

La Figura 10 son esquemas para la construcción de los plásmidos pAM489-pAM498.

Descripción detallada de la invención

Definición

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el normalmente entendido por un experto habitual en la técnica a la cual pertenece esta invención. En el presente documento se hace referencia a diversos términos que se definirán y que tienen los siguientes significados:

“Compuesto bio-orgánico” se refiere a un compuesto orgánico que tiene al menos cinco átomos de carbono que puede elaborar una célula hospedadora tomando una fuente de carbono del hidrato de carbono y convirtiendo la fuente de carbono del hidrato de carbono en el producto deseado.

“Ruta de la desoxixilulosa 5-fosfato” o “ruta DXP”, como se usa el presente documento, se refiere a la ruta que convierte el gliceraldehído-3-fosfato y el piruvato en IPP y DMAPP. La ruta DXP se ilustra esquemáticamente en la Figura 4.

“Endógeno” se refiere a una sustancia o proceso que puede producirse de manera natural, por ejemplo, en una célula hospedadora no recombinante.

“Ácido nucleico heterólogo” como se usa en el presente documento se refiere a un ácido nucleico en el que al menos uno de lo siguiente es cierto: (a) el ácido nucleico es ajeno (“exógeno”) a (es decir, no se encuentra de manera natural en) una célula hospedadora determinada; (b) el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que se encuentra de manera natural en (es decir, es “endógena a”) una célula hospedadora determinada, pero la secuencia de nucleótidos se produce en una cantidad no natural (por ejemplo, mayor que la esperada o mayor que la encontrada en la naturaleza) en la célula; (c) el ácido nucleico comprende una secuencia de nucleótidos que es diferente de la secuencia de una secuencia de nucleótidos endógena, pero la secuencia de nucleótidos codifica la misma proteína (que tiene la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos) y se produce en una cantidad no natural (por ejemplo, mayor que la esperada o mayor que la encontrada en la naturaleza) en la célula; o (d) el ácido nucleico comprende dos o más secuencias de nucleótidos que no se encuentran en la misma relación entre sí de otra manera en la naturaleza (por ejemplo, el ácido nucleico es recombinante).

“Célula hospedadora” y “microorganismo” se usan indistintamente en el presente documento para referirse a cualquier célula viva arqueobacteriana, bacteriana o eucariota en la que se ha insertado o puede insertarse un ácido nucleico heterólogo. La expresión también se refiere a la descendencia de la célula original, que puede no ser necesariamente completamente idéntica, en cuanto a morfología o complemento de ADN genómico o total, al precursor original, debido a una mutación natural, accidental o deliberada.

“Isoprenoide” y “compuesto isoprenoide” se usan indistintamente en el presente documento y se refiere a un compuesto que puede obtenerse del isopentenil difosfato.

“Aislado” y “aislamiento”, cuando se refiere a un compuesto bio-orgánico, es el enriquecimiento de la cantidad del compuesto bio-orgánico en una composición. Por consiguiente, la cantidad del compuesto bio-orgánico en una composición después de haber aislado el compuesto bio-orgánico o haberlo sometido a la etapa de aislamiento es mayor que la cantidad presente en la composición antes de realizar dicha etapa.

En el presente documento la “ruta del melavonato” o “ruta MEV” se usa para hacer referencia a la ruta biosintética que convierte la acetil-CoA en IPP. La ruta MEV se ilustra esquemáticamente en la Figura 3.

“Origen natural”, aplicado a un ácido nucleico, a una enzima, a una célula o a un organismo, se refiere a un ácido nucleico, enzima, célula u organismo que se encuentra en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia polipeptídica o polinucleotídica que está presente en un organismo, que puede aislarse de una fuente en la naturaleza y que no ha modificado intencionadamente el hombre en el laboratorio, es de origen natural.

“Opcional” u “opcionalmente” significa que la característica o estructura posteriormente descrita puede estar o no presente, o que el acontecimiento o la circunstancia posteriormente descrito puede producirse o no y que la descripción incluye casos en los que una característica o estructura particular está presente y casos en los que la característica o estructura está ausente, o casos en los que se produce el acontecimiento o la circunstancia y casos en los que el acontecimiento y la circunstancia no se producen.

“Pirofosfato” se usa indistintamente en el presente documento con “difosfato”.

Como se usa en el presente documento, una composición que es un compuesto “sustancialmente puro” carece sustancialmente de uno o más compuestos distintos, es decir, la composición contiene más del 80 % vol., más del 90 % vol., más del 95 % vol., más del 96 % vol., más del 97 % vol., más del 98 % vol., más del 99 % vol., más del 99,5 % vol., más del 99,6 % vol., más del 99,7 % vol., más del 99,8 % vol., más del 99,9 % vol. del compuesto; o menos del 20 % vol., menos del 10 % vol., menos del 5 % vol., menos del 4 % vol., menos del 3 % vol., menos del 2 % vol., menos del 1 % vol., menos del 0,5 % vol., menos del 0,1 % vol., o menos del 0,01 % vol. de uno o más compuestos distintos, basándose en el volumen total de la composición.

En la siguiente descripción, todos los números desvelados en el presente documento son valores aproximativos, independientemente de si en relación con la misma se usan las expresiones “alrededor de” o “aproximadamente”. Esto puede variar en 1 por ciento, 2 por ciento, 5 por ciento, o algunas veces, del 10 al 20 por ciento. Siempre que se desvele un intervalo numérico con un límite inferior, RL, y un límite superior, RU, cualquier número que se encuentre dentro del intervalo se desvela específicamente. En particular, se desvelan específicamente los siguientes números dentro el intervalo: $R=RL+k*(RU-RL)$, en el que k es una variable que varía del 1 por ciento al 100 por cien, con un incremento del 1 por ciento, es decir, k es 1 por ciento, 2 por ciento, 3 por ciento, 4 por ciento, 5 por ciento..., 50 por ciento, 51 por ciento, 52 por ciento..., 95 por ciento, 96 por ciento, 97 por ciento, 98 por ciento, 99 por ciento, o 100 por cien. Además, cualquier intervalo definido por dos números R, como se define en lo anterior, se desvela específicamente.

Además de las definiciones anteriores, determinados compuestos descritos en el presente documento tienen uno o más enlaces dobles que pueden existir bien como el isómero Z o como E. En determinadas realizaciones la invención incluye estos compuestos como isómeros individuales en una forma sustancialmente pura así como en mezclas de diversos isómeros, por ejemplo, mezclas racémicas de estereoisómeros.

Aparatos para preparar compuestos bio-orgánicos.

La presente invención proporciona diversos sistemas de producción para preparar compuestos bio-orgánicos. En algunas realizaciones, los compuestos bio-orgánicos pueden producirse usando procesos de fermentación por lotes, continua, semi-discontinua o semi-continua.

La fermentación por lotes puede ser un sistema cerrado en el que la composición de los medios se fija al inicio de la fermentación y no se somete a alteraciones artificiales durante la fermentación. Por tanto, al inicio de la fermentación los medios se inoculan con el organismo u organismos deseados y se permite que se produzca la fermentación sin añadir nada al sistema. Sin embargo, en algunas realizaciones, la fermentación “por lotes” es por lotes con respecto a la adición de la fuente de carbono y con frecuencia se hacen esfuerzos para controlar factores tales como el pH y la concentración de oxígeno. En los sistemas por lotes, el metabolito y las composiciones de la biomasa del sistema pueden cambiar constantemente hasta que se detenga el tiempo de fermentación. En los cultivos por lotes, las células pueden moderarse a través de una fase de latencia estática a una fase logarítmica de alto crecimiento y finalmente a una fase estacionaria en la que la tasa de crecimiento se disminuye o se detiene. Con el tiempo, si no se tratan, las células morirán en la fase estacionaria. Las células en fase logarítmica generalmente son responsables del volumen de producción del producto final o intermedio.

Una variación del sistema por lotes tradicional es el sistema semi-discontinuo. Los procesos de fermentación semi-discontinua también son adecuados en la presente invención y comprenden un sistema por lotes típico con la excepción de que se añade una fuente de carbono o sustrato adicional en incrementos a medida que avanza la fermentación. Los sistemas semi-discontinuos son útiles cuando la represión del catabolito es adecuada para inhibir el metabolismo de las células y cuando es deseable tener cantidades limitadas de sustrato en los medios. La medición de la concentración real del sustrato en los sistemas semi-discontinuos es difícil y se calcula por lo tanto basándose en los cambios de factores medibles tales como pH, oxígeno disuelto y presión parcial de los gases de desecho tales como CO₂.

La fermentación continua es un sistema abierto en el que se añade un medio de fermentación definido de manera continua a uno o más bioreactores que pueden estar en serie y se elimina una misma cantidad de medio acondicionado simultáneamente del sistema durante el procesamiento adicional. La fermentación continua generalmente mantiene los cultivos a una densidad constante alta en la que las células están principalmente en crecimiento de fase logarítmica. La fermentación continua permite la modulación de un factor o de cualquiera de los diversos factores que afectan al crecimiento celular o a la concentración del producto final. Por ejemplo, un método mantendrá un nutriente limitante, tal como la fuente de carbono o el nivel de nitrógeno, a una tasa fija y permitiría moderar los restantes parámetros. En otros sistemas diversos factores que afectan al crecimiento pueden modificarse continuamente, al mismo tiempo que la concentración celular se mantiene constante. Los sistemas continuos se esfuerzan en mantener las condiciones del crecimiento en un estado de equilibrio estacionario y por lo tanto la pérdida de células debida a la extracción de medios debe equilibrarse contra la tasa de crecimiento celular en la fermentación.

Por consiguiente, en algunas realizaciones de la invención, se proporciona un sistema de producción de compuestos bio-orgánicos que comprende:

- a. un recipiente que tenga una capacidad de al menos 100 litros;
- b. un medio acuoso, en el recipiente, formando una primera fase;
- c. una pluralidad de células hospedadoras bacterianas o fúngicas genéticamente modificadas, presente en el medio acuoso, capaz de convertir una fuente de carbono del hidrato de carbono presente en el medio acuoso en al menos un compuesto bio-orgánico que tenga al menos diez átomos de carbono; y
- d. una segunda fase orgánica líquida, que comprende el al menos un compuesto bio-orgánico en una cantidad de 40-99 % o al menos 90 %, en contacto con la primera fase;

en el que al menos un primer compuesto bio-orgánico es un compuesto isoprenoide; y en el que la segunda fase orgánica se forma espontáneamente.

Un recipiente adecuado para su uso en la presente invención puede ser cualquier recipiente que mantenga las células hospedadoras y un medio acuoso para la fermentación. Por ejemplo, el recipiente puede ser un tanque de un reactor o fermentador o puede formar parte de una centrífuga que puede separar materiales más pesados de materiales más ligeros en etapas de procesamiento posteriores. Como alternativa, puede usarse uno o una pluralidad de recipientes en un proceso continuo o semi-continuo.

En la Figura 1 se muestra un ejemplo general ilustrativo de un recipiente 100 adecuado. El recipiente 100 incluye: un puerto de entrada 120 para la adición de células hospedadoras, medios de fermentación y otros compuestos, nutrientes o composiciones para ayudar, regular o mejorar la fermentación de las células hospedadoras, la producción del compuesto o compuestos bio-orgánicos y realizar la etapa de producción adicional en el recipiente; un puerto de salida 130 para retirar los materiales durante o al final del proceso de fermentación, y una salida de gases 140 para purgar al exterior los gases de escape tales como el dióxido de carbono producidos durante o después del proceso de fermentación. El recipiente 100 puede estar completamente cargado con células hospedadoras, medios de fermentación y otros materiales de tal manera que no haya espacio para gases en la parte superior del recipiente. Como alternativa, el recipiente 100 puede estar parcialmente cargado dejando de este modo un espacio vacío ocupado por un gas. La cantidad, presión y composición del gas en el espacio vacío puede controlarse para optimizar o maximizar el crecimiento de las células hospedadoras y la producción del compuesto o compuestos bio-orgánicos. Por ejemplo, durante la fermentación de células hospedadoras aerobias, el gas puede comprender normalmente aire u otro gas que contenga oxígeno a diversas presiones por encima, a nivel de o por debajo de la presión atmosférica, por ejemplo, para células hospedadoras microaerófilas y anaerobias la concentración de oxígeno del gas puede controlarse dentro de un intervalo más bajo que el de la concentración atmosférica siempre y cuando esté por encima de cero durante la fermentación de las células hospedadoras anaerobias, el gas normalmente tiene de poco a nada de oxígeno y puede comprender mayormente o completamente nitrógeno u otro gas adecuado.

En un sistema cerrado, el puerto de entrada 120, el puerto de salida 130 y la salida de gases 140 del recipiente 100 mostrado en la Figura 1 pueden estar cerrados o a presión positiva durante el proceso de fermentación. Como alternativa, particularmente cuando se usan células hospedadoras aerobias, el recipiente 100 puede usarse como un sistema abierto por lo cual uno o más de los puertos y salidas se abren a la atmósfera proporcionando un sistema para la transferencia de masa de gas/líquido (aire u oxígeno entrante y dióxido de carbono saliente). Si se desea, la salida de gases 140 puede funcionar como una salida de gases y como una entrada de gases en la que el oxígeno o el aire u otro gas pueden introducirse en el sistema. En algunas realizaciones, el recipiente 100 incluye entradas de gases distintas y salidas de gases distintas. En dichos sistemas abiertos, al recipiente puede incluirse hardware adicional para prevenir la contaminación o infiltración de otros organismos u otros materiales en el recipiente durante la fermentación.

En la Figura 2 se ilustra otra realización de recipiente. Además del puerto de entrada 220, el puerto de salida 230, la entrada de gases 235 y la salida de gases 240 similares al recipiente de la Figura 1, el recipiente 200 de la Figura 2 incluye un agitador 205 para mezclar. En algunas realizaciones, el agitador 205 puede comprender un eje motorizado 252 que puede incluir una junta de eje 251 y está conectado a uno o más impulsores 254. El agitador 205 puede estar normalmente unido a la parte superior o inferior del recipiente 200. Opcionalmente, cada impulsor 254 puede estar acabado con una o más palas 256. Los impulsores 254 pueden tener cualquier forma adecuada y pueden seleccionarse específicamente para controlar la cantidad de la mezcla, tasa de crecimiento de las células hospedadoras, tasa de producción del compuesto bio-orgánico, velocidad de cizalla y tasas de transferencia de oxígeno o de otros gases. Adicionalmente, pueden añadirse uno o más deflectores 258 al recipiente 200 para mejorar adicionalmente la mezcla. En otras realizaciones, la agitación puede proporcionarse en forma de una línea de reciclado con una bomba que extrae material desde una parte del recipiente, tal como desde la parte inferior y reintroduce el material en el recipiente en otra parte del mismo, tal como en la parte superior. La agitación dentro del recipiente de las células hospedadoras y del medio de fermentación ayuda a garantizar que las células hospedadoras se exponen a nutrientes adecuados que las permite crecer y producir los compuestos bio-orgánicos.

Si el proceso de fermentación es un proceso aerobio, el oxígeno o el aire pueden burbujearse a través de un rociador 260 para mejorar la transferencia de masa de gas/líquido. El rociador 260 puede incluir una o más salidas de gases (no mostrado) que están sumergidas en los medios de fermentación, preferentemente en o cerca de la parte inferior del recipiente. En algunas realizaciones, el rociador 260 puede ser un anillo rociador que tiene múltiples salidas de gas dispuestas en una configuración generalmente circular o redonda. Como alternativa, para organismos sensibles a la cizalla o para reducir la formación de espuma, puede proporcionarse aireación pasiva del recipiente, tal como usando diversos filtros de aireación, membranas, fibras u otros dispositivos de aireación pasiva o eliminando una parte de los medios del recipiente, oxigenándolo y retornándolo al recipiente.

Si se desea controlar de temperatura, entonces puede usarse un calentador o un termo intercambiador para calentar o enfriar la reacción de fermentación. En una realización, la temperatura puede controlarse usando una camisa 270 calefactora/refrigeradora que cubre y/o que está unida a al menos una parte del recipiente 200 que puede conectarse a un termo intercambiador (no mostrado) que hace circular el líquido termo intercambiador a temperatura controlada a través de la camisa 270. Como alternativa, en el medio de fermentación puede sumergirse un calentador, o un intercambiador térmico. Como ejemplos ilustrativos de este tipo de calentador o intercambiador térmico se incluyen un calentador de inmersión eléctrico, un intercambiador térmico en serpentín o lineal sumergido que lleva un líquido intercambiador de calor, tal como agua o aceite caliente, y uno o más rociadores que inyectan una corriente caliente tal como aire y/o agua en el medio de fermentación. De manera alternativa o adicional, un calentador o intercambiador térmico puede unirse al lado externo del recipiente. Dichos calentadores e intercambiadores térmicos incluyen una cinta térmica eléctrica en las paredes laterales externas del recipiente y líneas de reciclaje térmico o encamisado unidas al recipiente.

El recipiente 200 puede incluir puertos de entrada y de salida adicionales. En algunas realizaciones, los puertos de entrada y de salida adicionales pueden localizarse en la parte superior, en los lados o en la parte inferior del recipiente 200. En algunas realizaciones, los puertos de entrada adicionales incluyen líneas de alimentación para la adición de oxígeno o de otros gases, nutrientes, agentes controladores de la espuma y del pH durante la reacción de fermentación. Cualquiera de los puertos de entrada y de salida puede incluir mecanismos de esterilización para usos múltiples incluyendo el uso de procesos entrantes y conexión o reconexión múltiple durante el proceso de fermentación.

Además, uno o más puertos sonda 280 y/o válvulas de muestreo 290 pueden colocarse en diversos lugares en el recipiente 200 para ayudar a monitorizar parámetros críticos tales como las concentraciones de diversos productos y metabolitos, el pH, el nivel de líquido, la presión, la espuma, la concentración de oxígeno disuelto, la temperatura, la velocidad de agitación, la energía, la tensión, las posiciones de las válvulas y la densidad celular durante el proceso de fermentación.

Debe entenderse que los recipientes mostrados en las Figuras 1 y 2 son con fines ilustrativos y que pueden usarse muchas configuraciones de recipientes diferentes para los procesos de fermentación, por ejemplo, de acuerdo con el tipo de célula hospedadora, con el compuesto o compuestos bio-orgánicos producidos, con el volumen de producción, con el tipo de proceso de fermentación, con el tipo de procesamiento aguas abajo, con el proceso de separación y con otras consideraciones.

Un recipiente, tal como el que se muestra en la Figura 2, es adecuado para su uso en procesos de fermentación por lotes. Si se desea un proceso de fermentación continua o semi-continua (en lugar de un proceso de fermentación por lotes) en el que los materiales se añaden o se extraen constantemente del recipiente, este incluye normalmente puertos de entrada y de salida adicionales que pueden localizarse en la parte superior, inferior o en los laterales del recipiente. Estos puertos de entrada y de salida adicionales facilitan la entrada y la salida de flujo de los materiales en el recipiente. En algunas realizaciones, uno o más recipientes reciben de manera continuada células hospedadoras, medio de fermentación y aditivos opcionales al mismo tiempo que se descargan de manera continuada células hospedadoras, productos secundarios y/o compuestos bio-orgánicos de los recipientes. En estas realizaciones, la descarga de un recipiente puede usarse como materia prima para otro recipiente que opcionalmente también recibe células hospedadoras, medio de fermentación, nutrientes y/u otros aditivos recientes. Puede configurarse un solo recipiente o una serie de recipientes juntos para proporcionar el tiempo de residencia promedio deseado para las células hospedadoras. Una parte de la descarga de uno de los recipientes aguas abajo puede retornar a uno o más recipientes aguas arriba para reciclar la descarga en una fase de procesamiento anterior, o en los recipientes pueden reintroducirse otros materiales de etapas de procesamiento posteriores aguas abajo.

Los recipientes usados en algunas realizaciones de la presente invención incluyen hardware adicional que puede unirse al recipiente para facilitar el procesamiento. Dicho hardware puede incluir hardware adicional para facilitar el procesamiento de limpieza y esterilización *in situ*. En algunas realizaciones, uno, algunos o cada uno de los puertos, salidas, entradas, válvulas y todo el hardware dentro del recipiente pueden esterilizarse *in situ*. En algunas realizaciones, la esterilización puede producirse usando esterilización con vapor. Por ejemplo, cualquiera de los puertos, salidas o válvulas de muestreo puede incluir o tener unido al mismo hardware adicional que proporcione un suministro de vapor a y retorne el condensado desde el puerto de salida o válvula de tal manera que pueda esterilizarse por vapor antes de su uso o reutilización.

El recipiente o recipientes pueden tener una capacidad de al menos 100 litros. En algunas realizaciones, el recipiente tiene una capacidad de 100 a 3.000.000 litros tal como al menos 1.000 litros, al menos 5.000 litros, al menos 10.000 litros, recipiente con al menos 25.000 litros, al menos 50.000 litros, al menos 75.000 litros, al menos 100.000 litros, al menos 250.000 litros, al menos 500.000 litros o al menos 1.000.000 litros.

El recipiente o recipientes pueden incluir o tener unido al mismo detectores y sondas para medir diversos parámetros tales como presión, pH, concentración de oxígeno disuelto, temperatura, caudal de gas, caudal de líquido, nivel de líquido, posiciones de las válvulas, formación de espuma, agitación, energía, tensión y cualquier otro parámetro útil en el control u optimización del crecimiento de las células hospedadoras y la producción del compuesto o compuestos bio-orgánicos. Los detectores y sondas pueden suministrar información a uno o más sistemas automatizados para controlar y registrar los diversos parámetros medidos y para ajustar cualquiera de los diversos parámetros controlando caudales de aire, energía, calentamiento o enfriamiento para controlar la temperatura del recipiente, las rpm de agitación, bombas, esterilización o limpieza in situ del recipiente o cualquiera de las válvulas de entrada, salida, adición, muestreo u otros puertos, o control del flujo de salida o cualquier otro mecanismo relevante para controlar un parámetro o parámetros de la fermentación. Dichos ajustes pueden producirse usando cualquier mecanismo de control conocido, tal como, por ejemplo, control o activación de diversas válvulas, bombas o motores y pueden usarse sistemas de control proporcional, proporcional-integral o proporcional-integral-derivado.

El sistema o sistemas automatizados pueden controlarse y monitorizarse adicionalmente mediante un sistema de control central, que puede ser un sistema de control local o de una gran instalación y pueden controlar la producción de procesos de producción de solo un compuesto bio-orgánico o de procesos de producción de compuestos de bio-orgánicos múltiples. El sistema o sistemas automatizados y el sistema de control central pueden comprender cualquier software, firmware y/o hardware adecuado, que puede ser de propiedad exclusiva o comercial o una combinación de las mismas y pueden comunicarse usando cualquier sistema de comunicación adecuado. Ejemplos no limitantes de dichos sistemas de comunicación incluyen sistemas conectados por cable que pueden ser digitales o análogos, y pueden incluir conexión directa o estar en forma de red tal como LAN (red de área local) o WAN (red de área amplia) o ethernet. Además, en algunas realizaciones, el sistema de comunicación puede ser inalámbrico y puede ser de propiedad exclusiva, BLUETOOTH, banda ultra ancha, 802.11 a, b, g o n o ZigBee, incluyendo TDMA, FDMA, OFDM y CDMA y puede funcionar en cualquier banda de frecuencia adecuada tal como 2,4 GHz o 5,8 GHz.

Cualquiera de los recipientes usados en la producción de compuestos bio-orgánicos puede incluir hardware adicional, tal como agitadores adicionales, puertos de entrada adicionales, puertos de salida, puertos de muestreo, equipo adicional de calentamiento/refrigeración, tal como espirales calefactoras adicionales, equipos de aireación adicionales, tales como rociadores adicionales, detectores y sondas adicionales, equipos de limpieza o esterilización adicionales para facilitar el procesamiento o cualquier otro parámetro de la fermentación.

En algunas realizaciones de la invención, un sistema para elaborar compuestos isoprenoides C_{10} - C_{20} comprende:

- a. un recipiente que tiene una capacidad de al menos 100 litros;
- b. un medio acuoso, dentro del recipiente, formando una primera fase;
- c. una pluralidad de células hospedadoras bacterianas o fúngicas genéticamente modificadas, dentro del medio acuoso, capaz de convertir una fuente de carbono del hidrato de carbono presente en el medio acuoso en al menos un isoprenoide C_{10} - C_{20} ; y
- d. una segunda fase orgánica líquida, que comprende el al menos un isoprenoide en una cantidad de 40-99 %, en contacto con la primera fase; en el que la segunda fase orgánica se forma espontáneamente.

En algunas realizaciones, el compuesto o compuestos isoprenoides es un isoprenoide C_{10} . Estos compuestos derivan de dos unidades de isopreno y también se denominan monoterpenos. Un ejemplo ilustrativo de un monoterpeno es el mircenol. En otras realizaciones, el compuesto o compuestos isoprenoides es un isoprenoide C_{15} . Estos compuestos de tres unidades de isopreno y también se denominan sesquiterpenos. Un ejemplo ilustrativo de un sesquiterpeno es el pachulol (que también se conoce como alcohol pachulol). En otras realizaciones, el compuesto o compuestos isoprenoides es un isoprenoide C_{20} . Estos compuestos derivan de cuatro unidades de isopreno y también se denominan diterpenos. Un ejemplo ilustrativo de diterpeno es el taxadienol. En otros ejemplos más, el compuesto o compuestos isoprenoides es un isoprenoide C_{20+} . Estos compuestos derivan de más de cuatro unidades de isopreno e incluyen: triterpenos (compuestos isoprenoides C_{30} derivados de 6 unidades de isopreno) tal como escualenol; tetrapterenos (compuestos isoprenoides C_{40} derivados de 8 isoprenoides) tal como B-caroteno; y politerpenos (compuestos isoprenoides C_{40+} derivados de más de 8 unidades de isopreno) tal como poliisopreno. En algunas realizaciones, el compuesto o compuestos isoprenoides pueden ser cualquier combinación de dos o más compuestos isoprenoides.

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método para producir al menos un compuesto bio-orgánico que comprende:

- a. cultivar, en un medio acuoso, una pluralidad de células hospedadoras bacterianas o fúngicas genéticamente

modificadas que producen al menos un compuesto bio-orgánico que tiene al menos diez átomos de carbono, en el que el medio acuoso forma una primera fase, y en el que las células en la pluralidad convierten una fuente de carbono del hidrato de carbono presente en el medio acuoso en al menos un compuesto bio-orgánico que tiene al menos diez átomos de carbono;

b. formar una segunda fase orgánica líquida, que comprende el al menos un compuesto bio-orgánico en una cantidad de 40-99 %, en contacto con la primera fase;

c. separar de la primera fase al menos una parte de la segunda fase; y

d. aislar el al menos un compuesto bio-orgánico de la segunda fase; en el que el al menos un compuesto bio-orgánico es un compuesto isoprenoide; y

en el que la segunda fase orgánica se forma espontáneamente.

El sistema de producción de isoprenoides puede incluir uno o más componentes de procesamiento adicionales que incluyen: 1) uno o más sistemas de separación para separar el al menos un compuesto bio-orgánico del medio acuoso y de la segunda fase orgánica; 2) uno o más reactores para alterar biológica o químicamente el al menos un compuesto bio-orgánico tal como por adición, sustitución, hidrogenación, alquilación, hidroxilación, condensación, halogenación o cualquier otra reacción adecuada; 2) uno o más recipientes o sistemas de mezclado para mezclar el al menos un compuesto bio-orgánico con uno o más componentes adicionales; 3) y uno o más sistemas de purificación o separación adicionales para purificar adicionalmente la composición bio-orgánica o el al menos un compuesto bio-orgánico.

La segunda fase comprende el al menos un compuesto bio-orgánico. El compuesto bio-orgánico forma el 40-99 %, tal como hasta el 95 %, 90 %, 80 %, 75 %, 65 % o del 40 % al 50 % de la segunda fase. En determinadas realizaciones, la segunda fase consta esencialmente del compuesto bio-orgánico.

En algunas realizaciones, la pluralidad de células hospedadoras incluye más de un tipo de célula hospedadora, tal como más de una especie o cepa de células hospedadoras, por ejemplo, 2-5 especies o cepas de células hospedadoras, por ejemplo 2, 3, 4 o 5 especies o cepas de células hospedadoras. En algunas realizaciones la pluralidad de células hospedadoras puede producir más de un compuesto bio-orgánico, tal como 2-5 compuestos bio-orgánicos, por ejemplo 2, 3, 4, o 5 compuestos bio-orgánicos.

El compuesto o compuestos bio-orgánicos pueden aislarse de la primera fase y/o de la segunda fase usando cualquier método de separación adecuado. En algunas realizaciones, el compuesto bio-orgánico se aísla de la segunda fase de tal manera que es sustancialmente puro.

La segunda fase orgánica se produce espontáneamente como resultado de interacciones químicas y moleculares tal como diferencias en la solubilidad, o hidrofobia, densidad, concentración o cualquier otro mecanismo de separación de fases espontáneo.

Una vez producida la fase de separación, las fases separadas pueden extraerse individualmente del recipiente de separación. Cualquier cantidad de la segunda fase puede separarse de la primera fase, por ejemplo, toda, una parte, del 1 % al 100 % tal como del 5 % al 95 %, del 10 % al 90 %, del 20 % al 80 %, del 25 % al 75 %, del 35 % al 65 %, o del 40 % al 50 % de la segunda fase puede separarse de la primera fase. Si la segunda fase orgánica es menos densa que la primera fase acuosa, entonces pueden proporcionarse una o más cintas o colocarse en el recipiente de separación cerca de la interfaz entre las dos fases (preferentemente dentro de la segunda fase orgánica) para decantar la segunda fase orgánica antes de extraer la fase acuosa más densa. Como alternativa, la primera fase acuosa puede extraerse del recipiente de separación usando una salida cerca de la parte inferior del recipiente de separación hasta que aparezca la segunda fase orgánica. En ese momento, la segunda fase orgánica puede transferirse a un sitio distinto para el procesamiento o conservación adicional. Tanto la primera fase acuosa como la segunda fase orgánica pueden fluir hacia el exterior el recipiente de separación por la fuerza de la gravedad, presión de gas o usando una o más bombas o una combinación de los mismos.

Si la segunda fase orgánica es más densa que la primera fase acuosa, entonces pueden proporcionarse o colocarse una o más espitas en el recipiente de separación cerca de la interfaz entre las dos fases (preferentemente en la segunda fase orgánica) para decantar la primera fase acuosa antes de extraer la segunda fase orgánica más densa. Como alternativa, la segunda fase orgánica puede extraerse del recipiente de separación usando una salida cerca de la parte inferior del recipiente de separación.

Para un proceso continuo en el que la primera fase acuosa es más densa que la segunda fase orgánica, un recipiente de separación con una o más espitas puede contener un volumen específico del medio de fermentación y células hospedadoras y la segunda fase orgánica continuamente producida puede decantarse a través de las espitas para almacenar o procesar posteriormente. Si la segunda fase orgánica es más densa que la primera fase acuosa, la segunda fase orgánica puede extraerse continuamente de la parte inferior del recipiente de separación a una velocidad que impida el agotamiento completo de la segunda fase orgánica del recipiente de separación para impedir que salga de la primera fase acuosa.

En algunas realizaciones, el compuesto bio-orgánico puede aislarse de la segunda fase orgánica usando adsorción, un proceso en el que las moléculas se mueven desde un líquido a granel sobre la superficie de adsorbentes. Ejemplos ilustrativos de adsorbentes incluyen carbono activado; alúminas; aluminosilicatos tales como zeolitas; arcillas tal como tierra de Fuller; tamices moleculares; polímeros orgánicos tal como poliestireno y resinas; y sílices tales como gel de sílice. Dependiendo del adsorbente usado, el adsorbente puede usarse para capturar el producto bio-orgánico deseado o productos secundarios no deseados. El aislamiento por adsorción puede realizarse usando un proceso por lotes, continuo o semi-continuo.

En otras realizaciones, el compuesto bio-orgánico puede aislarse de la segunda fase orgánica usando destilación, un método de separación de sustancias basado en diferencias en cuanto a sus volatilidades. En la destilación por lotes; un lote entero de líquido se carga inicialmente en un recipiente y después se calienta o se reduce la presión dentro del recipiente. Por lo tanto se genera continuamente vapor y puede condensarse para formar un destilado líquido que se recoge. En la destilación a equilibrio continuo, un suministro líquido que fluye de manera continua se calienta o se reduce su presión para producir una vaporización parcial de la mezcla y recuperar por separado componentes líquidos y de vapor. La separación del líquido y del vapor se produce al mismo tiempo que fluyen a través de una columna de destilación, y los productos salen como corrientes de vapor y líquido. Cuando el vapor y el líquido alcanzan la fase de equilibrio, esto se denomina proceso de vaporización instantánea. Si se desea, el producto de vapor puede condensarse para formar un destilado líquido.

En otras realizaciones, el compuesto o compuestos bio-orgánicos se aíslan de la segunda fase orgánica usando extracción gas-líquido. Este proceso también se conoce como exhaustación y es la transferencia de un componente disuelto en una corriente líquida en una corriente de vapor en una forma más concentrada. La temperatura y presión pueden optimizarse para la transferencia del compuesto bio-orgánico deseado. Ejemplos ilustrativos de corrientes de vapor incluyen aire y vapor. Normalmente, la corriente líquida fluye bajo una columna mientras que la corriente de vapor burbujea hacia arriba (fluyendo en contracorriente a la corriente líquida).

En otras realizaciones, el compuesto bio-orgánico se aísla de la segunda fase orgánica usando extracción líquido-líquido. También conocida como extracción en disolvente, la extracción líquido-líquido es la transferencia de una sustancia desde una fase líquida a otra fase líquida inmiscible.

En un sistema de extracción líquido-líquido por lotes, el suministro líquido (la segunda fase orgánica) se mezcla con una segunda fase líquida inmiscible en un recipiente adecuado. Después se permite que la mezcla se sedimente en capas y se separe en extractos y refinados y la capa más ligera puede decantarse del recipiente. El compuesto o compuestos bio-orgánicos deseados puede estar en el extracto o refinado dependiendo del producto y disolvente usado.

En un sistema de extracción líquido-líquido continuo, se usan diferencias de densidad, presión de vapor a una temperatura dada, o puntos de ebullición para separar el producto bio-orgánico deseado del suministro líquido (la fase orgánica). Dichos sistemas pueden usar tanques, torres o columnas de mezcla/sedimentación, centrifugadoras y combinaciones de los mismos para efectuar la separación.

En otras realizaciones, el compuesto bio-orgánico se aísla de la segunda fase orgánica y/o de la primera fase acuosa usando ultrafiltración, un proceso de membrana activado por presión usado para separar componentes en solución basándose en el tamaño y forma molecular. Bajo una diferencia de presión aplicada a través de una membrana de ultrafiltración, el disolvente y las especies de soluto pequeñas pasan a través de la membrana y se recogen como un infiltrado al mismo tiempo que las especies de soluto más grandes se retienen en la membrana y se recuperan como un retenido concentrado. La ultrafiltración implica solutos cuyas dimensiones moleculares son diez veces más grandes o más que las del disolvente y normalmente tienen un tamaño inferior a μ micras. Los solutos o materiales a separar, tales como macromoléculas, dispersiones coloidales y emulsiones, normalmente tienen pesos moleculares mayores de 500 u.m.a. Un ejemplo no limitante de un sistema de ultrafiltración es un sistema de ultrafiltración de flujo tangencial.

En algunas realizaciones, las células hospedadoras son capaces de producir de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 gramos, más de aproximadamente 15 gramos, más de aproximadamente 20 gramos, más de aproximadamente 25 gramos o más de aproximadamente 30 gramos de compuesto bio-orgánico por litro de medio de fermentación.

En algunas realizaciones, las células hospedadoras son capaces de producir de aproximadamente 50 a aproximadamente 1500 miligramos, tal como más de aproximadamente 100 miligramos, más de aproximadamente 150 miligramos, más de aproximadamente 200 miligramos, más de aproximadamente 250 miligramos, más de aproximadamente 500 miligramos, más de aproximadamente 750 miligramos o más de aproximadamente 1000 miligramos de compuesto bio-orgánico por gramo de peso seco celular.

Sistema de producción de una composición de combustible

En el presente documento también se describe un sistema de producción de composición de combustible que comprende:

- a. al menos un recipiente que tiene una capacidad de al menos 100 litros;
- b. un medio acuoso, dentro del recipiente, que comprende una primera fase;
- c. una pluralidad de células hospedadoras, dentro del medio acuoso, capaces de elaborar, producir o sintetizar al menos un compuesto bio-orgánico; y
- d. una segunda fase orgánica líquida que comprende el al menos un compuesto bio-orgánico en contacto con la primera fase.

El sistema de producción de una composición de combustible puede incluir uno o más componentes de procesamiento adicionales que incluyen: 1) uno o más sistemas de separación para separar el al menos un compuesto bio-orgánico del medio acuoso y de la segunda fase orgánica; 2) uno o más reactores para alterar biológica o químicamente el al menos un compuesto bio-orgánico tal como por adición, sustitución, hidrogenación, alquilación, hidroxilación, condensación, halogenación o cualquier otra reacción adecuada; 2) uno o más recipientes o sistemas de mezclado para mezclar el al menos un compuesto bio-orgánico con uno o más componentes combustibles adicionales tales como combustibles basados en petróleo, un aditivo de combustible o una combinación de los mismos; y 3) uno o más sistemas de purificación o separación adicionales para purificar adicionalmente la composición de combustible o el al menos un compuesto bio-orgánico.

En algunas realizaciones, el aditivo de combustible se selecciona del grupo que consiste en oxigenantes, antioxidantes, protectores ambientales, mejoradores de la estabilidad térmica, mejoradores de cetano, estabilizadores, mejoradores de fluencia, mejoradores de combustión, anti-espumantes, aditivos anti-niebla, inhibidores de corrosión, mejoradores de lubricidad, inhibidores de congelación, limpiadores de inyectores, aditivos, supresores de humo, aditivos que reducen la resistencia aerodinámica, desactivadores metálicos, dispersantes, detergentes, desemulsionantes, colorantes, marcadores, disipadores estáticos, biocidas y combinaciones de los mismos.

En una realización, la invención proporciona un sistema de producción de composición de combustible que comprende:

- a. uno o más sistemas de fermentación que comprenden:

- i) al menos un recipiente que tiene una capacidad de al menos 100 litros;
- ii) un medio acuoso, dentro de al menos un recipiente, formando una primera fase;
- iii) una pluralidad de células hospedadoras bacterianas o fúngicas modificadas genéticamente, dentro del medio acuoso, capaces de convertir una fuente de carbono del hidrato de carbono presente en el medio acuoso en al menos un compuesto bio-orgánico que tiene al menos diez átomos de carbono; y
- iv) una segunda fase orgánica líquida, que comprende el al menos un compuesto bio-orgánico en una cantidad de 40-99 %, en contacto con la primera fase;
- v) en el que el al menos un compuesto bio-orgánico es un compuesto isoprenoide; y

en el que la segunda fase orgánica se forma espontáneamente:

- b. uno o más sistemas de separación de la primera fase mediante los cuales se separan la primera fase y la segunda fase orgánica o uno o más componentes de la segunda fase orgánica;
- c. opcionalmente uno o más sistemas de separación de la segunda fase mediante los cuales el al menos un compuesto bio-orgánico se separa de la segunda fase orgánica;
- d. opcionalmente uno o más reactores o recipientes en los que el al menos un compuesto bio-orgánico se modifica química o biológicamente;
- e. opcionalmente uno o más sistemas de purificación mediante los cuales el compuesto bio-orgánico o el compuesto bio-orgánico modificado se purifica o se purifica adicionalmente;
- f. opcionalmente uno o más recipientes o sistemas de mezclado para mezclar el al menos un compuesto bio-orgánico con uno o más componentes combustibles adicionales; y
- g. opcionalmente uno o más sistemas de purificación adicionales mediante los cuales la mezcla del al menos un compuesto bio-orgánico y del uno o más componentes combustibles adicionales se purifican o se purifican adicionalmente.

En algunas realizaciones, el uno o más sistemas de separación de la primera fase comprenden uno o más sistemas, recipientes u otros componentes de separación de fases detallados en el presente documento configurados específicamente para separar la primera fase de la segunda fase orgánica. En algunas realizaciones el uno o más sistemas de separación de la segunda fase incluyen uno o más sistemas, recipientes o componentes de separación de fases detallados en el presente documento configurados específicamente para separar el compuesto o compuestos bio-orgánicos de la segunda fase orgánica.

En algunas realizaciones, el uno o más reactores en los que el al menos un compuesto bio-orgánico se modifica química o biológicamente comprende el mismo recipiente o recipientes o diferente recipiente o recipientes usados para la fermentación o para los sistemas de separación. Como alternativa, el uno o más reactores pueden comprender uno o más recipientes diferentes, que pueden incluir hardware, detectores, puertos, sondas y/o sistemas de control adicionales adecuados para la reacción o reacciones específicas u otras modificaciones en el compuesto o compuestos bio-orgánicos que se realizan en su interior. Los reactores pueden ser reactores por lotes, semi-continuos o continuos.

En algunas realizaciones, los compuestos bio-orgánicos o compuestos bio-orgánicos modificados o las composiciones de combustibles pueden purificarse o purificarse adicionalmente usando uno o más sistemas de purificación. Los sistemas de purificación pueden comprender cualquier sistema de purificación adecuado incluyendo cualquier sistema que pueda eliminar compuestos no deseados de los compuestos o compuestos bio-orgánicos, o que puedan separar los compuestos no deseados de los compuestos bio-orgánicos. En algunas realizaciones, el sistema de purificación puede comprender uno o más sistemas, recipientes o componentes de separación de fases detallados en el presente documento que pueden configurarse específicamente para conseguir la pureza deseada del compuesto o compuestos bio-orgánicos. En algunas realizaciones, la purificación puede realizarse usando uno o más sistemas de separación en serie para conseguir la pureza deseada. En algunas realizaciones, los sistemas de separación pueden configurarse de manera diferente entre sí para conseguir la pureza de una manera gradual.

En algunas realizaciones, la purificación se realizará para conseguir especificaciones o requisitos de leyes normativas o regulaciones federales, estatales o locales, para los compuestos bio-orgánicos o para las composiciones de combustibles. En algunas realizaciones, la purificación puede mejorar la funcionalidad de los compuestos bio-orgánicos o de las composiciones de combustibles más allá de los requisitos de leyes, normativas o regulaciones federales o estatales. En algunas realizaciones, las leyes, normativas o regulaciones federales, estatales o locales, pueden estar relacionadas con emisiones ambientales, rendimiento del combustible, incentivos fiscales y otros incentivos económicos. En algunas realizaciones, la purificación puede reducir el impacto ambiental de, la huella de carbono de, la eficacia de combustible obtenida de; fiabilidad obtenida de; energía disponible de, o coste económico a largo plazo de los compuestos bio-orgánicos o de las composiciones de combustibles.

En algunas realizaciones, el sistema de composición de combustible incluye uno o más recipientes o sistemas de mezclado para mezclar el al menos un compuesto bio-orgánico con uno o más componentes combustibles adicionales. El recipiente o el sistema de mezclado pueden ser cualquier recipiente o sistema adecuado. El recipiente de mezclado puede incluir cualquiera o todas las entradas, salidas, puertos, detectores, sondas, agitadores u otro hardware identificado para el recipiente de producción del compuesto bio-orgánico. El recipiente de mezclado puede mezclar uno o más componentes combustibles con el compuesto o compuestos bio-orgánicos. Por ejemplo, 2-5 componentes combustibles, tal como 3 o 4 componentes combustibles. El sistema de mezclado puede ser por lotes, continuo o semi-discontinuo.

En algunas realizaciones, la invención comprende un método para elaborar una composición de combustible que comprende:

- a. cultivar, en un medio acuoso, una pluralidad de células hospedadoras bacterianas o fúngicas genéticamente modificadas que convierten una fuente de carbono de hidrato de carbono en el medio acuoso en al menos un compuesto bio-orgánico que tiene al menos diez átomos de carbono, en el que el medio acuoso forma una primera fase; en el que al menos un compuesto bio-orgánico es un compuesto isoprenoide.
- b. formar una segunda fase orgánica líquida, que comprende del 40-99 % de al menos un compuesto bio-orgánico, en contacto con la primera fase; en el que la segunda fase orgánica se forma espontáneamente;
- c. separar de la primera fase al menos una parte de la segunda fase;
- d. aislar el al menos un compuesto bio-orgánico de la segunda fase.,
- e. opcionalmente modificar química o biológicamente el al menos un compuesto bio-orgánico;
- f. opcionalmente purificar el compuesto bio-orgánico o el compuesto bio-orgánico modificado;
- g. opcionalmente mezclar el al menos un compuesto bio-orgánico con uno o más componentes de combustible adicionales; y
- h. opcionalmente purificar la mezcla de uno o más compuestos bio-orgánicos y de uno o más componentes de combustible adicionales.

En algunas realizaciones, la composición de combustible comprende una composición de biocombustible. En algunas realizaciones, el biocombustible comprende adicionalmente al menos un compuesto bio-orgánico y un combustible basado en petróleo, un aditivo de combustible o una combinación de los mismos. En realizaciones adicionales, el combustible basado en petróleo es gasolina, combustible pesado, queroseno, combustible diésel o una combinación de los mismos.

En algunas realizaciones, el sistema de producción del compuesto bio-orgánico o el sistema de producción de la composición de combustible puede construirse o crearse acondicionando una instalación de producción de etanol.

En algunas realizaciones, los sistemas de producción de composiciones de combustible pueden comprender uno o más sistemas de control automatizados. Los sistemas de control automatizados pueden ser iguales o diferentes a los del sistema de control para el sistema de producción bio-orgánico y pueden comprender diferentes detectores, sondas y otros equipos para medir y controlar los diversos parámetros del proceso asociados con cada sistema dentro del sistema de composición de combustible y cada etapa o los métodos de producción de composición de combustible. El sistema o sistemas automatizados pueden controlarse y monitorizarse adicionalmente mediante un sistema de control central, que puede ser un sistema de control local o de una gran instalación y puede controlar la producción de solo un proceso de producción de compuesto bio-orgánico o procesos de producción de un compuesto bio-orgánico múltiple. El sistema o sistemas automatizados y el sistema de control central pueden comprender un software, firmware y/o hardware adecuado, que puede ser de propiedad exclusiva o comercial o una combinación de los mismos y puede comunicarse usando cualquier sistema de comunicación adecuado. Ejemplos no limitantes de dichos sistemas de comunicación incluyen sistemas conectados por cable que pueden ser digitales o análogos, y pueden incluir conexión directa o estar en forma de una red tal como una LAN o una WAN o ethernet. Además, en algunas realizaciones, el sistema de comunicación puede ser inalámbrico y puede ser de propiedad exclusiva, BLUETOOTH, banda ultra ancha, 802.11 a, b, g o n o ZigBee, incluyendo TDMA, FDMA, OFDM y CDMA y puede funcionar en cualquier banda de frecuencia adecuada tal como 2,4 GHz o 5,8 GHz.

Células hospedadoras

En la realización práctica de la presente invención pueden usarse células hospedadoras bacterianas o fúngicas genéticamente modificadas. En algunas realizaciones, la célula hospedadora es un microorganismo hospedador genéticamente modificado en el que se han insertado, delecionado o modificado (es decir, mutado; por ejemplo, por inserción, delección, sustitución y/o inversión de nucleótidos) moléculas de ácido nucleico, para producir el compuesto bio-orgánico deseado, o efectuar una producción aumentada del compuesto bio-orgánico deseado.

Ejemplos de células bacterianas incluyen, pero sin limitación, las que pertenecen a los géneros: *Agrobacterium*, *Alicyclobacillus*, *Anabaena*, *Anacystis*, *Arthrobacter*, *Azobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Chromatium*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Microbacterium*, *Phormidium*, *Pseudomonas*, *Rhodobacter*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodospirillum*, *Rhodococcus*, *Salmonella*, *Scenedesmus*, *Serratia*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptomyces*, *Synnecoccus*, y *Zymomonas*.

Ejemplos ilustrativos de especies bacterianas incluyen, pero sin limitación: *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefacines*, *Brevibacterium ammoniagenes*, *Brevibacterium immariophilum*, *Clostridium beigerinckii*, *Enterobacter sakazakii*, *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*, *Mesorhizobium loti*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas mevalonii*, *Pseudomonas putida*, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodospirillum rubrum*, *Salmonella enterica*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus*, y similares.

En general, si una se usa célula hospedadora bacteriana, se prefiere una cepa no patógena. Ejemplos ilustrativos de especies con cepas no patógenas incluyen, pero sin limitación: *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas mevalonii*, *Pseudomonas putida*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodospirillum rubrum* y similares.

Ejemplos de células fúngicas incluyen, pero sin limitación, las que pertenecen a los géneros: *Aspergillus*, *Candida*, *Chrysosporium*, *Cryptococcus*, *Fusarium*, *Kluyveromyces*, *Neotryphodium*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Trichoderma* y *Xanthophyllomyces* (anteriormente *Phaffia*).

Ejemplos ilustrativos de especies fúngicas incluyen, pero sin limitación: *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Candida albicans*, *Chrysosporium lucknowense*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium venenatum*, *Kluyveromyces lactis*, *Neurospora crassa*, *Pichia angusta*, *Pichia finlandica*, *Pichia kodamae*, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia methanolica*, *Pichia opuntiae*, *Pichia pastoris*, *Pichia pijperi*, *Pichia quercuum*, *Pichia salictaria*, *Pichia thermotolerans*, *Pichia trehalophila*, *Pichia stipitis*, *Streptomyces ambofaciens*, *Streptomyces aureofaciens*, *Streptomyces aureus*, *Saccaromyces bayanus*, *Saccaromyces boulandi*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Streptomyces fungicidicus*, *Streptomyces griseochromogenes*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces olivogriseus*, *Streptomyces rameus*, *Streptomyces tanashiensis*, *Streptomyces vinaceus*, *Trichoderma reesei* y *Xanthophyllomyces dendrorhous* (anteriormente *Phaffia rhodozyma*).

En general, si se usa una célula fúngica, se prefiere una cepa no patógena. Ejemplos ilustrativos de especies con cepas no patógenas incluyen, pero sin limitación: *Fusarium graminearum*, *Fusarium venenatum*, *Pichia pastoris*, *Saccaromyces-boulandi*, y *Saccaromyces cerevisiae*.

En algunas realizaciones, las células hospedadoras de la presente invención se han diseñado por la Food and Drug Administration como GRAS o Generalmente Reconocido como Seguro. Ejemplos ilustrativos de dichas cepas incluyen: *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus*, y *Saccharomyces cerevisiae*.

Rutas de modificación por ingeniería genética para elaborar compuestos bio-orgánicos

Un ejemplo ilustrativo de una clase de compuestos bio-orgánicos son los isoprenoides. Éstos comprenden una familia diversa de más de 40.000 productos individuales, muchos de los cuales son vitales para los organismos vivos. Los isoprenoides sirven para mantener la fluidez celular, el transporte de electrones y otras funciones metabólicas. Además de su utilidad en la preparación de composiciones de combustible, una gran cantidad de isoprenoides naturales y sintéticos son útiles como productos farmacéuticos, cosméticos, perfumes, pigmentos y colorantes, fungicidas, antisépticos, nutracéuticos y productos intermedios químicos de pequeño tamaño.

Los compuestos isoprenoides se elaboran en la naturaleza a través de dos rutas metabólicas diferentes que producen IPP y su isómero, DMAPP. En general, los eucariotas que no son plantas utilizan la ruta isoprenoide MEV exclusivamente para convertir la acetil-CoA en IPP, que posteriormente se isomeriza a DMAPP. Los procariotas, con algunas excepciones, utilizan la ruta independiente del mevalonato o DXP para producir IPP y DMAPP por separado a través de un punto ramificado. En general, las plantas usan las rutas tanto MEV como DXP para la síntesis de IPP. Los métodos descritos en el presente documento para la modificación por ingeniería genética de las rutas MEV y DXP para elaborar el compuesto isoprenoide deseado pueden adaptarse fácilmente para modificar por ingeniería genética de manera similar otras rutas para elaborar otros compuestos bio-orgánicos.

Ruta MEV

En la Figura 3 se describe una representación esquemática de la ruta MEV. En general, la ruta comprende seis etapas.

En la primera etapa, dos moléculas de acetil-coenzima A se combinan enzimáticamente para formar acetoacetil-CoA. Una enzima que se sabe que cataliza esta etapa es, por ejemplo, la acetil-CoA tiolasa (conocida también como acetil-CoA acetiltransferasa). Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos incluyen, pero sin limitación, los siguientes números de acceso a GenBank y los organismos de los que derivan las secuencias: (NC_000913 REGION: 2324131..2325315; *Escherichia coli*), (D49362; *Paracoccus denitrificans*) y (L20428; *Saccharomyces cerevisiae*).

En la segunda etapa de la ruta MEV, la acetoacetil-CoA se condensa enzimáticamente con otra molécula de acetil-CoA para formar 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). Una enzima que se sabe que cataliza esta etapa es, por ejemplo, la HMG-CoA sintasa. Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos incluyen, pero sin limitación: (NC_001145. complemento 19061..20536; *Saccharomyces cerevisiae*), (X96617; *Saccharomyces cerevisiae*), (X83882; *Arabidopsis thaliana*), (AB037907; *Kitasatospora griseola*), (BT007302; *Homo sapiens*), y (NC_002758, etiqueta del locus SAV2546, GeneID 1122571; *Staphylococcus aureus*).

En la tercera etapa, la HMG-CoA se convierte enzimáticamente a mevalonato. Una enzima que se sabe que cataliza esta etapa es, por ejemplo, la HMG-CoA reductasa. Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos incluyen, pero sin limitación: (NM_206548; *Drosophila melanogaster*), (NC_002758, etiqueta del locus SAV2545, GeneID 1122570; *Staphylococcus aureus*), (NM_204485; *Gallus gallus*), (AB015627; *Streptomyces sp.* KO 3988), (AF542543; *Nicotiana attenuata*), (AB037907; *Kitasatospora griseola*), (AX1282-13, que proporciona la secuencia que codifica una HMGR truncada; *Saccharomyces cerevisiae*), y (NC_001145: complemento (115734..118898; *Saccharomyces cerevisiae*).

En la cuarta etapa, el mevalonato se fosforila enzimáticamente para formar mevalonato 5-fosfato. Una enzima que se sabe que cataliza esta etapa es, por ejemplo, la mevalonato quinasa. Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos incluyen, pero sin limitación: (L77688; *Arabidopsis thaliana*) y (X55875; *Saccharomyces cerevisiae*).

En la quinta etapa, un segundo grupo fosfato se añade enzimáticamente al mevalonato 5-fosfato para formar mevalonato 5-pirofosfato. Una enzima que se sabe que cataliza esta etapa es, por ejemplo, la fosfomevalonato quinasa. Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos incluyen pero sin limitación: (AF429385; *Hevea brasiliensis*), (NM_006556; *Homo sapiens*) y (NC_001145. complemento 712315..713670; *Saccharomyces cerevisiae*).

En la sexta etapa, la mevalonato 5-pirofosfato se convierte enzimáticamente en IPP. Una enzima que se sabe que cataliza esta etapa es, por ejemplo, la mevalonato pirofosfato descarboxilasa. Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos incluyen, pero sin limitación: (X97557; *Saccharomyces cerevisiae*), (AF290095; *Enterococcus faecium*) y (U49260; *Homo sapiens*).

Si el IPP se convierte en DMAPP, entonces se requiere una séptima etapa. Una enzima que se sabe que cataliza esta etapa es, por ejemplo, la IPP isomerasa. Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos incluyen, pero sin limitación: (NC_000913, 3031087..3031635; *Escherichia coli*) y (AF082326; *Haematococcus pluvialis*). Si se requiere la conversión a DMAPP, una expresión aumentada de IPP isomerasa garantiza que la conversión de IPP en DMAPP no representa una etapa limitante de la velocidad en toda la ruta.

Ruta DXP

En la Figura 4 se describe una representación esquemática de la ruta DXP. En general, la ruta DXP comprende siete etapas. En la primera etapa, el piruvato se condensa con D-gliceraldehído 3-fosfato para dar lugar a 1-desoxi-*D*-xilulosa-5-fosfato. Una enzima que se sabe que cataliza esta etapa es, por ejemplo, la 1-desoxi-*D*-xilulosa-5-fosfato sintasa. Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos incluyen, pero sin limitación: (AF035440; *Escherichia coli*), (NC_002947, etiqueta del locus PP0527; *Pseudomonas putida* KT2440), (CP000026, SPA2301; *Salmonella enterica Paratyphi*, véase ATCC 9150), NC_007493, etiqueta del locus RSP_0254; *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1), (NC_005296, RPA0952; *Rhodopseudomonas palustris*. CGA009), (NC_004556, etiqueta del locus PD1293; *Xylella fastidiosa Temecula*), y (NC_003076, etiqueta del locus AT5G11380; *Arabidopsis thaliana*).

En la segunda etapa, la 1-desoxi-*D*-xilulosa-5-fosfato se convierte en 2C-metil-*D*-eritritol-4-fosfato. Una enzima que se sabe que cataliza esta etapa es, por ejemplo, la 1-desoxi-*D*-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa. Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos incluyen pero sin limitación: (AB013300; *Escherichia coli*), (AF148852; *Arabidopsis thaliana*), (NC_002947, etiqueta del locus PP1597; *Pseudomonas putida* KT2440), (AL939124, etiqueta del locus SCO5694 *Streptomyces coelicolor* A3(2)), (NC_007493, etiqueta del locus RSP_2709; *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1) y (NC_007492, etiqueta del locus Pfl_1107; *Pseudomonas fluorescens* PfO-1).

En la tercera etapa, el 2C-metil-*D*-eritritol-4-fosfato se convierte en 4-difosfocitidil-2C-metil-*D*-eritritol. Una enzima que se sabe que cataliza esta etapa es, por ejemplo, la 4-difosfocitidil-2C-metil-*D*-eritritol sintasa. Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos incluyen, pero sin limitación: (AF230736; *Escherichia coli*), (NC_007493, etiqueta del locus RSP_2835; *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1), (NC_003071, etiqueta del locus AT2G02500; *Arabidopsis thaliana*) y (NC_002947, etiqueta del locus PP1614; *Pseudomonas putida* KT2440).

En la cuarta etapa, el 4-difosfocitidil-2C-metil-*D*-eritritol se convierte en 4-difosfocitidil-2C-metil-*D*-eritritol-2-fosfato. Una enzima que se sabe que cataliza esta etapa es, por ejemplo, la 4-difosfocitidil-2C-metil-*D*-eritritol quinasa. Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos incluyen pero sin limitación: (AF216300; *Escherichia coli*) y (NC_007493, etiqueta del locus RSP_1779; *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1).

En la quinta etapa, el 4-difosfocitidil-2C-metil-*D*-eritritol-2-fosfato se convierte en 2C-metil-*D*-eritritol 2,4-ciclodifosfato. Una enzima que se sabe que cataliza esta etapa es, por ejemplo, 2C-metil-*D*-eritritol 2,4-ciclodifosfato sintasa. Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos incluyen, pero sin limitación: (AF230738; *Escherichia coli*), (NC_007493 etiqueta del locus RSP_6071; *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1), y (NC_002947, etiqueta del locus PP1618; *Pseudomonas putida* KT2440).

En la sexta etapa, el 2C-metil-*D*-eritritol 2,4-ciclodifosfato se convierte en 1-hidroxi-2-metil-2-(*E*)-butenil-4-difosfato. Una enzima que se sabe que cataliza esta etapa es, por ejemplo, 1-hidroxi-2-metil-2-(*E*)-butenil-4-difosfato sintasa. Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos incluyen, pero sin limitación: (AY033515; *Escherichia coli*), (NC_002947, etiqueta del locus PP0853; *Pseudomonas putida* KT2440) y (NC_007493, etiqueta del locus RSP_2982; *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1).

En la séptima etapa, el 1-hidroxi-2-metil-2-(*E*)-butenil-4-difosfato se convierte en IPP o en su isómero, DMAPP. Una enzima que se sabe que cataliza esta etapa es, por ejemplo, isopentil/dimetilalil difosfato sintasa. Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos incluyen pero sin limitación: (AY062212; *Escherichia coli*) y (NC_002947, etiqueta del locus PP0606; *Pseudomonas putida* KT2440).

En algunas realizaciones, la "interacción" (o interferencia) entre los procesos metabólicos propios de la célula hospedadora y aquellos procesos implicados con la producción de IPP, como proporciona la presente invención, se minimizan o eliminan totalmente. Por ejemplo, la interacción se minimiza o elimina totalmente cuando el microorganismo hospedador depende exclusivamente de la ruta DXP para sintetizar IPP, y se introduce una ruta MEV para proporcionar IPP adicional. Dichos organismos hospedadores no deberían estar dotados para alterar la expresión de las enzimas de la ruta MEV o procesar los productos intermedios asociados con la ruta MEV. Organismos que dependen exclusiva o predominantemente de la ruta DXP incluyen, por ejemplo, *Escherichia coli*.

En algunas realizaciones, la célula hospedadora produce IPP mediante la ruta MEV, bien exclusivamente o en combinación con la ruta DXP. En otras realizaciones, una ruta DXP del hospedador se deshabilita funcionalmente de tal manera que la célula hospedadora produce IPP exclusivamente a través de una ruta MEV introducida de manera heteróloga. La ruta DEX puede deshabilitarse funcionalmente, deshabilitando la expresión génica o inactivando la función de una o más de las enzimas de la ruta DXP de origen natural.

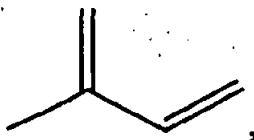
En otras realizaciones, la célula hospedadora produce IPP mediante la ruta DXP, bien exclusivamente o en combinación con la ruta MEV. En otras realizaciones, una ruta MEV del hospedador se deshabilita funcionalmente de tal manera que la célula hospedadora produce IPP exclusivamente a través de una ruta DXP introducida de manera heteróloga. La ruta MEV puede deshabilitarse funcionalmente, deshabilitando la expresión génica o inactivando la función de una o más de las enzimas de la ruta MEV de origen natural.

Compuestos C₅

Los hemiterpenos son compuestos bio-orgánicos C₅ ejemplares, que generalmente derivan de IPP o de DMAPP. Un ejemplo ilustrativo de un hemiterpeno es el isopreno.

Isopreno

El isopreno, cuya estructura es



se encuentra en muchas plantas. El isopreno se obtiene del IPP por la isopreno sintasa. Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos adecuadas incluyen, pero sin limitación: (AB 198190; *Populus alba*) y (AJ294819; *Populus alba* x *Populus tremula*).

Compuestos C₁₀

Los monoterpenos son compuestos bio-orgánicos C₁₀ ejemplares, que generalmente derivan del geranil pirofosfato (GPP) que a su vez se obtiene por la condensación de IPP con DMAPP. Una enzima que se sabe cataliza esta etapa es, por ejemplo, la geranil pirofosfato sintasa.

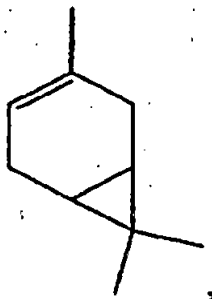
La Figura 5 muestra esquemáticamente cómo el IPP y el DMAPP pueden producir GPP, que puede procesarse adicionalmente a un monoterpeno.

Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos para la geranil pirofosfato sintasa incluyen, pero sin limitación: (AF513111; *Abies grandis*), (AF513112; *Abies grandis*), (AF513113; *Abies grandis*), (AY534686; *Antirrhinum majus*), (AY534687; *Antirrhinum majus*), (Y17376; *Arabidopsis thaliana*), (AE016877, Locus AP11092; *Bacillus cereus*; ATCC 14579), (AJ243739; *Citrus sinensis*), (AY534745; *Clarkia breweri*), (AY953508; *Ips pin*), (DQ286930; *Lycopersicon esculentum*), (AF 182828; *Mentha x piperita*), (AF182827; *Mentha x piperita*), (MPI24945; *Mentha x piperita*), (PZE431697, Locus CAD24425; *Paracoccus zeaxanthinifaciens*), (AY866498; *Picrorhiza kurrooa*), (AY351862; *Vitis vinifera*), y (AF203881, Locus AAF12843; *Zymomonas mobilis*).

La GPP se convierte posteriormente en diversos compuestos C₁₀. Ejemplos ilustrativos de compuestos C₁₀ incluyen, pero sin limitación:

Careno

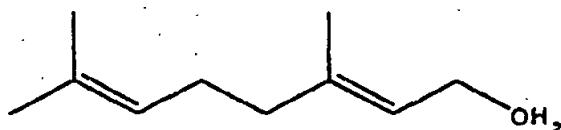
El careno, cuya estructura es



se encuentra en la resina de muchos árboles, particularmente pinos. El careno se obtiene del GPP a partir de la careno sintasa. Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos adecuadas incluyen, pero sin limitación: (AF461460, REGION 43..1926; *Picea abies*) y (AF527416, REGION: 78..1871; *Salvia stenophylla*).

Geraniol

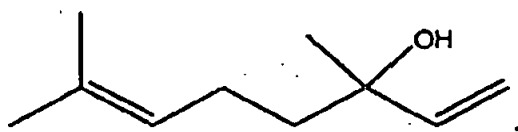
El geraniol (también conocido como rodinol), cuya estructura es



es el componente principal del aceite de rosa y del aceite de palmarosa. También se produce en el genario, limón y citronela. El geraniol se obtiene del GPP por la geraniol sintasa. Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos adecuadas incluyen, pero sin limitación: (AJ457070; *Cinnamomum tenuipilum*), (AY362553; *Ocimum basilicum*), (DQ234300; *Perilla frutescens* cepa 1864), (DQ234299; *Perilla citriodora* cepa 1861), (DQ234298; *Perilla citriodora* cepa 4935), y (DQ088667; *Perilla citriodora*).

Linalol

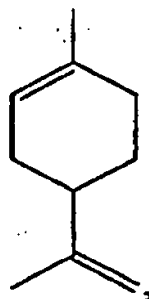
El linalol, cuya estructura es



se encuentra en muchas flores y en plantas de especias tales como semillas de cilantro. El linalol se obtiene del GPP por la linalol sintasa. Ejemplos ilustrativos de una secuencia de nucleótidos adecuada incluyen, pero sin limitación: (AF497485; *Arabidopsis thaliana*), (AC002294, Locus AAB71482; *Arabidopsis thaliana*), (AY059757; *Arabidopsis thaliana*), (NM_104793; *Arabidopsis thaliana*), (AF154124; *Artemisia annua*), (AF067603; *Clarkia breweri*), (AF067602; *Clarkia concinna*), (AF067601; *Clarkia breweri*), (U58314; *Clarkia breweri*), (AY840091; *Lycopersicon esculentum*), (DQ263741; *Lavandula angustifolia*), (AY083653; *Mentha citrate*), (AY693647; *Ocimum basilicum*), (XM_463918; *Oryza sativa*), (AP004078, Locus BAD07605; *Oryza sativa*), (XM_463918, Locus XP_463918; *Oryza sativa*), (AY917193; *Perilla citriodora*), (AF271259; *Perilla frutescens*), (AY473623; *Picea abies*), (DQ195274; *Picea sitchensis*) y (AF444798; *Perilla frutescens* var. *crispa* variedad de cultivo N° 79).

Limoneno

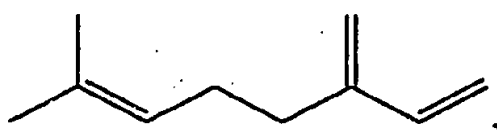
El Limoneno, cuya estructura es



se encuentra en la corteza de cítricos y en la menta. El limoneno se obtiene del GPP por la limoneno sintasa. Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos adecuadas incluyen, pero sin limitación: (+)-limoneno sintasas (AF514287, REGION: 47..1867; *Citrus limon*) y (AY055214, REGION: 48..1889; *Agastache rugosa*) y (-)-limoneno sintasas (DQ195275, REGION: 1..1905; *Picea sitchensis*), (AF006193, REGION: 73..1986; *Abies grandis*), y (MHC4SLSP, REGION: 29..1828; *Mentha spicala*).

Mirceno

El mirceno, cuya estructura es

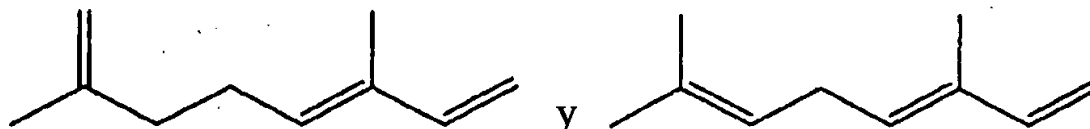


se encuentra en el aceite esencial de muchas plantas incluyendo laurel, verbena y mircia de la cual adopta su nombre. El mirceno se obtiene del GPP por la mirceno sintasa. Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos adecuadas incluyen, pero sin limitación: (U87908; *Abies grandis*), (AY195609; *Antirrhinum majus*),

(AY195608; *Antirrhinum majus*), (NM_127982; *Arabidopsis thaliana* TPS10), (NM_113485; *Arabidopsis thaliana* ATTPS-CIN), (NM_113483; *Arabidopsis thaliana* ATTPS-CIN), (AF271259; *Perilla frutescens*), (AY473626; *Picea abies*), (AF369919; *Picea abies*), y (AJ304839; *Quercus ilex*).

5 Ocimeno

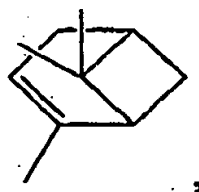
El α y β -ocimeno, cuyas estructuras son



respectivamente, se encuentran en diversas plantas y frutos que incluyen *Ocimum basilicum* y se obtiene del GPP por la ocimeno sintasa. Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos adecuadas incluyen pero, sin limitación: (AY195607; *Antirrhinum majus*), (AY195609; *Antirrhinum majus*), (AY195608; *Antirrhinum majus*), (AK221024; *Arabidopsis thaliana*), (NM_113485; *Arabidopsis thaliana* ATTPS-CIN), (NM_113483; *Arabidopsis thaliana* ATTPS-CIN), \ (NM_117775; *Arabidopsis thaliana* ATTPS03), (NM_001036574; *Arabidopsis thaliana* ATTPS03), (NM_127982; *Arabidopsis thaliana* TPS10), (AB110642; *Citrus unshiu* CitMTSL4), y (AY575970; *Lotus corniculatus* var. *japonicus*).

α -pineno

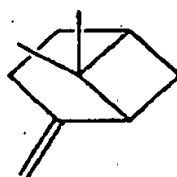
El α -pineno, cuya estructura es



se encuentra en pinos y eucaliptos. El α -pineno se obtiene del GPP por la α -pineno sintasa. Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos adecuadas incluyen, pero sin limitación: (+) α -pineno sintasa (AF543530, REGION: 1..1887; *Pinus taeda*), (-) α -pineno sintasa (AF543527, REGION: 32..1921; *Pinus taeda*), y (+)/(-) α -pineno sintasa (AGU87909, REGION: 6111892; *Abies grandis*).

β -pineno

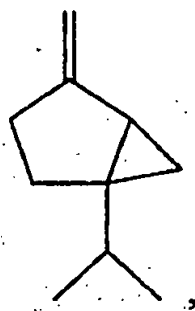
El β -pineno, cuya estructura es



se encuentra en pinos, romero, perejil, eneldo, albahaca y rosa. El β -pineno se obtiene del GPP por la β -pineno sintasa. Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos adecuadas incluyen, pero sin limitación: (-) β -pineno sintasas (AF276072; REGION: 1..1749; *Artemisia annua*) y (AF514288, REGION: 26.. 1834; *Citrus limon*).

Sabineno

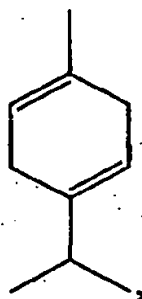
El sabineno, cuya estructura es



se encuentra en la pimienta negra, en la zanahoria, artemisia y árboles de té. El sabineno se obtiene del GPP por la sabineno sintasa. Un ejemplo ilustrativo de una secuencia de nucleótido adecuada incluye, pero sin limitación: AF051901, REGION: 26..1798 de *Salvia officinalis*.

γ -Terpineno

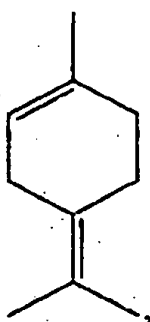
El γ -terpineno, cuya estructura es



es un constituyente del aceite esencial de frutos cítricos. Bioquímicamente, el γ -terpineno se obtiene del GPP mediante una γ -terpineno sintasa. Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos adecuadas incluyen: (AF514286, REGION: 30..1832 de *Citrus limon*) y (AB110640, REGION 1..1803 de *Citrus unshiu*).

Terpinoleno

El terpinoleno, cuya estructura es



se encuentra en las grosellas negras, ciprés, guayaba, lichi, papaya, pino y té. El terpinoleno se obtiene del GPP por la terpinoleno sintasa. Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos adecuadas incluyen, pero sin limitación: (AY693650 de *Oscimum basilicum*) y (AY906866, REGION: 10..1887 de *Pseudotsuga menziesii*).

Compuestos C₁₅

Los sesquiterpenos son compuestos bio-orgánicos C₁₅ ejemplares que generalmente derivan del farnesil pirofosfato (FPP) que a su vez se obtiene por la condensación de dos moléculas de IPP con una molécula de DMAPP. Una enzima que se sabe que cataliza esta etapa es, por ejemplo, la farnesil pirofosfato sintasa.

La Figura 5 también muestra esquemáticamente cómo el IPP y el DMAPP pueden combinarse para producir FPP, que posteriormente puede procesarse a un sesquiterpeno.

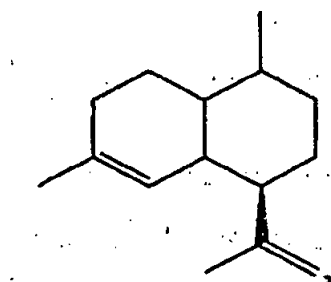
Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos para la farnesil pirofosfato sintasa incluyen, pero sin limitación: (ATU80605; *Arabidopsis thaliana*), (ATHFPS2R; *Arabidopsis thaliana*), (AAU36376; *Artemisia annua*), (AF461050; *Bos taurus*), (D00694; *Escherichia coli* K-12), (AE009951, Locus AAL95523; *Fusobacterium nucleatum subsp. nucleatum* ATCC 25586), (GFFPPSGEN; *Gibberella fujikuroi*), (CP000009, Locus AAW60034; *Gluconobacter oxydans* 621H), (AF019892; *Helianthus annuus*), (HUMFAPS; *Homo sapiens*), (KLPFPSQCR; *Kluyomyces lactis*), (LAU15777; *Lupinus albus*), (LAU20771; *Lupinus albus*), (AF309508; *Mus musculus*), (NCFPPSGEN; *Neurospora crassa*), (PAFPS1; *Parthenium argentatum*), (PAFPS2; *Parthenium argentatum*), (RATFAPS; *Rattus norvegicus*), (YSCFPP; *Saccharomyces cerevisiae*), (D89104; *Schizosaccharomyces pombe*), (CP000003, Locus AAT87386; *Streptococcus pyogenes*), (CP000017, Locus AAZ51849; *Streptococcus pyogenes*), (NC_008022, Locus YP_598856; *Streptococcus pyogenes* MGAS10270), (NC_008023, Locus YP_600845; *Streptococcus pyogenes* MGAS2096), (NC_008024, Locus YP_602832; *Streptococcus pyogenes* MGAS 10750) y (MZEFPS; *Zea mays*).

Como alternativa, el FPP también puede obtenerse añadiendo IPP a GPP. Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos que codifican una enzima capaz de efectuar esta reacción incluyen, pero sin limitación: (AE000657, Locus AAC06913; *Aquifex aeolicus* VF5), (NM_202836; *Arabidopsis thaliana*), (D84432, Locus BAA12575; *Bacillus subtilis*), (U12678, Locus AAC28894; *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110), (BACFDPS; *Geobacillus stearothermophilus*), (NC_002940, Locus NP_873754; *Haemophilus ducreyi* 35000HP), (L42023, Locus AAC23087; *Haemophilus influenzae* Rd KW20), (J05262; *Homo sapiens*), (YP_395294; *Lactobacillus sakei subsp. sakei* 23K), (NC_005823, Locus YP_000273; *Leptospira interrogans* serovar *Copenhageni* str. *Fiocruz* L1-130), (AB003187; *Micrococcus luteus*), (NC_002946, Locus YP_208768; *Neisseria gonorrhoeae* FA 1090), (U00090, Locus AAB91752; *Rhizobium sp.* NGR234), (J05091; *Saccharomyces cerevisiae*), (CP000031, Locus AAV93568; *Silicibacter pomeroyi* DSS-3), (AE008481, Locus AAK99890; *Streptococcus pneumoniae* R6) y (NC_004556, Locus NP_779706; *Xylella fastidiosa* Temecula).

El FPP se convierte posteriormente en diversos compuestos C₁₅. Ejemplos ilustrativos de compuestos C₁₅ incluyen, pero sin limitación:

Amorfadieno

El amorfadieno, cuya estructura es

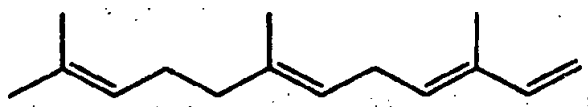


es un precursor de la artemisina elaborado por *Artemisia anna*. El amorfadieno se obtiene del FPP por la amorfadieno sintasa. Un ejemplo ilustrativo de una secuencia de nucleótidos adecuada es la SEC ID N°: 37 de la Publicación de Patente de Estados Unidos 2004/0005678.

La Figura 5 muestra esquemáticamente cómo el IPP y el DMAPP pueden combinarse para producir FPP, que a su vez puede procesarse adicionalmente para producir amorfadieno.

α -farneseno

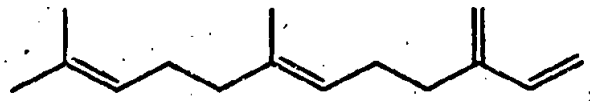
El α -farneseno, cuya estructura es



se encuentra en diversas fuentes biológicas incluyendo, pero sin limitación, la glándula de Dufour en hormigas y en el recubrimiento de la corteza de la manzana y pera. El α -farneseno se obtiene del FPP por la α -farneseno sintasa. Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos adecuadas incluyen, pero sin limitación DQ309034 de *Pyrus communis* variedad de cultivo de Anjou (pera; nombre del gen AFS1) y AY182241 de *Malus domestica* (manzana; gen AFS 1). Pechouus et al., Planta 219(1): 84-94 (2004).

β -farneseno

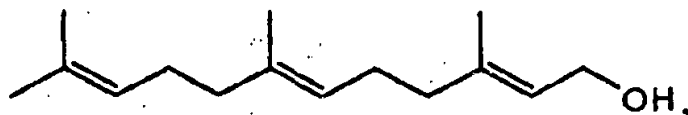
El β -farneseno, cuya estructura es



se encuentra en diversas fuentes biológicas incluyendo, pero sin limitación, ácidos y aceites esenciales tales como menta. En algunas plantas, tales como la patata silvestre, el β -farneseno se sintetiza como un repelente natural de insectos. El β -farneseno se obtiene del FPP por la β -farneseno sintasa. Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos adecuadas incluyen, pero sin limitación, el número de acceso GenBank A024615 de *Mentha x piperita* (menta; gen Tspa11) y AY835398 de *Artemisia annua*. Picaud et al., *Phytochemistry* 66(9): 961-967 (2005).

Farnesol

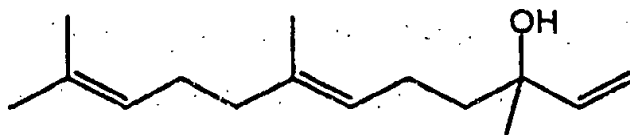
El farnesol, cuya estructura es



se encuentra en diversas fuentes biológicas incluyendo insectos y aceites esenciales tales como de citronela, de la flor de azahar, clavel, limoncillo, nardo y rosa. El farnesol se obtiene del FPP por una hidroxilasa tal como farnesol sintasa. Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos adecuadas incluyen, pero sin limitación, el número de acceso GenBank AF529266 de *Zea mays* e YDR481C de *Saccharomyces cerevisiae* (gen Pho8). Song, L., *Applied Biochemistry and Biotechnology* 128: 149-158 (2006).

Nerolidol

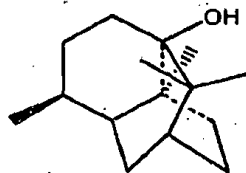
El nerolidol, cuya estructura es



también se conoce como peruvicol, y se encuentra en diversas fuentes biológicas que incluyen aceites esenciales tales como de la flor de azahar, jengibre, jazmín, lavanda, árbol de té y limoncillo. El nerolidol se obtiene del FPP por una hidroxilasa tal como la nerolidol sintasa. Un ejemplo ilustrativo de una secuencia de nucleótidos adecuada incluye, pero sin limitación, AF529266 de *Zea mays* (maíz; gen tps1).

Pachuli

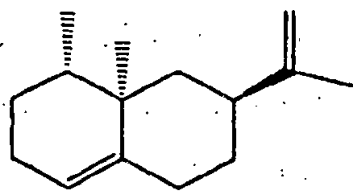
El pachuli, cuya estructura es



también se conoce como alcohol de pachuli y es un constituyente del aceite esencial de *Pogostemon patchouli*. El pachuli se obtiene del FPP por la pachuli sintasa. Un ejemplo ilustrativo de una secuencia de nucleótidos adecuada incluye, pero sin limitación, AY508730 REGION: 1..1659 de *Pogostemon cabin*.

Valenceno

El valenceno, cuya estructura es



es uno de los componentes químicos principales del olor y sabor de las naranjas y se encuentra en la corteza de la naranja. El valenceno se obtiene del FPP por la nootkatona sintasa. Ejemplos ilustrativos de una secuencia de nucleótidos adecuada incluyen, pero sin limitación AF441124 REGIÓN: 1..1647 de *Citrus sinensis* y AY917195: REGIÓN 1..1653 de *Perilla frutescens*.

Compuestos C₂₀

Los diterpenos son compuestos bio-orgánicos C₂₀ ejemplares que generalmente derivan del geranilgeraniol pirofosfato (GGPP) que a su vez se obtiene por condensación de tres moléculas de IPP con una molécula de DMAPP. Una enzima que se sabe que cataliza esa etapa es, por ejemplo, la geranilgeranil pirofosfato sintasa.

La Figura 5 también muestra esquemáticamente cómo el IPP y el DMAPP pueden combinarse para producir GGPP, que puede procesarse adicionalmente en un diterpeno, o puede procesarse adicionalmente para producir un carotenoide.

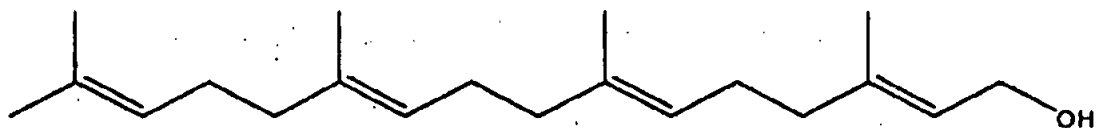
Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos para la geranilgeranil pirofosfato sintasa incluyen, pero sin limitación: (ATHGERPYRS; *Arabidopsis thaliana*), (BT005328; *Arabidopsis thaliana*), (NM_119845; *Arabidopsis thaliana*), (NZ_AAJM01000380, Locus ZP_00743052; *Bacillus thuringiensis serovariedad israelensis*, ATCC 35646 sq1563), (CRGGPPS; *Cathararithus roseus*), (NZ_AABF02000074, Locus ZP_00144509; *Fusobacterium nucleatum subsp. vincentii*, ATCC 49256), (GFGGPPSGN; *Gibberella fujikuroi*), (AY371321; *Ginkgo biloba*), (AB055496; *Hevea brasiliensis*), (AB017971; *Homo sapiens*), (MCI276129; *Mucor circinelloides f. lusitanicus*), (AB016044; *Mus musculus*), (AABX01000298, Locus NCU01427; *Neurospora crassa*), (NCU20940; *Neurospora crassa*), (NZ_A.AKL01000008, Locus ZP_00943566; *Ralstonia solanacearum* UW551), (AB118238; *Rattus norvegicus*), (SCU31632; *Saccharomyces cerevisiae*), (AB016095; *Synechococcus elongates*), (SAGGPS; *Sinapis alba*), (SSOGDS; *Sufolobus acidocaldarius*), (NC_007759; Locus YP_461832; *Syntrophus aciditrophicus SB*) y (NC_006840, Locus YP_204095; *vibrio fischeri* ES 14).

Como alternativa, el GGPP también puede obtenerse añadiendo IPP a FPP. Ejemplos ilustrativos de secuencias de nucleótidos que codifican una enzima capaz de efectuar esta reacción incluyen, pero sin limitación: (NM_112315; *Arabidopsis thaliana*), (ERWCRT; *Pantoea agglomerans*), (D90087, Locus-BAA14124; *Pantoea ananatis*), (X52291, Locus CAA36538; *Rhodobacter capsulatus*), (AF195122, Locus AAF24294; *Rhodobacter sphaeroides*) y (NC_004350, Locus NP_721015; *Streptococcus mutans* UA159).

El GGPP se convierte posteriormente en diversos isoprenoides C₂₀. Ejemplos ilustrativos de compuestos C₂₀ incluyen pero sin limitación:

Geranilgeraniol

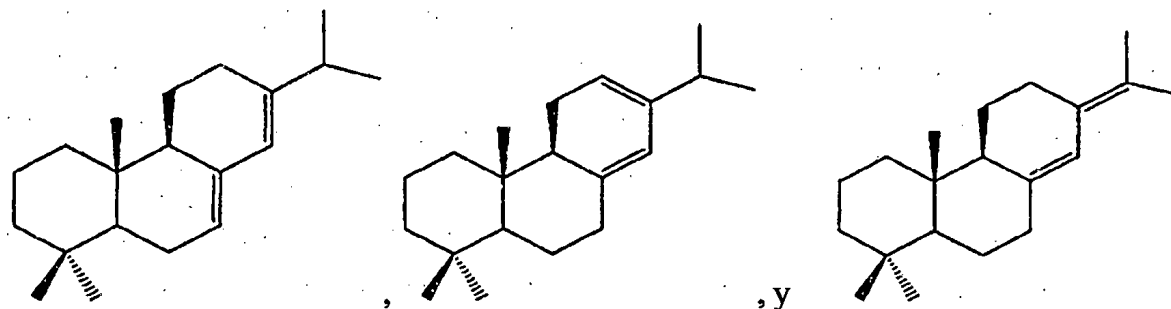
El geranilgeraniol, cuya estructura es



es un constituyente del aceite de la madera de *Cedrela toona* y del aceite de linaza. El geranilgeraniol puede obtenerse, por ejemplo, añadiendo a las construcciones de expresión un gen de fosfatasa después del gen que codifica una GGPP sintasa.

Abietadieno

El abietadieno incluye los siguientes isómeros:



y se encuentra en árboles tales como *Abies grandis*. El abietadieno se obtiene por la abietadieno sintasa. Un ejemplo ilustrativo de una secuencia de nucleótidos adecuada incluye, pero sin limitación: (U50768; *Abies grandis*) y (AY473621; *Picea abies*).

Compuestos C₂₀₊

Los compuestos bio-orgánicos C₂₀₊ también se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Ejemplos ilustrativos de dichos compuestos incluyen sesterterpenos (compuestos C₂₅ obtenidos a partir de cinco unidades de isopreno), triterpenos (compuestos C₃₀ obtenidos a partir de seis unidades de isopreno) y tetraterpenos (compuestos C₄₀ obtenidos a partir de ocho unidades de isopreno). Estos compuestos se obtienen usando métodos similares descritos en el presente documento y sustituyendo o añadiendo secuencias de nucleótidos para la sintasa (o sintasas) apropiada.

Rutas de modificación por ingeniería genética

Aunque con fines ilustrativos, la invención se ha descrito con referencia a la modificación por ingeniería genética de las rutas MEV y/o DXP, estos métodos pueden adaptarse para modificar mediante ingeniería genética de manera similar rutas adecuadas para constituir compuestos no isoprenoides y bio-orgánicos. Esta rutas se modifican por ingeniería genética normalmente, usando tecnología de ADN recombinante mediante la expresión de secuencias heterólogas adecuadas que codifican una o más enzimas.

Los ácidos nucleicos en cuestión pueden expresarse mediante un solo vector o vectores múltiples. Los ácidos nucleicos pueden disponerse en un solo operón, o en operones distintos que se colocan en un vector o en vectores múltiples. Cuando se desee, pueden emplearse dos vectores de expresión, cada uno de los cuales contiene una o más secuencias heterólogas unidas operativamente en un solo operón. Aunque que la elección de un solo vector o de vectores múltiples y el uso de un solo operón o de operones múltiples puede depender del tamaño de las secuencias heterólogas y de la capacidad de los vectores, esta dependerá en gran medida de la producción global de un compuesto bio-orgánico determinado que el vector sea capaz de proporcionar cuando se expresa en una célula hospedadora seleccionada. En algunos casos, sistemas de expresión de dos operones proporcionan un mayor rendimiento del compuesto bio-orgánico. Los vectores en cuestión pueden permanecer episomalmente replicables, o como una parte integral del genoma de la célula hospedadora. Normalmente, para una propagación sostenida de la célula hospedadora se prefiere esto último.

En determinadas células hospedadoras, los ácidos nucleicos en cuestión pueden controlarse mediante uno o más operones. En algunos casos, un sistema de dos o tres operones proporciona un mayor rendimiento de un compuesto bio-orgánico sobre un sistema de un solo operón.

Cuando se desee, las secuencias de ácido nucleico en cuestión pueden modificarse para reflejar la preferencia de codones de una célula hospedadora seleccionada para efectuar una mayor expresión de dichas secuencias en una célula hospedadora. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las secuencias de nucleótidos en cuestión se modificarán para una preferencia de codones de levadura. Véase, por ejemplo, Bennetzen y Hall (1982) J: Biol. Chem. 275(6): 3026-3031. Como otro ejemplo no limitante, en otra realización, las secuencias de nucleótidos se modificarán para una preferencia de codones de *E. coli*. Véase, por ejemplo, Gouy y Gautier (1982) Nucleic Acids Res. 10(22): 7055-7074; Eyre-Walker (1996) Mol. Biol. Evol. 13(6): 864-872. Véase también Nakamura et al. (2000) Nucleic Acids Res. 28(1): 292. También se dispone de tablas de usos de codones de muchos organismos, que pueden usarse como una referencia en el diseño de secuencias para su uso en la presente invención. El uso de codones frecuentes de un microorganismo hospedador determinado generalmente aumenta la probabilidad de la traducción, y por tanto el nivel de expresión de las secuencias deseadas.

La preparación de los ácidos nucleicos en cuestión puede realizarse mediante diversas técnicas recombinantes y procedimientos sintéticos de rutina. En resumen, los ácidos nucleicos en cuestión pueden prepararse a partir de fragmentos de ADN genómico, ADNc y ARN, pudiendo todos ellos extraerse directamente de una célula o producirse de manera recombinante mediante diversos procesos de amplificación incluyendo, pero sin limitación, PCR y PCR-tr (PCR en tiempo real).

La síntesis química directa de los ácidos nucleicos normalmente implica la adición secuencial de monómeros nucleotídicos 3'-bloqueados y 5'-bloqueados en el grupo 5'-hidroxilo terminal de una cadena polimérica de nucleótidos en crecimiento, en el que cada adición se efectúa mediante ataque nucleófilo del grupo 5'-hidroxilo terminal de la cadena en crecimiento en la posición 3' del monómero añadido, que es normalmente un derivado de fósforo, tal como un fosfotriéster, fósforoamidita o similar. Dicha metodología la conocen los expertos habituales en la técnica y se describe en los textos y en la bibliografía pertinente (por ejemplo, Matteucci et al. (1980) Tet. Lett. 521: 719; Patente U.S. Pat. No. 4.500.707 de Caruthers et al.; y Patentes U.S. Nos. 5.436.327 y 5.700.637 de Southern et al.).

El nivel de transcripción de un ácido nucleico en un microorganismo hospedador puede aumentarse de diversas maneras. Por ejemplo, esto puede realizarse aumentando el número de copias de la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima (por ejemplo, usando un vector de expresión con mayor número de copias que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la enzima, o introduciendo copias adicionales de una secuencia de nucleótidos que codifica la enzima en el genoma del microorganismo hospedador, por ejemplo, mediante la recombinación mediada por rec-A, el uso de vectores "suicidas", recombinación usando la recombinasa del fago lambda, y/o inserción mediante un transposón o elemento transponible). Además, esto puede realizarse cambiando el orden de las regiones codificantes del ARN policistrónico de un operón o degradando un operón en genes individuales, cada uno de ellos con sus propios elementos de control, o aumentando la fuerza del promotor (inicio de la transcripción o de la secuencia de control de la transcripción) a la cual está unida operativamente la región codificante enzimática (por ejemplo, usando un promotor consenso inducible por arabinosa o lactosa en un microorganismo hospedador de *Escherichia coli* en lugar de un promotor modificado inducible por lactosa, tal como el encontrado en los plásmidos pBluescript y pBBR1MCS), o usando un promotor inducible e induciendo al promotor inducible añadiendo un producto químico a un medio de crecimiento. El nivel de traducción de una secuencia de nucleótidos en un microorganismo hospedador puede aumentarse de diversas maneras, incluyendo, pero sin limitación, el aumento de la estabilidad del ARNm, modificando la secuencia del sitio de unión al ribosoma, modificando la distancia o la secuencia entre el sitio de unión al ribosoma y el codón de inicio de la secuencia codificante enzimática, modificando toda la región intercistrónica localizada "aguas arriba de" o adyacente al lado 5' del codón de inicio de la región codificante enzimática, estabilizando el extremo 3' del transcrito de ARNm usando secuencias en horquilla y especializadas, modificando el uso de codones de la enzima, alterando la expresión de los ARNt de codones raros usados en la biosíntesis de la enzima y/o aumentando la estabilidad de la enzima, por ejemplo, mediante mutación de su secuencia codificante. La determinación de codones preferidos y de los ARNt de codones raros puede basarse en un análisis de secuencia de genes derivados del microorganismo hospedador.

El vector en cuestión puede construirse para producir un nivel deseado de números de copias de la enzima codificada. En algunas realizaciones, los vectores en cuestión producen al menos 10, entre 10 a 20, entre 20-50, entre 50-100, o incluso más de 100 copias de la enzima deseada. Los plásmidos con número de copias bajo generalmente proporcionan menos de aproximadamente 20 copias de plásmido por célula; los plásmidos con número de copias medio generalmente proporcionan de aproximadamente 20 copias de plásmido por célula a aproximadamente 50 copias de plásmido por célula, o de aproximadamente 20 copias de plásmido por célula a aproximadamente 80 copias de plásmido por célula; y los plásmidos con número de copias elevado generalmente proporcionan de aproximadamente 80 copias de plásmidos por célula a aproximadamente 200 copias de plásmidos por células o más.

Como vectores de expresión con número de copias bajo adecuados para *Escherichia coli* se incluyen, pero sin limitación, pAGYC184, pBeloBac11, pBR332, pBAD33, pBBR1MCS y sus derivados, pSC101, SuperCos (cósmido) y pWE15 (cósmido). Como vectores de expresión con copias medio adecuados para *Escherichia coli* se incluyen, pero sin limitación, pTrc99A, pBAD24 y vectores que contienen un origen de replicación ColE1 y sus derivados. Como vectores de expresión con número de copias alto adecuados para *Escherichia coli* se incluyen, pero sin limitación, los vectores pUC, pBluescript, pGEM y pTZ. Como vectores de expresión con número de copias bajo (centroméricos) adecuados para levaduras se incluyen, pero sin limitación, pRS415 y pRS416 (Sikorski & Hieter (1989) Genetics 122: 19-27). Como vectores de expresión de 2 micras con número de copias alto adecuados en levaduras se incluyen, pero sin limitación, pRS425 y pRS426 (Christainson et al. (1992) Gene 110: 119-122). Vectores de expresión de 2 micras alternativos incluyen variantes no seleccionables del vector de 2 micras (Bruschi & Ludwig (1988) Curr. Genet. 15: 83-90) o plásmidos de 2 micras intactos que llevan un casete de expresión (tal como se ilustra en la Solicitud de Patente de Estados Unidos 20050084972) o plásmidos de 2 micras que llevan un marcador de selección defectuoso tal como LEU2d (Erhanrt et al. (1983) J. Bacteriol. 156 (2): 625-635) o URA3d (Okkels (1996) Annals of the New York Academy of Sciences 782(1): 202-207).

Como elementos reguladores se incluyen por ejemplo, promotores y operadores, que también pueden modificarse por ingeniería genética para aumentar el flujo metabólico de las rutas modificadas por ingeniería genética

aumentando la expresión de uno o más genes que desempeñan una función significativa en la determinación de la producción global del compuesto bio-orgánico producido. Un promotor es una secuencia de nucleótidos que inicia y controla la transcripción de una secuencia de ácido nucleico mediante una enzima ARN polimerasa. Un operador es una secuencia de nucleótidos adyacente al promotor que actúa para controlar la transcripción del ácido nucleico deseado. El operador contiene un dominio de unión a proteína en el que se puede unir una proteína represora específica. En ausencia de una proteína represora adecuada; la transcripción se inicia a través del promotor. En presencia de una proteína represora adecuada, la proteína represora se une al operador y de esta manera inhibe la transcripción del promotor.

En algunas realizaciones de la presente invención, los promotores usados en los vectores de expresión son inducibles. En otras realizaciones, los promotores usados en los vectores de expresión son constitutivos. En algunas realizaciones, una o más secuencias de ácido nucleico están unidas operativamente a un promotor inducible, y una o más secuencias de ácido nucleico distintas están unidas operativamente a un promotor constitutivo.

Ejemplos no limitantes de promotores adecuados para su uso en células hospedadoras procariotas incluyen un promotor de la ARN polimerasa del bacteriófago T7; un promotor trp; un promotor del operón lac; un promotor híbrido, por ejemplo, un promotor híbrido lac/tac, un promotor híbrido tac/trc, un promotor trp/lac, un promotor T7/lac, un promotor trc; un promotor tac y similar; un promotor araBAD, promotores regulados *in vivo*, tales como el promotor *ssaG* o un promotor relacionado (véase, por ejemplo, la Publicación de Patente de Estados Unidos N° 20040131637), un promotor *pagC* (Pulkkinen y Miller, J. Bacteriol. (1991) 173(1): 86-93; Alpuche-Aranda et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89(21): 10079-83), un promotor *nirB* (Harbome et al. (1992) Mol. Micro. 6:2805-2813), y similar (véase, por ejemplo, Dunstan et al. (1999) Infect. Immun. 67: 5133-5141; McKelvie et al. (2004) Vaccine 22:3243-3255; y Chatfield et al. (1992) Biotechnol. 10:888-892); un promotor sigma70, por ejemplo, un promotor sigma70 consenso (véanse, por ejemplo, los Nos de Acceso al GenBank AX798980, AX798961 y AX798183); un promotor de fase estacionaria, por ejemplo, un promotor *dps*, un promotor *spv*, y similar; un promotor derivado de la isla de patogenicidad SPI-2 (véase, por ejemplo, el documento WO96/17951); un promotor actA (véase, por ejemplo, Shetron-Rama et al. (2002) Infect. Immun. 70: 1087-1096); un promotor rpsM (véase, por ejemplo, Valdivia y Falkow (1996) Mol. Microbiol. 22: 367 378); un promotor tet (véase, por ejemplo, Hillen et al. (1989) In Saenger W. y Heinemann U. (eds) Topics in Molecular and Structural Biology, Protein-Nucleic Acid Interaction. Macmillan, Londres, RU, Vol. 10, págs. 143-162); un promotor SP6 (véase, por ejemplo, Melton et al. (1984) Nucl. Acids Res. 12: 7035-7056); y similares.

En algunas realizaciones, se aumenta la actividad total de una enzima heteróloga que desempeña una función más amplia en la producción total de un compuesto bio-orgánico con respecto a otras enzimas en las rutas respectivas, expresando la enzima a partir de un promotor fuerte. Los promotores fuertes adecuados para *Escherichia coli* incluyen, pero sin limitación, Trc, Tac, T5, T7 y P_{Lambda}. En otra realización de la presente invención, se aumenta la actividad total de una o más enzimas de la ruta modificada por ingeniería genética en un hospedador expresando la enzima a partir de un promotor fuerte en un plásmido con alto número de copias. Ejemplos adecuados para *Escherichia coli* incluyen, pero sin limitación, el uso de promotores Trc, Tac, T5, T7 y P_{Lambda} con los vectores pBAD24, pBAD18, pGEM, pBluescript, pUC y pTZ.

Ejemplos no limitantes de promotores adecuados para su uso en células hospedadoras eucariotas incluyen, pero sin limitación, un promotor temprano intermedio de CMV, un promotor de la timidina quinasa del HSV, un promotor tardío o temprano de SV40, LTR de retrovirus, y un promotor de la metalotioneína-I de ratón.

Ejemplos no limitantes de promotores constitutivos adecuados para su uso en células hospedadoras procariotas incluyen un promotor sigma70 (por ejemplo, un promotor sigma70 consenso). Ejemplos no limitantes de promotores inducibles adecuados para su uso en células hospedadoras bacterianas incluyen el pL del bacteriófago λ; Plac; P_{trp}; P_{tac} (promotor híbrido P_{trp}-lac); un promotor inducible por isopropil-beta-D44 tiogalactopiranosido (IPTG), por ejemplo, un promotor *lacZ*; un promotor inducible por tetraciclina; un promotor inducible por arabinosa, por ejemplo, PBAD (véase, por ejemplo, Guzman et al. (1995) J. Bacteriol. 177: 4121-4130); un promotor inducible por xilosa, por ejemplo, P_{xyl} (véase, por ejemplo, Kim et al. (1996) Gene 181: 71-76); un promotor GAL1; un promotor de triptófano; un promotor lac; un promotor inducible por alcohol, por ejemplo, un promotor inducible por metanol, un promotor inducible por etanol; un promotor inducible por rafinosa; un promotor termoinducibile, por ejemplo, el promotor lambda PL termoinducibile; un promotor controlado por un represor termosensible (por ejemplo, vectores de expresión basados en el fago lambda reprimidos por CI857; véase, por ejemplo, Hoffmann et al. (1999) FEMS Microbiol Lett. 177(2): 327-34) y similares.

Ejemplos no limitantes de promotores constitutivos adecuados para su uso en células hospedadoras de levadura incluyen un promotor de ADH1, ADH2, PGK o de LEU2. Ejemplos no limitantes de promotores inducibles adecuados para su uso en células hospedadoras de levadura incluyen, pero sin limitación, un promotor divergente inducible por galactosa, tal como el promotor GAL 1 o GAL 10 (West et al. (1984) Mol. Cell. Biol. 4(11): 2467-2478), o un promotor CUP1. Cuando se desee, el vector en cuestión comprende un promotor que es más fuerte que un promotor Lac de *E. Coli* nativo.

Ejemplos no limitantes de operadores para su uso en células hospedadoras bacterianas incluyen un operador del promotor de lactosa (la proteína represora LacI cambia de conformación cuando se pone en contacto con lactosa, impidiendo de este modo que la proteína represora LacI se una al operador), un operador del promotor de triptófano (cuando forma complejo con el triptófano, la proteína represora TrpR tiene una conformación que se une al operador; en ausencia de triptófano, la proteína represora TrpR tiene una conformación que no se une al operador), y un operador del promotor tac (véase, por ejemplo, deBoer et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80: 21-25).

Los genes en el vector de expresión también codificarán normalmente un sitio de unión al ribosoma para dirigir la traducción (es decir, síntesis) de cualquier producto génico de ARNm codificado. Para sitios de unión al ribosoma adecuados para su uso en *Escherichia coli*, véase Shine et al. (1975) Nature 254: 34, y Steitz, en Biological Regulation and Development: Gene Expression (ed. R. F. Goldberger), vol. 1, pág. 349, 1979, Plenum Publishing, N.Y. La inserción de la secuencia de nucleótidos que codifica el sitio de unión al ribosoma 5'-AAAACA-3' aguas arriba de una secuencia codificante facilita la traducción eficiente en un microorganismo hospedador de levadura (Looman et al. (1993) Nuc. Ac. Res. 21: 4268-4271; Yun et. al. (1996) Mol. Microbiol. 19: 1225-1239).

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

Un vector de expresión puede ser adecuado para su uso en tipos de microorganismos hospedadores particulares y no otros. Sin embargo, un experto habitual en la técnica, puede determinar fácilmente a través de experimentación rutinaria si un vector expresión particular es adecuado para un microorganismo hospedador determinado. Por ejemplo, el vector de expresión puede introducirse en el organismo hospedador, cuya viabilidad y expresión de cualquiera de los genes contenidos en el vector se monitoriza después

El vector de expresión también puede contener uno o más genes marcadores de selección que, después de la expresión, confieren uno o más rasgos fenotípicos útiles para seleccionar, o de otra manera identificar, células hospedadoras que llevan el vector de expresión. Ejemplos no limitantes de marcadores de selección adecuados para células eucariotas incluyen la resistencia a la dihidrofolato reductasa y a la neomicina. Ejemplos no limitantes de marcadores de selección adecuados para células procariotas incluyen la resistencia a tetraciclina, ampicilina, cloranfenicol, carbenicilina y kanamicina.

Para la producción de un producto bio-orgánico a escala industrial, puede ser poco práctico o demasiado costoso usar un marcador de selección que requiera la adición de un antibiótico a los medios de fermentación. Por consiguiente, algunas realizaciones de la presente invención emplean células hospedadoras que no requieren el uso de un marcador de selección que confiera resistencia a antibióticos para garantizar el mantenimiento plasmídico (vector expresión). En estas realizaciones de la presente invención, el vector de expresión contiene un sistema de mantenimiento plasmídico tal como el plásmido IncP de 60 kb (RK2), opcionalmente junto con el sistema de segregación y/o replicación del plásmido RK2, para efectuar la conservación del plásmido en ausencia de selección de antibiótico (véase; por ejemplo, Sia et al. (1995) J. Bacteriol. 177:2789-97; Pansegrau et al. (1994) J. Mol. Biol. 239:623-63). Un sistema de mantenimiento plasmídico adecuado para esta finalidad está codificado por el operón *parDE* de RK2, que codifica una toxina estable y una antitoxina inestable. La antitoxina puede inhibir la acción letal de la toxina por interacción proteína-proteína directa. Las células que pierden el vector de expresión que lleva el operón *parDE* se despojan rápidamente de la antitoxina inestable, produciendo la toxina estable que después causa la muerte celular. El sistema de replicación del plásmido RK2 está codificado por el gen *trfA*, que codifica una proteína de replicación de ADN. El sistema de segregación del plásmido RK2 está codificado por el operón *parCBA*; que codifica proteínas que actúan resolviendo multímeros plasmídicos que pueden surgir de la replicación del ADN.

Los vectores en cuestión pueden introducirse en una célula hospedadora de manera estable o transitoria mediante diversas técnicas establecidas. Por ejemplo, un método implica un tratamiento con cloruro de calcio en el que el vector de expresión se introduce mediante un precipitado de calcio. También pueden usarse otras sales, por ejemplo fosfato de calcio, siguiendo un procedimiento similar. Además, puede usarse electroporación (es decir, la aplicación de corriente para aumentar la permeabilidad de las células a los ácidos nucleicos). Otros métodos de transformación incluyen microinyección, transformación mediada con DEAE dextrano y choque térmico en presencia de acetato de litio. También pueden emplearse complejos lipídicos, liposomas y dendrímeros para transfectar el microorganismo hospedador.

Después de la transformación, pueden llevarse a la práctica diversos métodos para identificar las células hospedadoras en las que se han introducido los vectores en cuestión. Un método de selección ejemplar implica subcultivar células individuales para formar colonias individuales, seguido del ensayo de la expresión del producto génico deseado. Otro método conlleva seleccionar células hospedadoras transformadas basándose en rasgos fenotípicos conferidos a través de la expresión de genes marcadores de selección contenidos en el vector de expresión. Los expertos habituales en la técnica pueden identificar células hospedadoras modificadas genéticamente usando éstos u otros métodos disponibles en la técnica.

La introducción de diversas secuencias enrutadoras en una célula hospedadora para su uso en la invención puede confirmarse mediante métodos tales como PCR, hibridación por transferencia de Southern o transferencia de Northern. Por ejemplo, pueden prepararse ácidos nucleicos a partir de las células hospedadoras resultantes, y las secuencias de interés específicas pueden amplificarse mediante PCR usando cebadores específicos para las secuencias de interés. El producto amplificado se somete a electroforesis en gel de agarosa, electroforesis en gel de poliacrilamida o electroforesis capilar, seguida de tinción con bromuro de etidio, con solución SYBR Verde o similar, o detección del ADN con una detección UV. Como alternativa, en una reacción de hibridación pueden emplearse sondas de ácido nucleico específicas para las secuencias de interés. La expresión de una secuencia génica específica puede determinarse detectando el ARNm correspondiente mediante PCR acoplada a transcripción inversa, hibridación por transferencia de Northern y por inmunoensayos usando anticuerpos reactivos con el producto génico codificado. Inmunoensayos ejemplares incluyen, pero sin limitación, ELISA, radioinmunoensayos e inmunoensayos de tipo sándwich.

El rendimiento de un compuesto bio-orgánico mediante una o más rutas metabólicas descritas en el presente documento puede aumentarse inhibiendo reacciones que desvían productos intermedios de etapas productivas hacia la formación del producto bio-orgánico. La inhibición de las reacciones improductivas puede realizarse reduciendo la expresión y/o la actividad de enzimas implicadas en una o más reacciones improductivas. Dichas reacciones incluyen reacciones secundarias del ciclo TCA que conducen a la biosíntesis de ácidos grasos, a la biosíntesis de alanina, a la súper ruta del aspartato, a la gluconeogénesis, a la hemo biosíntesis, y/o a la biosíntesis del glutamato, a un nivel que afecta la producción global del compuesto bio-orgánico.

Para la genosupresión o reducción de la expresión de un gen de interés se dispone de diversos métodos. Por ejemplo, una expresión reducida de un gen puede realizarse por delección, mutación y/o reordenamiento génico. También puede realizarse con el uso de ARN antisentido, ARNip, miARN, ribozimas, ADN tricatenario e inhibidores de la transcripción y/o traducción. Además, para alterar la expresión génica pueden emplearse transposones, por ejemplo, insertándolos entre el promotor y la región codificante o entre dos genes adyacentes para inactivar uno o ambos genes.

La cantidad de microorganismos, o la densidad de microorganismo, por litro de fermentación, puede medirse midiendo el peso del microorganismo aislado de un volumen determinado del medio de fermentación. Una medida común es el peso seco celular por litro de medio de fermentación. Otro método que puede usarse para monitorizar la fermentación, al mismo tiempo que se procesa, es midiendo la densidad óptica del medio. Un método común es medir la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm, denominada DO₆₀₀ o DO. La DO puede correlacionarse con la densidad de un tipo de organismo específico dentro de un medio específico, pero la relación específica entre la DO y cantidad de microorganismo por volumen no será generalmente aplicable a través de todos los tipos de organismos en todos los tipos de medios. Puede crearse una curva de calibración midiendo la DO y el peso seco celular sobre un intervalo de densidades celulares. En algunos casos, estas correlaciones pueden usarse en diferentes fermentaciones de los mismos microorganismos o similares en los mismos medios o similares.

Ejemplos

La práctica de la presente invención puede emplear, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de la industria biosintética y similares, que se encuentran dentro del ámbito de la técnica. Dado que dichas técnicas no se describen por completo en el presente documento, se puede encontrar una amplia referencia a las mismas en la bibliografía científica.

En los siguientes ejemplos, se han realizado intentos para garantizar la precisión con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura y similar), pero puede haber variaciones y desviaciones, y en el caso de que exista un error administrativo en los números indicados en este documento, un experto habitual en la técnica a la que pertenece la presente invención puede deducir la cantidad correcta teniendo en cuenta el resto de la divulgación del presente documento. Salvo que se indique de otra manera, la temperatura se indica en grados Celsius y la presión es la presión atmosférica o próxima a ella a nivel del mar. Todos los reactivos, a menos que se indique de otra manera, se obtuvieron en el comercio.

Ejemplo 1

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

El plásmido de expresión pMevT se generó insertando el operón MevT (SEC ID N°: 1) en el vector pBAD33. El operón MevT codifica el conjunto de enzimas de la ruta MEV que juntas transforman la acetil-CoA precursora ubicua en (R)-mevalonato, en concreto acetoacetil-CoA tiolasa, HMG-CoA sintasa y HMG-CoA reductasa. El operón MevT se generó por PCR amplificando a partir del ADN genómico de *Escherichia coli* la secuencia codificante del gen *atoB* (número de acceso GenBank NC_C00913 REGIÓN: 2324131..2325315) (que codifica una acetoacetil-CoA tiolasa), a partir del ADN genómico de *Saccharomyces cerevisiae* la secuencia codificante del gen *ERG13* (número de acceso GenBank X96617, REGIÓN: 220..1695) (que codifica una HMG-CoA sintasa) y a partir de ADN genómico

de *Saccharomyces cerevisiae* un segmento de la región codificante del gen *HMG1* del (número de acceso GenBank M22002, REGIÓN: 1660..3165) (que codifica una HMG-CoA reductasa truncada (tHMGR)). El cebador PCR aguas arriba usado para la amplificación del fragmento génico *HMG1* incluye un codón de inicio artificial. Los fragmentos amplificados se cortaron y empalmaron conjuntamente usando extensiones de solapamiento (SOEing), proceso durante el cual se introdujeron sitios de unión al ribosoma después de las secuencias codificantes de los genes *atoB* y *ERG13*. Después de la adición de salientes 3' A; el operón *MevT* se ligó en el vector de clonación TA pCR4 (Invitrogen, Carlsbad, CA) y se secuenció para garantizar la precisión. El operón *MevT* se ligó posteriormente en el sitio de restricción enzimático *XmaI PstI* del vector pBAD33 (Guzman et al. (1995) J. Bacteriol. 177(14): 4121-4130). Para colocar el operón bajo el control del promotor P_{Lac} , el fragmento *araC-P_{BAD}Nsil-XmaI* de pBAD33 se reemplazó con el fragmento *Nsil-XmaI* de pBBRIMGS, produciendo el plásmido de expresión pMevT (véase la Patente de Estados Unidos Número 7.192.751).

El plásmido de expresión pAM36-MevT66 se generó insertando el operón *MevT66* en el vector pAM36. El vector pAM36 se generó insertando un casete oligonucleotídico que contenía los sitios de restricción enzimática *AscI-SfiI-AsiSI-XhoI-PacI-FsII-PmeI* en el vector pACYC184 (número de acceso GenBank XO6403), y eliminando el gen de resistencia *tet* en pACYC184. El operón *MevT66* se generó sintéticamente usando como molde la secuencia de nucleótidos SEC ID N°: 1, que comprende el gen *atoB* de *Escherichia coli* (número de acceso GenBank NC_000913 REGIÓN 2324131..2325315), el gen *ERG13* de *Saccharomyces cerevisiae* (número de acceso GenBank X96617, REGIÓN: 220..1695), y la versión truncada del gen *HMG1* de *Saccharomyces cerevisiae* (número de acceso GenBank M22002, REGIÓN: 1777..3285), estando las tres secuencias optimizadas por codones para la expresión en *Escherichia coli*. El operón *MevT66* generado sintéticamente se flanqueó por un sitio de restricción enzimática *EcoRI* en la posición 5' y un sitio de restricción enzimática *Hind III* en la posición 3', y podría por tanto clonarse en sitios de restricción enzimática compatibles de un vector de clonación, tal como un vector de origen convencional pUC o pACYC. A partir de esta construcción, el operón *MevT66* se amplificó por PCR con sitios de restricción enzimática *SfiI* y *AsiSI* flanqueantes, el fragmento de ADN amplificado se sometió a digestión por completo usando las enzimas de restricción *SfiI* y *AsiSI*, la mezcla de reacción se resolvió por electroforesis en gel, el fragmento de ADN de aproximadamente 4,2 kb se extrajo con gel usando un kit de purificación en gel de Qiagen (Valencia; CA), y el fragmento de ADN aislado se ligó en el sitio de restricción enzimática *SfiI AsiSI* del vector pAM36, produciendo el plásmido de expresión pAM36-MevT66.

El plásmido de expresión pAM25 se generó insertando el operón *MevT66* en el vector pAM29. El vector pAM29 se creó ensamblando el origen de replicación p15A y el gen de resistencia a kan de pZS24-MCS1 (Lutz y Bujard (1997) Nucl Acids Res. 25: 1203-1210) con un promotor *lacUV5* generado por oligonucleótidos. La construcción de síntesis del ADN que comprende el operón *MevT77* (véase anteriormente) se sometió a digestión por completo usando las enzimas de restricción *EcoRI* y *Hind III*, la mezcla de reacción se resolvió por electroforesis en gel, el fragmento de ADN de 4,2 kb se extrajo con gel y el fragmento de ADN aislado se ligó en el sitio de restricción enzimática *Hind III* de *EcoRI* de pAM29, produciendo el plásmido de expresión pAM25.

El plásmido de expresión pMevB-Cm se generó insertando el operón *MevB* en el vector pBBR1MCS-1 El operón *MevB* codifica el conjunto de enzimas que juntas convierten el (R)-mevalonato en IPP, en concreto mevalonato quinasa, fosfomevalonato quinasa y mevalonato pirofosfato carboxilasa. El operón *MevB* se generó por PCR amplificando a partir del ADN genómico de *Saccharomyces cerevisiae* las secuencias codificantes del gen *ERG12* (número de acceso GenBank X55875, REGIÓN: 580..1911) (que codifica una mevalonato quinasa), del gen *ERG8* (número de acceso GenBank Z49939, REGIÓN: 3363..4718) (que codifica una fosfomevalonato quinasa) y del gen *MVD1* (número de acceso GenBank X97557, REGIÓN: 544..1734) (que codifica una mevalonato pirofosfato carboxilasa) y cortando y empalmado los fragmentos de la PCR conjuntamente usando extensiones de solapamiento (SOEing). Seleccionando secuencias cebadoras apropiadas, los codones de terminación de *ERG12* y *ERG8* se cambian de TAA a TAG durante la amplificación para introducir sitios de unión al ribosoma. Después de la adición de salientes 3' A, el operón *MevB* se ligó en el vector de clonación TA pCR4 (Invitrogen, Carlsbad, CA). El operón *MevB* se escindió sometiendo a digestión por completo la construcción de clonación usando la enzima de restricción *PstI*, resolviendo la mezcla de reacción por electroforesis en gel, extrayendo con gel el fragmento de ADN de 4,2 kb y ligando el fragmento de ADN aislado en el sitio de restricción enzimática *PstI* del vector pBBR1MCS-1 (Kovach et al., Gene 166(1): 175-175 (1995)), produciendo el plásmido de expresión pMevB-Cm.

El plásmido de expresión pMBI se generó insertando el operón *MBI* en el vector pBBR1MCS-3. El operón *MBI* codifica las mismas enzimas que el operón *MevB*, así como una isopentenil pirofosfato isomerasa que cataliza la conversión de IPP en DMAPP. El operón *MBI* se generó por PCR amplificando a partir del ADN genómico de *Escherichia coli* la secuencia codificante del gen *idi* (número de acceso GenBank AF 119715) usando cebadores que contenían el sitio de restricción enzimática *XmaI* en sus extremos 5', sometiendo a digestión por completo el fragmento de ADN amplificado usando la enzima de restricción *XmaI*, resolviendo la mezcla de reacción por electroforesis en gel, extrayendo con gel el fragmento de 0,5 kb, y ligando el fragmento de ADN aislado en el sitio de restricción enzimática *XmaI* del plásmido de expresión pMevB, colocando por lo tanto el gen *idi* en el extremo 3' del operón *MevB*. El operón *MIB* se subclonó en los sitios de restricción enzimática *Sall* y *SacI* del vector pBBR1MCS-3 (Kovach et al., Gene 166(1): 175-176 (1995)), produciendo el plásmido de expresión pMBI (véase la Patente de Estados Unidos Número 7.192.751).

El plásmido de expresión pMBIS se generó insertando el gen *ispA* en pMBI. El gen *ispA* codifica una farnesil pirofosfato sintasa que cataliza la conversión de IPP y DMAPP en FPP. La secuencia codificante del gen *ispA* (número de acceso GenBank D00694, REGIÓN: 484..1383) se amplificó por PCR a partir del ADN genómico de *Escherichia coli* usando un cebador directo con un sitio de restricción enzimática *SacII* y un cebador inverso con un sitio de restricción enzimática *SacI*. El producto PCR amplificado se sometió a digestión por completo con las enzimas de restricción *Sall* y *SacI*, la mezcla de reacción se resolvió por electroforesis en gel, y el fragmento de ADN de 0,9 kb se extrajo con gel. El fragmento de ADN aislado se ligó en el sitio de restricción enzimática *Sall* *SacI* de pMBI, colocando de este modo el gen *ispA* en la posición 3' de *idi* y el operón *MevB*, y produciendo el plásmido de expresión pMBIS (véase la Patente de Estados Unidos Número 7.192.751).

El plásmido de expresión pMBIS-gpps se obtuvo del plásmido de expresión pMBIS reemplazando la secuencia codificante de *ispA* con una secuencia de nucleótidos que codifica una geranil difosfato sintasa ("gpps"). Un fragmento de ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la geranil difosfato sintasa se generó sintéticamente usando, como molde, la secuencia codificante del gen *gpps* de *Arabidopsis thaliana* (número de acceso GenBank Y 17376, REGIÓN: 52..1320), optimizada por codones para la expresión en *Escherichia coli*. La secuencia de nucleótidos se flanqueó por un sitio de restricción enzimática *SacII* líder y un sitio de restricción enzimática *SacI* terminal, y puede clonarse en sitios de restricción enzimática compatibles de un vector de clonación tal como un vector de origen pUC o pACYC convencional. La secuencia de la geranil difosfato sintasa generada sintéticamente se aisló sometiendo a digestión la construcción de síntesis del ADN por completo usando las enzimas de restricción *SacII* y *SacI*, resolviendo la mezcla de reacción por electroforesis en gel, extrayendo con gel el fragmento de ADN de aproximadamente 1,3 kb, y ligando el fragmento de ADN aislado en el sitio de restricción enzimática *SacII* *SacI* del plásmido de expresión pMBIS, produciendo el plásmido de expresión pMBIS-gpps (véase la Figura 6 para un mapa del plásmido).

El plásmido de expresión pAM45 se generó insertando el operón MBIS en pAM36-MevT66 y añadiendo los promotores *lacUV5* delante de los dos operones. El operón MBIS se amplificó por PCR a partir de pMBIS usando cebadores que comprendían un sitio de restricción enzimática *XhoI* en la posición 5' y un sitio de restricción enzimática *PacI* en la posición 3'. El producto PCR amplificado se sometió a digestión por completo usando las enzimas de restricción *XhoI* y *PacI*, la mezcla de reacción se resolvió por electroforesis en gel, el fragmento de ADN de 5,4 kb se extrajo con gel y el fragmento de ADN aislado se ligó en el sitio de restricción enzimática *XhoI* *PacI* de pAM36-MevT66, produciendo el plásmido pAM43. Un fragmento de ADN que comprendía una secuencia de nucleótidos que codifica el promotor *lacUV5* se sintetizó a partir de oligonucleótidos y se subclonó en los sitios enzimáticos de restricción *AscI* *SfiI* y *AsiSI* *XhoI* de pAM43, produciendo el plásmido pAM45.

Ejemplo 2

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

El plásmido de expresión pAM41 se obtuvo a partir del plásmido de expresión pAM25 reemplazando la secuencia codificante del gen *HMG1*, que codifica la HMG-CoA reductasa de *Saccharomyces cerevisiae*, con la secuencia codificante del gen *mvaA*, que codifica la HMG-CoA reductasa de *Staphylococcus aureus* (número de acceso GenBank BA000017, REGIÓN: 2688925..2687648). La secuencia codificante del gen *mvaA* se amplificó por PCR a partir del ADN genómico de *Staphylococcus aureus* subespecie aureus (ATCC 70069) usando los cebadores 4-49 *mvaA* *SpeI* (SEC ID N°: 2) y 4-49 *mvaAR* *XbaI* (SEC ID N°: 3), el fragmento de ADN amplificado se sometió a digestión por completo usando la enzima de restricción *SpeI*, la mezcla de reacción se resolvió por electroforesis en gel; y el fragmento de ADN de aproximadamente 1,3 kb se extrajo con gel. La secuencia codificante de *HMG1* se eliminó de pAM25 sometiendo a digestión por completo el plásmido usando la enzima de restricción *HindIII*. Los salientes terminales del fragmento de ADN lineal resultante se enromaron usando la ADN polimerasa de T4. El fragmento de ADN se sometió después a digestión parcial usando la enzima de restricción *SpeI*, la mezcla de reacción se resolvió por electroforesis en gel, y el fragmento de ADN de 4,8 kb se extrajo con gel. El fragmento de ADN aislado se ligó con el producto de la PCR *mvaA* sometido a digestión con *SpeI*, produciendo el plásmido de expresión pAM41. La secuencia de nucleótidos del operón *atoB(opt):ERG13(opt):mvaA* contenida en pAM41 es la SEC ID N°: 41. *ERG13* también se conoce como HMGS o HMG-CoA sintasa.

El plásmido de expresión pAM52 se obtuvo a partir del plásmido de expresión pAM41 reemplazando la secuencia codificante del gen *ERG13*, que codifica la HMG-CoA sintasa de *Saccharomyces cerevisiae*, con la secuencia codificante del gen *mvaS*, que codifica la HMG-CoA sintasa de *Staphylococcus aureus* (número de acceso GenBank BA000017, REGIÓN: 2689180..2690346). La secuencia codificante del gen *mvaS* se amplificó por PCR a partir del ADN genómico de *Staphylococcus aureus* subespecie aureus (ATCC 70069) usando los cebadores HMGS 5' *Sa mvaS-S* (SEC ID N°: 4) y HMGS 3' *Sa mvaS-AS* (SEC ID N°: 5), y el fragmento de ADN amplificado se usó como un cebador de PCR para reemplazar la secuencia codificante del gen *HMG1* en pAM41 de acuerdo con el método de Geiser et al. (Bio Techniques 31: 88-92 (2001)), produciendo el plásmido de expresión pAM52. La secuencia de nucleótidos del operón *atoB(opt):mvaS:mvaA* contenida en pAM52 es la SEC ID N°: 42.

El plásmido de expresión pAM97 se obtuvo a partir del plásmido de expresión pAM45 reemplazando el operón MevT66 con el operón (*atoB(opt): mvaS: mvaA*) del plásmido de expresión pAM52. El plásmido de expresión pAM45 se sometió a digestión por completo usando las enzimas de restricción *AsiSI* y *SfiI*, la mezcla de reacción se resolvió por electroforesis en gel, y el fragmento de ADN de 8,3 kb que carecía del operón MevT66 se extrajo con gel. El operón *atoB(opt): mvaS: mvaA* se amplificó por PCR usando los cebadores 19-25 *atoB SfiI-S* (SEC ID N°: 6) y 19-25 *mvaA-AsiSI-AS* (SEC ID N°: 7), el producto de la PCR se sometió a digestión por completo usando las enzimas de restricción *SfiI* y *AsiSI*, la mezcla de reacción se resolvió por electroforesis en gel, y el fragmento de ADN de 3,7 kb se extrajo con gel y el fragmento de ADN aislado se ligó en el sitio de restricción enzimática *AsiSI SfiI* del plásmido de expresión pAM45, produciendo el plásmido de expresión pAM97.

El plásmido de expresión pAM97-MBI se obtuvo a partir del plásmido de expresión pAM97 y pAM45 reemplazando el operón MBIS de pAM97 con el operón MBI de pAM45. El operón MBI se amplificó por PCR a partir de pAM45 usando los cebadores 9-70C (SEC ID N°: 8) y 26-39B (SEC ID N°: 9), la mezcla de reacción se resolvió por electroforesis en gel, el fragmento de ADN de 4,5 kb se extrajo con gel, y el fragmento de ADN aislado se sometió a digestión por completo usando las enzimas de restricción *SacI* y *XhoI*. El plásmido de expresión pAM47 se sometió a digestión por completo usando las enzimas de restricción *SacI* y *XhoI*, la mezcla de reacción se resolvió por electroforesis en gel, el fragmento de 7,6 kb se extrajo con gel y el fragmento de ADN aislado se ligó con el producto de la PCR del operón MBI, produciendo el plásmido de expresión pAM97-MBI.

El plásmido de expresión pAM97-MevB se obtuvo a partir de los plásmidos de expresión pAM97 y pAM45 reemplazando el operón MBIS de pAM97 con el operón MevB de pAM45. El operón MevB se amplificó por PCR a partir de pAM45 usando los cebadores 90-70C (SEC ID N°: 8) y 26-39A (SEC ID N°: 10), la mezcla de reacción se resolvió por electroforesis en gel, el fragmento de ADN de 3,9 kb se extrajo con gel, y el fragmento de ADN aislado se sometió a digestión por completo usando las enzimas de restricción *SacI* y *XhoI*. El plásmido de expresión pAM97 se sometió a digestión por completo usando las enzimas de restricción *SacI* y *XhoI*, la mezcla de reacción se resolvió por electroforesis en gel, el fragmento de 7,6 kb se extrajo con gel, y el fragmento de ADN aislado se ligó con el producto de la PCR del operón MevB, produciendo el plásmido de expresión pAM97-MevB.

El plásmido de expresión pAM128 se generó insertando los operones (*atoB(opt):mvaS:mvaA*) y MBIS del plásmido de expresión pAM97 en un vector que comprendía el sistema de replicación, segregación y mantenimiento del plásmido RK2, que elimina la necesidad continua de selección de antibióticos de los transformantes de las células hospedadoras. El plásmido RK2 se sometió a digestión por completo usando la enzima de restricción *PstI*, la mezcla de reacción se resolvió por electroforesis en gel, el fragmento de ADN de aproximadamente 6,3 kb que contenía el locus *par* completo se extrajo con gel, y el fragmento de ADN aislado se subclonó en el sitio de restricción enzimática *PstI* del mini-replicón RK2, pRR10 (Roberts et al. (1990) J Bacteriol. 172(11): 6204-6216), produciendo el vector pAM132. El plásmido de expresión pAM97 se sometió a digestión por completo usando las enzimas de restricción *AscI* y *SacI*, la mezcla de reacción se resolvió por electroforesis en gel, el fragmento de ADN de aproximadamente 9,4 kb se extrajo con gel, y el fragmento de ADN aislado se ligó en el sitio de restricción enzimática *MluI SacI* de pAM132, produciendo el plásmido de expresión pAM128.

Ejemplo 3

Este ejemplo describe métodos para elaborar vectores de expresión que codifican enzimas de la ruta MEV de *Enterococcus faecalis* organizados en operones.

El plásmido pAM16 se generó insertando la secuencia codificante del gen *mvaE* de *Enterococcus faecalis* (número de acceso GenBank AF290092 REGIÓN: 1479..3890) (que codifica una acetil-CoA acetiltransferasa/HMG-CoA reductasa (HMGR)) en el vector pBlueScripII-KS(+). La secuencia codificante del gen *mvaE* se amplificó por PCR a partir del ADN genómico de *Enterococcus faecalis* (ATCC 700802) usando cebadores 5' fosforilados 4-40 *mvaEF* BamHI (SEC ID N°: 11) y 4-40 *mvaERHindIII* (SEC ID N°: 12). (Obsérvese que el cebador 4-40 *mvaEF* BamHI cambia el codon de inicio del gen *mvaE* de TTG a ATG en el producto de la PCR amplificado). El producto de la PCR resultante se ligó en el sitio de restricción enzimática *SmaI* de pBlueScripII-KS(+) (Stratagene, La Jolla, CA), produciendo el plásmido de expresión pAM16.

El plásmido pAM18 se generó insertando la secuencia codificante del gen *mvaS* de *Enterococcus faecalis* (número de acceso GenBank AF290092 REGIÓN: 142..1293) (que codifica una HMG-CoA sintasa (HMGS)) en el vector pBlueScripII-KS(+). La secuencia codificante del gen *mvaS* se amplificó por PCR a partir del ADN genómico de *Enterococcus faecalis* (ATCC 700802) usando cebadores 5' fosforilados 4-40 *mvaSF* BglII (SEC ID N°: 13) y 4-39 *mvaSR* BamHI (SEC ID N°: 14), y el producto de la PCR se ligó en el sitio de restricción enzimática *SmaI* de pBlueScripII-KS(+) (Stratagene, La Jolla, CA), produciendo el plásmido de expresión pAM18.

El plásmido de expresión pAM22 se generó insertando la secuencia codificante del gen *mvaE* del plásmido de expresión pAM16 en el vector pZE21-P_{L-lacO1}. El vector pZE21-P_{L-lacO1} es un derivado del vector pZE21-MCS-1 en el que el promotor *tet* se reemplazó con el promotor P_{L-lacO1} (Lutz y Bujard (1997) Nucl Acids Res. 25: 1203-1210). El plásmido de expresión pAM16 se sometió a digestión por completo usando las enzimas de restricción *BamHI* y *HindIII*, la mezcla de reacción se resolvió por electroforesis en gel, el fragmento de ADN de aproximadamente 2,4 kb

que contenía la secuencia codificante de *mvaE* se extrajo con gel y el fragmento de ADN aislado se insertó en el sitio de restricción enzimática *BamHI HindIII* de pZE21-P_{L-lacO1}, produciendo el plásmido de expresión pAM22.

El plásmido pAM33 se generó insertando la secuencia codificante del gen *mvaS* del plásmido de expresión pAM18 en el plásmido de expresión pAM22. El plásmido de expresión pAM18 se sometió a digestión por completo usando las enzimas de restricción *BglII* y *BamHI*, la mezcla de reacción se resolvió por electroforesis en gel, el fragmento de ADN de aproximadamente 1,2 kb, que contenía la secuencia codificante del gen *mvaS* se extrajo con gel, y el fragmento de ADN aislado se insertó en el sitio *BamHI* del plásmido de expresión pAM22, produciendo el plásmido de expresión pAM33.

El plásmido pAM34 se generó insertando el operón *mvaS-mvaE* del plásmido de expresión pAM33 en el vector pAM29. El operón *mvaS-mvaE* se aisló sometiendo a digestión parcial pAM33 usando la enzima de restricción *EcoRI*, sometiendo a digestión el fragmento de ADN lineal resultante usando la enzima de restricción *MluI*, resolviendo la mezcla de reacción por electroforesis en gel, y extrayendo con gel el fragmento de ADN de aproximadamente 3,6 kb. La estructura del vector de pAM29 se obtuvo sometiendo a digestión por completo el vector de expresión pAM25 usando las enzimas de restricción *MluI* y *EcoRI*, resolviendo la mezcla de reacción por electroforesis en gel, y extrayendo con gel el fragmento de ADN de aproximadamente 2,1 kb. Los dos fragmentos de ADN aislados se ligaron, produciendo el plásmido de expresión pAM34.

Ejemplo 4

Este ejemplo describe métodos para elaborar los plásmidos de expresión que codifican enzimas de la ruta DXP de *Escherichia coli* organizados en operones.

El plásmido de expresión pAM408 se generó insertando genes que codifican enzimas de la ruta DXP “superior” en el vector pAM29. Las enzimas de la ruta “superior” DXP incluyen 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa (codificada por el gen *dxs* de *Escherichia coli*), 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa (codificada por el gen *dxr* de *Escherichia coli*), 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol sintasa (codificada por el gen *ispD* de *Escherichia coli*), y 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol sintasa (codificada por el gen *ispE* de *Escherichia coli*), que conjuntamente transforman el piruvato y el D-gliceraldehído-3-fosfato en 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol-2-fosfato. Los fragmentos de ADN que comprenden las secuencias de nucleótidos que codifican las enzimas de la ruta DXP “superior” se generaron por PCR amplificando las secuencias codificantes de los genes *dxs* (número de acceso GenBank U00096 REGIÓN: 437539..439401), *dxr* (número de acceso GenBank U00096 REGIÓN: 193521..194717), *ispD* (número de acceso GenBank U00096 REGIÓN: 2869803..2870512), e *ispE* (número de acceso GenBank U00096 REGIÓN: 1261249..1262100) de la cepa DH1 de *Escherichia coli* (ATCC Nº 33849) con secuencias de Shine Dalgarno óptimas añadidas y los sitios enzimáticos de restricción 5' y 3' usando los cebadores PCR mostrados en las SEC ID Nos: 15-18. Los productos de la PCR se resolvieron por electroforesis en gel, se extrajeron con gel usando un kit de purificación con gel de Qiagen (Valencia, CA), se sometieron a digestión por completo usando enzimas de restricción apropiadas (*XhoI* y *KpnI* para el producto de la PCR que comprendía el gen *dxs*; *KpnI* y *Apal* para el producto de la PCR que comprendía el gen *dxr*; *Apal* y *NdeI* para el producto de la PCR que comprendía el gen *ispD*; *NdeI* y *MluI* para el producto de la PCR que comprendía el gen *ispE*), y se purificaron usando un kit de purificación para PCR de Qiagen (Valencia, CA). Después, se añadieron cantidades más o menos equimolares de cada producto PCR a una reacción de ligamiento para ensamblar los genes individuales en un operón. A partir de esta reacción de ligamiento, se usó 1 µl de mezcla de reacción para amplificar por PCR 2 casetes génicos distintos, en concreto los casetes génicos *dxs-dxr* e *ispD-ispE*. El casete génico *dxs-dxr* se amplificó por PCR usando los cebadores 67-1A-C (SEC ID Nº: 15) y 67-1DC (SEC ID Nº: 18), y el casete génico *ispD-ispE* se amplificó por PCR usando los cebadores 67-1 E-C (SEC ID Nº: 19) y 67-1 H-C (SEC ID Nº: 22). Los dos productos de la PCR se resolvieron por electroforesis en gel y se extrajeron con gel. El producto de la PCR que comprendía el casete génico *dxs-dxr* se sometió a digestión por completo usando las enzimas de restricción *XhoI* y *Apal*, y el producto de la PCR que comprendía el casete génico *ispD-ispE* se sometió a digestión por completo usando las enzimas de restricción *Apal* y *MluI*, y los dos productos de la PCR se purificaron. El vector pAM29 se sometió a digestión por completo usando las enzimas de restricción *Sall* y *MluI* y los dos productos de la PCR digeridos que contenían el operón de la ruta DXP “superior” se ligaron en el sitio de restricción enzimática *Sall MluI* del vector pAM29, produciendo el plásmido de expresión pAM408 (véase la Figura 7 para un mapa del plásmido).

El plásmido de expresión pAM409 se generó insertando genes que codifican las enzimas de la ruta DXP “inferior” en el vector pAM369. Las enzimas de la ruta DXP “inferior” incluyen 2C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato sintasa (codificada por el gen *ispF* de *Escherichia coli*), 1-hidroxi-2-(E)-metil-2(E)-4-difosfato sintasa (codificada por el gen *ispG* de *Escherichia coli*), e isopentenil/dimetilalil difosfato sintasa (codificada por el gen *ispH* de *Escherichia coli*), que conjuntamente transforman el 4-difosfocitidil-2C-metil-D-eritritol-2-fosfato en IPP y DMAPP. IPP también se convierte en DMAPP a través de la actividad de la isopentil difosfato isomerasa (codificada por el gen *idi* de *Escherichia coli*). Adicionalmente, DMAPP puede convertirse en FPP a través de la actividad de la farnesil difosfato sintasa (codificada por el gen *ispA* de *Escherichia coli*). Se generó por PCR un operón que codifica las enzimas de la ruta DXP “superior” así como una isopentil difosfato isomerasa y una farnesil difosfato sintasa amplificando los genes *ispF* (número de acceso GenBank U00096 REGIÓN: 2869323..2869802), *ispG* (número de acceso GenBank U00096 REGIÓN: 2638708..2639826), *ispH* (número de acceso GenBank U00096 REGIÓN: 26277.27227), *idi*

(número de acceso GenBank AF11975) e *ispA* (número de acceso GenBank D00694 REGIÓN: 484..1383) de la cepa DH1 de *Escherichia coli* (ATCC N° 33849) con secuencias de Shine Dalgarno óptimas añadidas y los sitios de restricción enzimática 5' y 3' usando los cebadores PCR apropiados. Los productos de la PCR se resolvieron por electroforesis en gel, se extrajeron con gel, se sometieron a digestión con las enzimas de restricción apropiadas (*BamHI* y *Apal* para el producto PCR que comprendía el gen *IspF*; *KpnI* y *Apal* para el producto PCR que comprendía el gen *ispG*; *Sall* y *KpnI* para el producto PCR que comprendía el gen *ispH*; *Sall* y *HindIII* para el producto PCR que comprendía el gen *idi*; *HindIII* y *NcoI* para el producto PCR que comprendía el gen *ispA*), y se purificaron. Después, se añadieron cantidades más o menos equimolares de cada producto PCR a una reacción de ligamiento para ensamblar los genes individuales en un operón. A partir de esta reacción de ligamiento, se usó 1 µl de mezcla de reacción para amplificar por PCR 2 casetes génicos distintos, concretamente los casetes génicos *ispF-ispG* e *ispH-idi-ispA*. El casete génico *ispF-ispG* se amplificó por PCR usando los cebadores 67-2A-C (SEC ID N°: 23) y 67-2D-C (SEC ID N°: 26), y el casete génico *ispH-idi-ispA* se amplificó por PCR usando los cebadores 67-2E-C (SEC ID N°: 27) y 67-2J-C (SEC ID N°: 32). Los dos productos de la PCR se resolvieron por electroforesis en gel, y se extrajeron con gel. El producto de la PCR que comprendía el casete génico *ispF-ispG* se sometió a digestión por completo usando las enzimas de restricción *BamHI* y *KpnI*, y el producto de PCR que comprendía el casete génico *ispD-ispE* se sometió a digestión hasta finalización usando las enzimas de restricción *BamHI* y *KpnI* y el producto PCR que comprendía el casete génico e *ispH-idi-ispA* se sometió a digestión por completo usando enzimas de restricción *KpnI* y *NcoI*, y los dos productos de PCR se purificaron. El vector pAM369 se creó ensamblando el origen de replicación p15A de pAM29 y el gen de la beta-lactamasa para resistencia a ampicilina de pZE12-luc (Lutz y Bujard (1997) Nucl Acids Res. 25:1203-1210) con un promotor lacUV5 generado con oligonucleótidos. El vector pAM369 se sometió a digestión por completo usando las enzimas de restricción *BamHI* y *NcoI* y los dos productos PCR aislados que contenían el operón de la ruta DXP "inferior" ligaron en el sitio de restricción enzimática *BamHI* *NcoI* del vector pAM369, produciendo el plásmido de expresión pAM409.

El plásmido de expresión pAM424, un derivado del plásmido de expresión pAM409 contenía el origen de replicación RK2 de amplio intervalo de hospedador, se generó transfiriendo el promotor *lacUV5* y el operón *ispFGH-idi-ispA* de pAM409 al vector pAM257. El vector pAM257 se generó de la siguiente manera: el locus *par* de RK2 se amplificó por PCR a partir de ADN del plásmido RK2 (Meyer et al. (1975) Science 190: 1226-1228) usando los cebadores 9-156A (SEC ID N°: 33) y 9-156B (SEC ID N°: 34), el producto de la PCR de 2,6 kb se sometió a digestión por completo usando las enzimas de restricción *AatII* u *XhoI*, y el fragmento de ADN se ligó en un plásmido que contenía el origen de replicación p15 y el gen de resistencia a cloranfenicol del vector pZA31-luc (Lutz y Bujard (1997) Nucl Acids Res. 25:1203-1210), produciendo el plásmido pAM37-*par*; el plásmido pAM37-*par* se sometió a digestión por completo usando las enzimas de restricción *SacI* y *HindIII*, la mezcla de reacción se resolvió por electroforesis en gel, el fragmento de ADN que comprendía el locus *par* de RK2 y el gen de resistencia a cloranfenicol se extrajo con gel, y el fragmento de ADN aislado se ligó en el sitio *SacI* *HindIII* del mini-replicón RK2 pRR10 (Roberts et al. (1990) J Bacteriol. 172: 6204-6216), produciendo el vector pAM133; el vector pAM133 se sometió a digestión por completo usando las enzimas de restricción *BglII* y *HindIII*, la mezcla de reacción se resolvió por electroforesis en gel, el fragmento de ADN de aproximadamente 6,4 kb que carecía del gen de resistencia a ampicilina y el origen conjugativo *oriT* se extrajeron con gel y el fragmento de ADN aislado se ligó con un fragmento de ADN generado sintéticamente que comprendía un sitio de clonación múltiple que contenía los sitios de restricción enzimática *PciI* y *XhoI*, produciendo el vector pAM257. El plásmido de expresión pAM409 se sometió a digestión por completo usando las enzimas de restricción *XhoI* y *PciI*, la mezcla de reacción se resolvió por electroforesis en gel y el fragmento de ADN de aproximadamente 4,4 kb se extrajo con gel. El vector pAM257 se sometió a digestión por completo usando las enzimas de restricción *XhoI* y *PciI*, y el fragmento de ADN aislado que contenía el promotor *lacUV5* y el operón *ispFGH-idi-ispA* se ligó en el sitio de restricción enzimática *XhoI* *PciI* del vector pAM257, produciendo el plásmido de expresión pAM424 (véase la Figura 8 para un mapa del plásmido).

Ejemplo 5

Este ejemplo describe métodos para elaborar los plásmidos de expresión que codifican enzimas que convierten FPP o GPP.

El plásmido de expresión pTrc99A-ADS se generó insertando una secuencia de nucleótidos que codifica un amorfa-4,11-dieno sintasa ("ADS") en el vector pTrc99A. La secuencia de amorfa-4,11-dieno sintasa se generó sintéticamente, de manera que después de la traducción, la secuencia de aminoácidos sería idéntica a la descrita por Merke et al. (2000) Ach. Biochem. Biophys. 381: 173-180, de manera que la secuencia de nucleótidos que codifica la amorfa-4,11-dieno sintasa se optimizó para la expresión en *Escherichia coli*, y por eso la secuencia de nucleótidos se flanqueó por un sitio de restricción enzimática *NcoI* 5' y *XmaI* 3' (véase la Patente de Estados Unidos Número 7.129.751). La secuencia de nucleótidos se sometió a digestión por completo usando las enzimas de restricción *NcoI* y *XmaI*, la mezcla de reacción se resolvió por electroforesis en gel, el fragmento de ADN de aproximadamente 1,6 kb se extrajo con gel, y el fragmento de ADN aislado se insertó en el sitio de restricción enzimática *NcoI* *XmaI* del vector pTrc99A (Amman et al. (1985) Gene 40: 183-190), produciendo el plásmido de expresión pTrc99A-ADS (véase la Figura 9 para un mapa del plásmido).

El plásmido de expresión pAM113 es un derivado de resistencia a cloranfenicol de pTrc99A-ADS. Éste se generó por PCR amplificando el gen de resistencia a cloranfenicol del vector pZA31-luc (Lutz y Bujard (1997) Nucl Acids

Res. 25:1 203-1210) usando cebadores 5' fosforilados 19-137 cml-pAM37-AS (SEC ID N°: 35) y 19-137 cml-pAM37-S (SEC ID N°: 36), e insertando el producto PCR de 920 pb en el sitio de restricción enzimática *FspI* del plásmido de expresión pTrc99AADS, produciendo el plásmido de expresión pAM113.

El plásmido de expresión pC9 se generó insertando un fragmento de ADN genómico de *Bacillus subtilis* 6051 que comprende la secuencia codificante del *nudF* y las secuencias genómicas aguas arriba (número de acceso GenBank Z99116 REGIÓN: 49364..48548) en el vector pTrc99A (Amann et al. (1988) Gene 69: 301-3115). El plásmido de expresión pNudF-H se generó insertando la secuencia codificante del gen *nudF* de *Bacillus subtilis* 6051 (número de acceso GenBank Z99116 REGIÓN: 49105..48548) en el vector pTrc99A. El plásmido de expresión pyhfr se generó insertando la secuencia codificante del gen *yhfR* de *Bacillus subtilis* 6051 (número de acceso GenBank Z99109 REGIÓN: 97583..97002) en el vector pTrc99A.

El plásmido de expresión pAM373 se generó insertando una secuencia de nucleótidos que codifica la β -farneseno sintasa ("FSB") de *Artemisia annua* (número de acceso GenBank AY835398), optimizada por codones para la expresión en *Escherichia coli*, en el vector pTrc99A. La secuencia de nucleótidos que codifica la β -farneseno sintasa se generó sintéticamente y se amplificó por PCR a partir de su construcción de síntesis de ADN usando los cebadores apropiados. Para crear un sitio de restricción enzimática *NcoI* líder en el producto PCR que comprende la secuencia codificante de la β -farneseno sintasa, el codon que codifica la secuencia de aminoácidos en la secuencia polipeptídica original (TCG que codifica la serina) se reemplazó por un codon que codifica el ácido aspártico (GAC) en el cebador de la PCR en posición 5' (SEC ID N°: 37). El producto PCR resultante se sometió a digestión parcialmente usando la enzima de restricción *NcoI* y se sometió a digestión por completo usando la enzima de restricción *SacI*, la mezcla de reacción se resolvió por electroforesis en gel, el fragmento de ADN de aproximadamente 1,7 kb que comprende la secuencia codificante de la β -farneseno sintasa se extrajo con gel, y el fragmento de ADN aislado se ligó en el sitio de restricción enzimática *NcoI SacI* del vector pTrc99A, produciendo el plásmido de expresión pAM373 (véase la Figura 9 para un mapa del plásmido).

Los plásmidos de expresión pTrc99A-FSA, pTrc99A-GTS, pTrc99A-PS, pTrc99A-TS se generaron insertando en el vector pTrc99A un fragmento ADN que comprendía una secuencia de nucleótidos que codifica una α -farneseno sintasa ("FSA"), una γ -terpineno sintasa ("GTS"), una α -pineno sintasa ("APS") o una terpinoleno sintasa ("TS"). El inserto del fragmento de ADN se generó sintéticamente, usando, como molde, por ejemplo, la secuencia codificante del gen de la α -farneseno sintasa de *Picea abies* (número de acceso GenBank AY473627, REGIÓN: 24..1766), la secuencia codificante del gen de la β -farneseno sintasa de *Artemisia annua* (número de acceso GenBank AY835398), la secuencia codificante del gen de la γ -terpineno sintasa de *Citrus limon* (número de acceso GenBank AF514286 REGIÓN: 30..1832), la secuencia codificante del gen de la α -pineno sintasa de *Abies grandis* (número de acceso GenBank U87909, REGIÓN: 6..1892) o de *Pinus taeda* (número de acceso GenBank AF543530 REGIÓN: 1..1887), o la secuencia codificante del gen de la terpinoleno sintasa de *Ocimum basilicum* (número de acceso GenBank AY693650) o de *Pseudotsuga menziesii* (número de acceso GenBank AY906866 REGIÓN: 10..1887) o de *Abies grandis* (número de acceso GenBank AF139206), estando todas las secuencias de nucleótidos optimizadas por codones para la expresión en *Escherichia coli*. Los fragmentos de ADN para la FSA se amplificaron por PCR a partir de su construcción de síntesis de ADN usando las secuencias cebadoras SEC ID N°: 39 y SEC ID N°: 40. El producto PCR resultante se sometió a digestión por completo usando las enzimas de restricción *NcoI* y *SacI*, la mezcla de reacción se resolvió por electroforesis en gel, el fragmento de ADN de aproximadamente 1,7 kb que comprendía la secuencia codificante de la α -farneseno sintasa se extrajo con gel, y el fragmento de ADN aislado se ligó en el sitio de restricción enzimática *NcoI SacI* del vector pTrc99A, produciendo el plásmido de expresión pTrc99A-FSA (véase la Figura 9 para un mapa del plásmido). Los fragmentos de ADN para la GTS, APS y TS se diseñaron para estar flanqueados por un sitio de restricción enzimática *XmaI* líder un sitio de restricción enzimática *XbaI* terminal, y se clonaron en sitios de restricción enzimática compatibles de un vector de clonación tal como el vector de origen pUC o pACYC convencional, a partir del cual podían liberarse de nuevo sometiendo a digestión por completo la construcción de síntesis del ADN usando las enzimas de restricción *XbaI* y *XmaI*, resolviendo la mezcla de reacción por electroforesis en gel y extrayendo con gel el fragmento de ADN de 1,7 a 1,9 kb que codifica la terpeno sintasa. Los fragmentos de ADN aislados se ligaron en el sitio de restricción enzimática *XmaI XbaI* del vector pTrc99A (Amman et al., Gene 40: 183-190 (1985)), produciendo los plásmidos pTrc99A-GTS, pTrc99A-APS o pTrc99A-TS (véase la Figura 9 para mapas de los plásmidos).

Los plásmidos de expresión pRS425-FSA y pRS425-FSB se generaron insertando una secuencia de nucleótidos que codifica una α -farneseno sintasa ("FSA") o una β -farneseno sintasa ("FSB"), respectivamente, en el vector pRS425-Gal1 (Mumberg et al. (1994) Nucl. Acids. Res. 22(25): 5767-5768). Los insertos de la secuencia de nucleótidos se generaron sintéticamente usando, como molde, por ejemplo, la secuencia codificante del gen de la α -farneseno sintasa de *Picea abies* (número de acceso GenBank AY473627, REGIÓN: 24..1766) o del gen de la β -farneseno sintasa de *Artemisia annua* (número de acceso GenBank AY835398), optimizada por codones para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae*. La secuencia de nucleótidos generada sintéticamente se flanqueó por un sitio 5' *BAMHI* y por un sitio 3' *XhoI*, y por tanto podría clonarse en los sitios de restricción enzimática compatibles de un vector de clonación tal como un vector de origen pUC o pACYC convencional. La secuencia de nucleótidos generada sintéticamente se aisló sometiendo a digestión por completo la construcción de síntesis de ADN usando las enzimas de restricción *BamHI* y *XhoI*. La mezcla de reacción se resolvió por electroforesis en gel, el fragmento

de ADN de aproximadamente 1,7 kb que comprendía la secuencia codificante de la α -farneseno sintasa o β -farneseno sintasa se extrajo con gel, y el fragmento de ADN aislado se ligó en el sitio de restricción enzimática *Bam*HI *Xho*I del vector pRS425-Gal1, produciendo el plásmido de expresión pRS425-FSA o pRS425-FSB, respectivamente.

Los plásmidos de expresión pTrc98A-LLS, pTrc99A-LMS, pTrc99A-BPS, pTrc99A-PHS, pTrc99A-CS y pTrc99ASS se generaron insertando una secuencia de nucleótidos que codifica una linalool sintasa ("LLS"), limoneno sintasa ("LMS"), β -pineno sintasa ("BPS"), β -felandreno ("PHS"), careno sintasa ("CS") o sabinina sintasa ("SS") en el vector pTrc99A. Los insertos de la secuencia de nucleótidos se generaron sintéticamente, usando como molde por ejemplo, la secuencia codificante del gen de la linalool sintasa de *Artemisia annua* (número de acceso GenBank AF154124, REGIÓN: 13..1764), la secuencia codificante del gen de la limoneno sintasa de *Abies grandis* (número de acceso GenBank AF006193 REGIÓN: 73..1986), la secuencia codificante de la β -pineno sintasa de *Artemisia annua* (número de acceso GenBank AF276072 REGIÓN: 1..1749), la secuencia codificante del gen de la β -felandreno sintasa de *Abies grandis* (número de acceso GenBank AF139205 REGIÓN: 34..1926), la secuencia codificante del gen de la careno sintasa de *Salvia stenophylla* (número de acceso GenBank AF527416 REGIÓN: 78..1871), o la secuencia codificante del gen de la sabinina sintasa de *Salvia officinalis* (número de acceso GenBank AF051901 REGIÓN: 26..1798). Las secuencias de nucleótidos que codifican las β -pineno, sabinina, y β -felandreno sintasas están flanqueadas por un sitio de restricción enzimática *Xma*I líder y un sitio de restricción enzimática *Xba*I terminal, las secuencias de nucleótidos que codifican las linalool y careno sintasas están flanqueadas por un sitio de restricción enzimática *Nco*I líder y un sitio de restricción enzimática *Xma*I terminal y secuencia de nucleótidos que codifica la limoneno sintasa está flanqueada por un sitio de restricción enzimática *Nco*I líder y un sitio de restricción enzimática *Pst*I terminal. Las construcciones de síntesis de ADN se sometieron a digestión por completo usando las enzimas de restricción *Xma*I y *Xba*I (para las construcciones de β -pineno, sabinina, y β -felandreno sintasa), las enzimas de restricción *Nco*I y *Xma*I (para las construcciones de linalool y careno sintasa), o las enzimas de restricción *Xba*I y *Pst*I (para la construcción de la limoneno sintasa). Las mezclas de reacción se resolvieron por electroforesis en gel, los fragmentos de ADN de aproximadamente 1,7 a 1,9 kb se extrajeron con gel, y los fragmentos de ADN aislados se ligaron en el sitio de restricción enzimática *Xma*I *Xba*I (para los insertos de la β -pineno, sabinina y β -felandreno sintasa), el sitio de restricción enzimática *Nco*I *Xma*I (para los insertos de la linalool y careno sintasa), o el sitio de restricción enzimática *Xba*I *Pst*I (para el insertos de la limoneno sintasa) del vector pTrc99A, produciendo los plásmidos de expresión pTrc99A-LLS, pTrc99A-LMS, pTrc99A-BPS, pTrc99A-PHS, pTrc99A-CS, y pTrc99A-SS (véase la Figura 9 para mapas de los plásmidos).

Ejemplo 6

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

Como se detalla en la Tabla 1, las cepas hospedadoras se crearon transformando células parentales de *Escherichia coli* químicamente competentes con uno o más plásmidos de expresión de los Ejemplos 1 al 5.

Tabla 1. Cepas hospedadoras de *E. coli*

Cepa hospedadora	Cepa parental de <i>E. coli</i>	Plásmidos de expresión	Selección con antibióticos
B32	DH1	pMevT	carbenicilina
B292	B	pMBIS	100 ug/ml
B210	DP	pTrc99A-ADS	tetraciclina 5 ug/ml cloramfenicol 34 ug/ml
B153	DH1	pAM97	carbenicilina
B282	DP	pTrc99A-ADS	100 ug/ml cloramfenicol 34 ug/ml
B255	DH1	pAM128	carbenicilina
B256	DP	pAM113	100 ug/ml cloramfenicol 34 ug/ml

B86	DH1	pAM52 pMBIS pTrc99A-ADS	kanamicina 50 ug/ml carbenicilina 100 ug/ml
B61	DH1	pAM25 pBBR1MCS-3 pTrc99A	tetraciclina 5 ug/ml
B62		pAM34 pBBR1MCS-3 pTrc99A	
B003	DH10B	pTrc99A-ADS	carbenicilina 100 µg/ml
B617		pAM408 pTrc99A-ADS	carbenicilina 100 ug/ml kanamicina 50 ug/ml
B618		pAM424 pTrc99A-ADS	carbenicilina 100 ug/ml cloramfenicol 35 µg/ml
B619		pAM408 pAM424 pTrc99A-ADS	carbenicilina 100 µg/ml kanamicina 50 µg/ml cloramfenicol 35 µg/ml
B650	DH10B	pAM373	carbenicilina 100 µg/ml
B651		pAM408 pAM373	carbenicilina 100 µg/ml kanamicina 50 µg/ml
B652		pAM424 pAM373	carbenicilina 100 µg/ml cloramfenicol 35 µg/ml
B653		pAM408 pAM424 pAM373	carbenicilina 100 µg/ml kanamicina 50 µg/ml cloramfenicol 35 µg/ml
B286	DH1	pAM97-MevB pC9	carbenicilina 100 ug/ml
B287		pAM97-MevB pnudF-H	cloramfenicol 34 µg/ml
B288		pAM97-MevB pyhfR.	
B291		pAM97-MBI pyhfR	
B592	DH1	pMevT pMBIS pTrc99A-FSA	carbenicilina 100 ug/ml
B552		pMevT pMBIS pAM373	cloramfenicol 34 µg/ml tetraciclina

Célula hospedadora del Ejemplo 21 (producción de GTS, APS, TS)		pMevT pMBIS-gpps pTrc99A-GTS o -APS o -TS	5 ug/ml
Célula hospedadora del Ejemplo 21 (producción de LLS, LMS, BPS, PHS, CS, SS)		pMevT pMBIS-gpps pTrc99A-LLS o -LMS o -BPS o - PHS o -CS o - SS	carbenicilina 100 ug/ml cloramfenicol 34 µg/ml tetraciclina 5 ug/ml

En agar Luria Bertoni (LB) se seleccionaron transformantes de células hospedadoras que contenían antibióticos como se detalla en la Tabla 1. Se transfirieron colonias sencillas del agar LB a tubos de cultivo que contenían 5 ml de medio líquido LB y antibióticos. Los transformantes de las células hospedadoras B003, B617, B618, B619, B650, B651, B652 y B653 se incubaron a 30 °C en un agitador rotatorio a 250 rpm durante 30 horas. El resto de los transformadores de las células hospedadoras se incubaron a 37 °C en un agitador rotatorio a 250 rpm hasta que el crecimiento alcanzó la fase estacionaria. Las células se adaptaron a medios mínimos haciéndolas pasar a través de 4 a 5 rondas sucesivas de medios M9-MOPS que contenían glucosa al 0,8 % y antibióticos (para la composición del medio M9-MOPS véase la Tabla 2). Las células de conservación a -80 °C en crioviales en alícuotas madre de 1 ml constituidas por 400 µl de glicerol estéril al 50 % y 600 µl de cultivo líquido.

Tabla 2 – Composición del medio de cultivo de M9-MOPS

Componente	Cantidad (por l)
Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O	12,8 g
KH ₂ PO ₄	3 g
NaCl	0,5 g
NH ₄ Cl	1 g
MgSO ₄	2 mmol
CaCl ₂	0,1 mmol
Tiamina	0,1 ug
tampón MOPS pH 7,4	100 mmol
(NH ₃) 6Mo7O ₂₄ 4H ₂ O	3,7 ug
H ₃ BO ₄	25 ug
CoCl ₂	7,1 ug
CuSO ₄	2,4 ug
MnCl ₂	16 ug
ZnSO ₄	2,9 ug
FeSO ₄	0,28 mg

Ejemplo 7

Este ejemplo demuestra la estabilidad del plásmido de expresión en ausencia de antibióticos en una cepa hospedadora de *Escherichia coli* que lleva un plásmido de expresión que comprende el sistema de replicación, segregación y mantenimiento del plásmido RK2.

Se estableció un cultivo sembrado de la cepa hospedadora B255 añadiendo una alícuota madre de la cepa a un matraz de 125 ml que contenía M9-MOPS 40 ml, glucosa al 2 %, extracto de levadura al 0,5 % y los antibióticos detallados en la Tabla 1, y dejando crecer el cultivo durante una noche.

El cultivo sembrado se usó para inocular a una DO₆₀₀ inicial de aproximadamente 0,05, dos matraces de 250 ml conteniendo cada uno de ellos medio M9-MOPS 40 ml, glucosa al 2 % y extracto de levadura al 0,5 %. El cultivo nº 1 también contenía carbenicilina 100 ug/ml y cloramfenicol 34 ug/ml. El cultivo nº 2 no recibió antibióticos. Ambos cultivos se incubaron a 37 °C en un agitador rotatorio a 250 rpm hasta que alcanzaron una DO₆₀₀ de aproximadamente 0,2, momento en el cual se indujo la producción de amorfa-4,11-dieno en las células hospedadoras añadiendo 40 µl de IPTG 1M al medio del cultivo. En el momento de la inducción, los cultivos se cubrieron con 8 ml de una capa orgánica para capturar el amorfa-4,11-dieno. Se tomaron muestras periódicamente durante un total de 72 horas. La producción de amorfa-4,11-dieno por la célula hospedadora en los 2 cultivos se confirmó por CG/EM como se describe en el Ejemplo 10.

Para evaluar la estabilidad del plásmido en los dos cultivos celulares, se extrajo una muestra de cada cultivo a las 72 horas y se sembró en estrías en una placa de agar LB (sin antibióticos). Después de una incubación durante una noche a 37 °C, 50 colonias individuales procedentes de cada cultivo se sembraron por duplicado en placas en una placa de agar LB con antibióticos (cloramfenicol 34 ug/ml, carbenicilina 100 ug/ml) y en una placa con agar LB menos antibióticos (sin antibióticos). Después de otra noche de incubación a 37 °C, se encontró que cada una de las placas de agar LB con antibióticos y de agar LB sin antibióticos contenía aproximadamente 50 colonias, lo que indicaba que la retención del plásmido, tanto en presencia como en ausencia de antibióticos, en el medio de cultivo había sido aproximadamente del 100 %.

10 Ejemplo 8

Este ejemplo demuestra actividad y estabilidad específicas aumentadas de la HMGR de *Enterococcus faecalis* en comparación con la tHMGR de *Saccharomyces cerevisiae* en una cepa hospedadora de *Escherichia coli*.

Se establecieron cultivos sembrados de cepas hospedadoras B61 y B62 añadiendo una alícuota madre de cada cepa a matraces de 125 ml que contenían medio M9-MOPS 20 ml, glucosa al 0,8 % y antibióticos como se detalla en la Tabla 5 y los cultivos se dejaron crecer hasta la saturación. Los cultivos sembrados se diluyeron a 1:100 en 140 ml de medio reciente en un matraz de 500 ml y se dejaron crecer de nuevo a una DO₅₅₀ de aproximadamente 0,1, momento en el cual se indujo la producción de amorfa-4,11-dieno añadiendo 140 ul de IPTG 1 M a cada cultivo. Después de 4, 12, 20, 28, 36 y 49 horas de inducción, se extrajeron muestras de cada cultivo, y las células se sedimentaron por centrifugación. Los sedimentos celulares se congelaron instantáneamente en hielo seco y después se conservaron a -80 °C.

Para realizar los ensayos enzimáticos, los sedimentos celulares se descongelaron en hielo y después se sometieron a lisis usando Bugbuster (Novagen, Madison, WI) que contenía mezcla nº 3 de inhibidor proteasa (Calbiochem, San Diego, CA), benzonasa (bugbuster 20 µl o 5 ml; Novagen, Madison, WI), y lisozima (30 ug/ml). La actividad enzimática de la tHMGR de *Saccharomyces cerevisiae* se ensayó en Tris HCl 50 mM (pH 7,5), NADPH 0,2 mM (Sigma, St. Louis, MO), y sal sódica de DL-3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) 0,3 mM (Sigma, St. Louis, MO). El ensayo comenzó añadiendo lisado celular, y la desaparición del NADPH se monitorizó por absorbancia a 340 nM. Para explicar la desaparición no específica del NADPH, los resultados obtenidos en un ensayo control que carecía de HMG-CoA se restaron de los resultados obtenidos en las muestras de ensayo. La actividad enzimática de la HMGR de *Enterococcus faecalis* se midió de manera similar excepto que el tampón de ensayo contenía tampón de fosfato de potasio 100 mM pH 6,5, NADPH 0,4 mM, EDTA 1,0 mM, y KCl 100 mM.

Se realizaron ensayos con proteínas mediante el método de Bradford ((1976) Anal Biochem. 72: 248-254). Las actividades específicas se calcularon como proteína NADFH/min/mg Δnmol.

Ejemplo 9

Este ejemplo describe la calibración de la DO₆₀₀ con el peso seco celular ("DCW", *Dry Cell Weight*).

Para obtener la relación entre el DCW y la DO₆₀₀, una cepa representativa, la B32, se cultivó en procesos de alta densidad celular similares a los descritos en los Ejemplos 10-12. Se tomaron muestras en todas las ejecuciones y se midió la DO₆₀₀ y el DCW de cada muestra. Para determinar el DCW, las células se sedimentaron y los sobrenadantes se desecharon. El sedimento celular se lavó una vez con agua y después se secó en un horno a 80 °C durante al menos 3 días. Los tubos que contenían los sedimentos celulares se pesaron, el peso de los tubos se restó de los pesos medidos y el peso restante se dividió entre el volumen inicial de cada muestra (0,0015 l) para obtener el DCW.

50 Ejemplo 10 (ejemplo comparativo)

Este ejemplo demuestra la producción aumentada de amorfa-4,11-dieno en cepas hospedadoras de *Escherichia coli* que expresan la HMGR y HMGS de *Staphylococcus aureus* en comparación con células hospedadoras que expresan la tHMGR y HMGS de *Saccharomyces cerevisiae*.

Se establecieron cultivos sembrados de las cepas hospedadoras B32, B153, B210, B282, B292, B86, B255 y B256 añadiendo una alícuota madre de cada cepa a matraces de 125 ml distintos que contenían medio M9-MOPS 25 ml, glucosa al 0,8 % y antibióticos como se detalla en la Tabla 1, y dejando crecer los cultivos durante una noche.

Los cultivos sembrados se usaron para inocular, a una DO₆₀₀ inicial de aproximadamente 0,05, matraces de 250 ml distintos que contenían medio M9-MOPS 40 ml, glucosa al 2 % y antibióticos. Los cultivos se incubaron a 30 °C en un agitador rotatorio a 250 rpm hasta que alcanzaron una DO₆₀₀ de aproximadamente 0,2, momento en el cual se indujo la producción de amorfa-4,11-dieno en las células hospedadoras añadiendo 40 ul de IPTG 1M al medio de cultivo. Los cultivos se cubrieron con 8 ml de un recubrimiento orgánico (por ejemplo, dodecano, metil oleato o isopropilo miristato). Se tomaron muestras de la capa de recubrimiento y de caldo una vez al día durante 72 horas. Las muestras de caldo se usaron para medir la DO₆₀₀. La concentración del amorfa-4,11-dieno se midió transfiriendo

5 ul de la capa de recubrimiento orgánico a un vial de vidrio aséptico que, como patrón interno, contenía acetato de etilo 500 µl enriquecido con beta o trans-cariofileno.

Las muestras de recubrimiento orgánico/acetato de etilo se analizaron en un cromatógrafo de gases/ espectrómetro de masas (CG/EM) de Hewlett-Packard 6890 escaneando solamente dos iones, el ión molecular (204 m/z) y el ión 189 m/z, como se describe en Martin et al. (2001) *Biotechnol. Bioeng.* 75: 497-503. Para agilizar los tiempos de ejecución, se modificó el programa de temperatura y la matriz de columna para conseguir una resolución máxima óptima y el tiempo de ejecución global más corto. Una muestra de 1 ul se separó en la CG usando una columna DB-XLB (disponible en Agilent Technologies, Inc.; Palo Alto, CA) y gas portador de helio. El programa de temperatura para el análisis fue el siguiente: 100 °C durante 0,75 minutos, aumentando la temperatura a 60 °C/minuto hasta una temperatura de 300 °C, y un mantenimiento a 300 °C durante 0,5 minutos. Las muestras resueltas se analizaron mediante un detector selectivo de masa Hewlett-Packard modelo 5973 que monitoriza iones 189 y 204 m/z. Espectros de masas previos demostraron que el producto amorfa-4,11-dione sintasa era amorfa-4,11-dieno y que el amorfa-4,11-dieno tenía un tiempo de retención de 3,7 minutos usando este protocolo de CG. Se usó beta o trans-cariofileno como un patrón interno para la cuantificación. La titulación del amorfa-4,11-dieno se calculó usando la proporción de las áreas máximas del patrón interno con respecto al amorfa-4,11-dieno basándose en una curva de calibración cuantitativa del amorfa-4,11-dieno purificado (0,63-10 mg/l de KJF17-109-3) en acetato de etilo enriquecido con cariofileno.

Ejemplo 11 (ejemplo comparativo)

Este ejemplo demuestra la producción aumentada del amorfa-4,11-dieno por una cepa hospedadora de *Escherichia coli* que se desarrolla a temperatura subóptima.

Se estableció un cultivo sembrado de la célula hospedadora B32 añadiendo 0,5 ml de una alícuota madre de la cepa a un matraz de 250 ml que contenía M9-MOPS 50 ml y antibióticos como se detalla en la Tabla 1, y haciendo crecer el cultivo durante una noche a 37 °C en un agitador rotatorio a 250 rpm.

El cultivo sembrado se usó para inocular a una DO₆₀₀ inicial de aproximadamente 0,05 cuatro matraces de 250 ml, conteniendo cada uno de ellos medio fermentador en lote 40 ml (véase la Tabla 6 para la composición del medio), tampón MOPS 100 mM pH 7,1 y antibióticos. Los cultivos se incubaron en un agitador rotatorio a 250 rpm a 30 °C o a 37 °C hasta que alcanzaron una DO₆₀₀ de 0,18 a 0,22, momento en el cual se indujo la producción de amorfa-4,11-dieno en las células hospedadoras añadiendo 40 ul de IPTG 1 M al medio de cultivo. En el momento de la inducción, las células se cubrieron como 8 ml de un recubrimiento orgánico para capturar el amorfa-4,11-dieno. Las muestras se tomaron una vez al día y se analizaron como describe en el Ejemplo 10.

Ejemplo 12 (ejemplo comparativo)

Este ejemplo demuestra la producción aumentada de amorfa-4,11-dieno por una cepa hospedadora de *Escherichia coli* que se cultiva en condiciones limitadas de fuente de carbono.

Se estableció un cultivo sembrado de la célula hospedadora B32 para las ejecuciones de fermentación 050608-1 y 050629-1 añadiendo 0,25 ul de una alícuota madre de la cepa a un matraz de 250 ml que contenía medio M9-MOPS 50 ml y antibióticos como se detalla en la Tabla 1, e incubando el cultivo a 37 °C en un agitador rotatorio a 250 rpm hasta que alcanzó una DO₆₀₀ de 1 a 2.

Se estableció un cultivo sembrado de la célula hospedadora B32 para la ejecución de fermentación 060403-3 añadiendo una alícuota madre de la cepa a un matraz de 250 ml que contenía medio M9-MOPS 50 ml y antibióticos como se detalla en la Tabla 1, e incubando el cultivo durante una noche a 37 °C en un matraz rotatorio a 250 rpm. El cultivo sembrado se usó para inocular a una DO₆₀₀ inicial de aproximadamente 1 un matraz de 250 ml que contenía medio M9-MOPS 40 ml y antibióticos y el cultivo se incubó de nuevo a 37 °C en un matraz rotatorio a 250 rpm hasta que alcanzó una DO₆₀₀ de 3 a 5.

Para todos los procesos de fermentación, el KH₂PO₄, K₂HPO₄ 3H₂O, EDTA, ácido cítrico y (NH₄)₂SO₄ se termoesterilizaron en el birreactor (2L Applikon Bioconsole ADI 1025s con controladores ADI 1010, Applikon Biotechnology, Foster City, CA). Los componentes de los medios restantes se esterilizaron por filtración como soluciones madre y se inyectaron a través de la placa frontal. La Tabla 3 muestra la composición final de los medios para las ejecuciones de fermentación 050608-1 y 050629-1. La Tabla 4 muestra la composición final de los medios para la ejecución de fermentación 060403-3. El volumen de partida para la ejecución 050608-1 fue de 0,8 l, el volumen de partida para 050629-1 fue de 1,2 l y el volumen de partida para 060403-3 fue 1 l. Todas las ejecuciones se inocularon inyectando 50 ml del cultivo sembrado a través de la placa frontal.

TABLA 3 – Composición del medio de fermentación de las ejecuciones de fermentación 050608-1 y 050629-1

Componente	Medio del lote (por l)	Solución alimentadora (por l)
Glucosa	5g	590-650 g
KH ₂ PO ₄	4,2 g	-
K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O	15,7 g	-
Ácido cítrico	1,7 g	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	2g	-
MgSO ₄ 7H ₂ O	1,2 g	12 g
EDTA	8,4 mg	13 g
CoCl ₂ 6H ₂ O	0,25 mg	0,4 mg
MnCl ₂ 4H ₂ O	1,5 mg	2,35 mg
CuCl ₂ 2H ₂ O	0,15 mg	0,25 mg
H ₃ BO ₄	0,3 mg	0,5 mg
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,25 mg	0,4 mg
Zn(CH ₃ COO) ₂ 2H ₂ O	1,3 mg	1,6 mg
Hidrato de citrato de Fe(III)	10,0 mg	4,0 mg
Tiamina HCl	4,5 mg	-
Carbenicilina	100 ug	100 ug
Tetraciclina	5 ug	5 ug
Cloramfenicol	34 ug	34 ug

Tabla 4 - Composición del medio de fermentación de la ejecución de fermentación 060403-3

Componente	Medio del lote (por l)	Solución alimentadora (por l)
Glucosa	15 g	650 g
KH ₂ PO ₄	4,2 g	-
K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O	15,7 g	-
Ácido cítrico	1,7 g	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g	-
MgSO ₄ 7H ₂ O	1,2 g	12 g
EDTA	8,4 mg	13 mg
CoCl ₂ 6H ₂ O	2,5 mg	4 mg
MnCl ₂ 4H ₂ O	15 mg	23,5 mg
CuCl ₂ 2H ₂ O	1,5 mg	2,5 mg
H ₃ BO ₄	3 mg	5 mg
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	2,5 mg	4 mg
Zn(CH ₃ COO) ₂ 2H ₂ O	13 mg	16 mg
Hidrato de citrato de Fe(III)	100 mg	40 mg
Tiamina HCl	4,5 mg	-
Carbenicilina	100 ug	100 ug
Tetraciclina	5 ug	5 ug
Cloramfenicol	34 ug	34 ug

- 5 Para la ejecución de la fermentación 050608-1 (con exceso de carbono), el suministro se inició en el momento de la inducción, y las velocidades de suministro se ajustaron manualmente. Para la ejecución de la fermentación 050629-1 (con restricción de carbono), el suministro se administró al fermentador de acuerdo con el protocolo mostrado en la Tabla 5. Para la ejecución de la fermentación 060403-3 (menor cantidad de carbono), el suministro comenzó automáticamente cuando el bolo de glucosa inicial (15 g) se agotó y el oxígeno disuelto añadido. Hasta un máximo
- 10 de 27,6 g/h, la velocidad de suministro se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

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

$$\mu = 0,12$$

$$S(t_0) = 15g$$

en la que t_0 es el tiempo al cual se agotó la glucosa inicial. Después de alcanzar la velocidad máxima, el suministro de glucosa se limitó a una velocidad de 9,5 g/h, y se mantuvo constante a esta velocidad durante el resto de la ejecución.

Tabla 5 – Protocolo de suministro para la ejecución de la fermentación 050629-1

Tiempo de ejecución (horas)	Velocidad de suministro de glucosa (g/h)
0	0
7	0,37
10	0,74
12	1,11
14	1,48
16	2,22
18	2,96
20	3,69
22	4,80
24	5,91
31	7,39
33	5,54
47	3,69

Las ejecuciones 050608-1 y 050629-1 se realizaron a 37 °C. El flujo de aire en el biorreactor se estableció a 1-2 l/min; el pH se mantuvo a 7 usando hidróxido de amonio y/o hidróxido de sodio; la agitación inicial fue de 500-600 rpm; la espuma se controló con antiespuma B (Sigma-Aldich, St. Louis, MO); los niveles de oxígeno disuelto se mantuvieron por encima del 30 % usando una cascada de agitación. Después de 5-6 horas de cultivo, la producción de amorfa-4,11-dieno por las células hospedadoras se indujo añadiendo 0,8 ml de IPTG 1 M a la ejecución 050608-1 y 1,2 ml de IPTG 1 M a la ejecución 050629-1. Después de la inducción, la temperatura del cultivo se redujo a 30 °C.

La ejecución 060403-3 se realizó a 30 °C. El flujo de aire en el biorreactor se estableció a 1-2 l/min; el pH se mantuvo a 7 usando hidróxido de amonio. El oxígeno disuelto se mantuvo por encima del 30 % mediante una cascada de agitación y un enriquecimiento de oxígeno. A una DO_{600} de aproximadamente 28 (19 horas después de la inoculación), la producción de amorfa-4,11-dieno por las células hospedadoras se indujo añadiendo 1 ml de IPTG 1 M.

El amorfa-4,11-dieno se capturó y se extrajo de acuerdo con dos protocolos diferentes. Para las ejecuciones 050608-1 y 050629-1, el amorfa-4,11-dieno volátil presente en el gas liberado se capturó aireando el gas liberado a través de un lavador de gases que contenía heptanol 200 ml. El heptanol se diluyó después en acetato de etilo hasta que la concentración del amorfa-4,11-dieno en la muestra era entre 0,63 mg/l y 20 mg/l. Para la ejecución 060403-3, el amorfa-4,11-dieno se capturó en el biorreactor añadiendo 200 ml de un recubrimiento orgánico al fermentador en el momento de la inducción. La concentración del producto se midió combinando el recubrimiento orgánico más 25 ul de caldo con acetonitrilo 975 ul, agitando la muestra a una velocidad máxima en un mezclador Fisher Vortex Genie 2™ (Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY) durante al menos 3 minutos, extrayendo las células de la muestra por centrifugación, y diluyendo la solución de acetonitrilo en acetato de etilo hasta que la concentración del amorfa-4,11-dieno en la muestra era entre 0,63 y 20 mg/l. Las muestras de acetato de etilo se analizaron por CG/EM como se describe en el Ejemplo 10.

Ejemplo 13 (ejemplo comparativo)

Este ejemplo demuestra la producción aumentada de amorfa-4,11-dieno por una cepa hospedadora de *Escherichia coli* que se desarrolla en condiciones limitadas de fuente de carbono a una temperatura subóptima.

Se estableció un cultivo sembrado de la célula hospedadora B153 añadiendo una alícuota madre de la cepa a un matraz de 250 ml que contenía medio M9-MOPS 50 ml y antibióticos como se detalla en la Tabla 1, y haciendo crecer el cultivo a 37 °C en un agitador rotatorio a 250 rpm a una DO_{600} de 3,5 a 4,5.

Se configuraron biorreactores de 2 l (Biocontroller ADI 1010 con Bioconsole ADI 1025, Applikon Biotechnology, Foster City, CA) y se ejecutaron de la misma manera que la descrita en el Ejemplo 12 para la ejecución 060403-3, excepto que la cepa y el tiempo de inducción variaron.

La producción del amorfa-4,11-dieno en las células hospedadoras se indujo añadiendo 1 ml de IPTG 1 M al medio de cultivo. El amorfa-4,11-dieno se capturó y se extrajo de acuerdo con dos protocolos diferentes. En un método, el amorfa-4,11-dieno volátil presente en el gas liberado se capturó aireando el gas liberado a través de un lavador de gases que contenía 200 ml de heptanol. El heptanol se diluyó después en acetato de etilo hasta que la concentración del amorfa-4,11-dieno en la muestra era entre 0,63 y 20 mg/l. En otro método, el amorfa-4,11-dieno se capturó añadiendo 200 ml de un recubrimiento orgánico en el fermentador en el momento de la inducción.

El amorfa-4,11-dieno se extrajo del medio de cultivo combinando 25 ul de caldo con acetonitrilo a 975 ul, agitando la muestra a velocidad máxima en un mezclador Fisher Vortex Genie 2™ (Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY) durante al menos 3 minutos, extrayendo las células de la muestra por centrifugación, y diluyendo la solución de acetonitrilo en acetato de etilo hasta que la concentración del amorfa-4,11-dieno en la muestra era entre 0,63 y 20 mg/l. Las muestras de acetato de etilo se analizaron por CG/EM como se describe en el Ejemplo 10.

Ejemplo 14 (ejemplo comparativo)

Este ejemplo demuestra la producción aumentada de amorfa-4,11-dieno mediante una cepa hospedadora de *Escherichia coli* que se desarrolla en condiciones limitadas de fuentes de carbono y nitrógeno a una temperatura subóptima.

Se estableció un cultivo sembrado de la célula hospedadora B86 añadiendo una alícuota madre de la cepa a un matraz de 250 ml que contenía medio M9-MOPS 50 ml y antibióticos como se detalla en la Tabla 1. El cultivo se desarrolló durante una noche a 37 °C en un matraz rotatorio a 250 rpm, se subcultivó a la mañana siguiente en el mismo medio a una DO₆₀₀ de aproximadamente 1 y se desarrolló de nuevo a 37 °C y a 250 rpm a una DO₆₀₀ de 3 a 5.

Se configuraron 4 biorreactores de 2 l (Biocontroller ADI 1010 con Bioconsole ADI 1025, Applikon Biotechnology, Foster City, CA) y se ejecutó de la misma manera como la descrita en el Ejemplo 12 para la ejecución 060403-3, excepto que en el suministro, las ejecuciones limitadas de nitrógeno no contenían sulfato de amonio.

Automáticamente se inició un suministro de glucosa exponencial con un tiempo de generación de 6 horas cuando el bolo de glucosa inicial (15 g) se consumió y el oxígeno disuelto añadido. Hasta un máximo de 30,4 g/h, la velocidad del suministro se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

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

$$\mu = 0,12 \text{ min}^{-1}$$

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

en la que μ es la velocidad de crecimiento específica y t_0 es el tiempo al cual se agotó el bolo de glucosa inicial. Después de alcanzar la velocidad máxima, el suministro de glucosa se redujo a una velocidad de 11,4 g/h y se mantuvo constante a esta velocidad durante el resto de la ejecución. En las ejecuciones de fermentación 060710-4, 060724-5 y 060619-5 (carbono y nitrógeno restringidos), el suministro de glucosa se redujo adicionalmente cuando la restricción de amoníaco condujo a una acumulación de glucosa en el medio.

La fermentación se realizó a la temperatura reducida de 30 °C. El flujo de aire del biorreactor se estableció a 1 vvm; la agitación inicial fue a 700 rpm; la espuma se controló con un antiespuma B (Sigma-Aldich, St. Louis, MO); y la tensión del oxígeno disuelto se controló a 40 % usando una cascada de agitación (700-1.200 rpm) y enriquecimiento con oxígeno. En la ejecución de la fermentación 060327-3 (con restricción de carbono), el pH se mantuvo a 7 usando NH₄OH al 20 %; en las ejecuciones de fermentación 060710-4, 060724-5 y 060619-5 (con restricción de carbono y nitrógeno), el pH se mantuvo a 7 inicialmente usando NH₄OH al 20 % y comenzando a las 72 horas usando una mezcla a una proporción de 50/50 de NaOH y NH₄OH 10N, para restringir adicionalmente la cantidad de amoníaco que se va al fermentador.

La producción de amorfa-4,11-dieno en las células hospedadoras se indujo a una DO₆₀₀ de aproximadamente 30 añadiendo 1 ml de IPTG 1 M al medio de cultivo.

El amorfa-4,11-dieno se capturó cubriendo el medio con 10 % (v/v) de un recubrimiento orgánico. El amorfa-4,11-dieno se extrajo después combinando 25 ul de caldo con 975 ul de metanol, agitando la muestra a una velocidad máxima en un mezclador Fisher Vortex Genie 2™ (Scientific Industries, Inc., Bohemia, N.Y.) durante al menos 15 minutos, extrayendo las células de la muestra por centrifugación y añadiendo 10 ul de la solución de metanol a 990 ul de acetato de etilo que contenía trans-cariofileno 10 ul/l.

Las muestras se analizaron por CG/EM como se describe en el Ejemplo 10.

Ejemplo 15 (ejemplo comparativo)

Este ejemplo describe la producción de amorfa-4,11-dieno mediante la ruta DXP en una cepa hospedadora de *Escherichia coli*.

Se establecieron cultivos sembrados de las cepas hospedadoras B003, B617, B618 y B619 añadiendo una alícuota madre de cada cepa a distintos matraces de 125 ml que contenían medio M9-MOPS 25 ml y antibióticos como se detalla en la Tabla 1, y haciendo crecer el cultivo durante una noche.

Los cultivos sembrados se usaron para inocular a una DO₆₀₀ inicial de aproximadamente 0,05, distintos matraces de 250 ml que contenían medio M9-MOPS 40 ml, tiamina 45 µg/ml, micronutrientes, FeSO₄ 1,00E-5 mol/l, MOPS 0,1 M, extracto de levadura al 0,5 %, 20 g/l de D-glucosa y antibióticos. Los cultivos se incubaron a 30 °C en un agitador de incubación humidificado a 250 rpm hasta que alcanzaron una DO₆₀₀ de 0,2 a 0,3, momento en el cual la producción de amorfa-4,11-dieno en las células hospedadoras se indujo añadiendo 40 µl de IPTG 1 M al medio de cultivo.

En el momento de la inducción, los cultivos se cubrieron con 8 ml de un recubrimiento orgánico para capturar el amorfa-4,11-dieno. Se tomaron muestras a diversos momentos, y el amorfa-4,11-dieno se extrajo y se analizó mediante CG/EM como se describe en el Ejemplo 10. Los experimentos se realizaron usando 2 clones independientes de cada cepa hospedadora, y se estableció la media de los resultados. Se encontró que la desviación entre las muestras era menor del 10 %.

Ejemplo 16 (ejemplo comparativo)

Este ejemplo describe la producción aumentada de 3-metil-but-3-en-1-ol y 3-metil-but-2-en-1-ol en cepas hospedadoras de *Escherichia coli*.

Se establecieron cultivos sembrados de las cepas hospedadoras B286, B287, B288 y B291 sembrando en estrías una alícuota madre de cada cepa en agar LB que contenía antibióticos como se detalla en la Tabla 1. Se seleccionaron tres colonias independientes para cada cepa, y cada colonia se inoculó en 7 ml de medio LB que contenía antibióticos. Los cultivos se cultivaron durante una noche a 37 °C en un matraz rotatorio a 250 rpm hasta la última fase exponencial. Después, los cultivos se inocularon a una DO₆₀₀ de aproximadamente 0,05 en un matraz de 250 ml que contenía 40 ml de M9-MOPS, glucosa al 2 %, extracto de levadura al 0,5 % y antibióticos. Los cultivos se cultivaron durante una noche a 37 °C en un matraz rotatorio a 250 rpm hasta que alcanzaron una DO₆₀₀ de aproximadamente 0,2, momento en el cual se indujeron añadiendo 40 µl de IPTG 1 M. Los cultivos se cultivaron durante 72 horas a 30 °C en un matraz rotatorio a 250 rpm. De una a dos veces al día, la DO₆₀₀ de cada cultivo se midió, y se extrajo una muestra de 700 µl. Para extraer el 3-metil-but-3-en-1-ol y 3-metil-but-2-en-1-ol del caldo de cultivo, se añadieron 600 µl de acetato de etilo a 300 µl de cada muestra extraída. Después, la muestra se sometió a agitación vorticial durante 15 minutos, y 400 µl de la fase de acetato de etilo superior se transfirieron a un vial de vidrio aséptico para el análisis.

Las muestras se analizaron en un cromatógrafo de gases/espectrómetro de masas (CG/ES) Hewlett-Packard 6890. Una muestra de 1 µl se separó en el CG usando una columna DB-5 (Agilent Technologies, Inc.; Palo Alto, CA) y un gas portador de helio. El programa de temperatura para el análisis fue el siguiente: 60 °C durante 3 minutos, aumentando la temperatura a 60 °C/minuto hasta una temperatura de 300 °C, y un mantenimiento a 300 °C durante 2 minutos. El tiempo de ejecución total fue de 9 minutos. Las muestras resueltas se analizaron mediante un detector selectivo de masas Hewlett-Packard modelo 5973. El espectro de masas previo demostró que el producto 3-metil-but-3-en-1-ol y 3-metil-but-2-en-1-ol tenía un tiempo de retención de 2,067 minutos usando este protocolo de CG. Para enfocar la detección de 3-metil-but-3-en-1-ol y 3-metil-but-2-en-1-ol, se empleó un método de monitorización de iones selectivo que monitoriza solamente los iones 56 y 68 en el 3-metil-but-3-en-1-ol y en el 3-metil-but-2-en-1-ol.

Ejemplo 17 (ejemplo comparativo)

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

La generación de la cepa hospedadora EPY224 se describe en Ro et al. (Nature 440: 40-943; 2006) y en la Publicación de Patente PCT WO2007/005604. La cepa hospedadora EPY224 se curó del plásmido de expresión pRS425ADS cultivando en medio YPD (Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual, 2005 ed., ISBN 0-87969-728-8), sembrando en placas colonias sencillas sobre agar YPD, y después parcheando colonias sencillas en agar CSM-Met His y agar CSM-Met Leu. Los clones que crecieron en agar CSM-Met His pero no en agar CSM-Met Leu se curaron (es decir, habían perdido el plásmido pRS425ADS). Un clon de este tipo se denominó EPY300. El EPY300 se transformó con el plásmido de expresión pRS425ADS-LEU2d, un plásmido idéntico a pRS425-ADS excepto que en lugar de LEU2 contiene un marcador de selección LEU2d (Erhart y Hollenberg (1983) J. Bacteriol. 156: 625-635) produciendo la cepa hospedadora Y185.

Los transformantes de la célula hospedadora Y185 se seleccionaron en medios definidos sintéticos, que contenían glucosa al 2 % y todos los aminoácidos excepto histidina, leucina y metionina (CSM-glucosa; MP Biomedicals, Solon, OH). La cepa hospedadora EPY300 es auxotrófica para la biosíntesis de leucina (*leu2*), pero el plásmido de expresión pRS425-ADS-LEU2d en Y185 reestablece la prototrofia de la leucina (*LEU2*). Colonias sencillas se parchearon sobre medio selectivo (CSM-glucosa-histidina, leucina, metionina), y se cultivaron durante 2 días. Las células se rasparon de la placa y se transfirieron a 1 ml de glicerol al 25 % (v/v) en un criotubo. La suspensión se mezcló y después se conservó a -80 °C.

Los matraces sembrados de la cepa hospedadora Y185 se establecieron añadiendo una alícuota madre de la cepa a un matraz de 125 ml que contenía 25 ml de CSM-glucosa que carecía de leucina y metionina y desarrollando los cultivos durante una noche. Los cultivos se usaron para inocular, a una DO_{600} inicial de aproximadamente 0,05, un matraz deflector de 250 ml que contenía 40 ml de medios definidos sintéticos que carecían de leucina y que contenían glucosa al 0,2 %, galactosa al 1,8 % y metionina 1 mM. El cultivo se incubó a 30 °C en un matraz rotatorio a 200 rpm. Dado que la presencia de glucosa en los medios impide la inducción del promotor *GAL1* por galactosa, la producción de amorfa-4,11-dieno no se indujo hasta que las células habían consumido la glucosa en los medios y habían pasado a usar galactosa como su fuente principal de carbono. En el momento de la inoculación, los cultivos se cubrieron con 8 ml de un recubrimiento orgánico para capturar el amorfa-4,11 dieno. Las muestras se tomaron a las 72 horas transfiriendo 5 µl de la capa de disolvente orgánico a un vial de vidrio aséptico que contenía 500 µl de acetato de etilo que, como patrón interno, contenía una concentración conocida de beta o trans-cariofileno.

Las muestras de recubrimiento orgánico/acetato de etilo se analizaron en un cromatógrafo de gases/espectrómetro de masas (CG/EM) Hewlett-Packard 6890 como se describe en el Ejemplo 10.

Después de 72 horas de crecimiento, se encontraron 3 cultivos de levadura que producían 60,68, 54,48, y 59,25 mg/l de amorfa-4,11-dieno.

Ejemplo 18 (ejemplo comparativo)

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

Se cultivaron cepas de levadura CEN.PK2-1C (Y002) (MATA; *ura3-52*; *trp1-289*; *leu2=3,112*; *his3Δ1*; MAL2-8C; SUC2) y CEN.PK2-1D (Y003) (MATalpha; *ura3-52*; *trp1-289*; *leu2-3,112*; *his3Δ1*; MAL2-8C; SUC2) (J. P. van Dijken et al., Enzyme Microb Technol 26, 706 (1 jun, 2000) en medio rico convencional (YPD) o en medio sintético definido (D. Rose, F. Winston, P. Heiter, Methods in yeast genetics: a laboratory course manual. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1990) que carecía de nutrientes apropiados que permitían la selección de transformantes integradores, retención de plásmidos y descendencia meiótica.

Las transformaciones mediadas por ADN en *S. cerevisiae* se realizaron usando el procedimiento con acetato de litio descrito por R. H. Schiestl, R. D. Gietz, Curr Genet 16, 339 (dic, 1989). Todas las alteraciones y reemplazos de genes se confirmaron por análisis genotípico, reacción en cadena de la polimerasa ("PCR") de colonias y secuenciación de ADN genómico amplificado. Los plásmidos pAM489-pAM498 se construyeron usando pCR 2.1 (Invitrogen, Carlsbad CA) y se describen esquemáticamente en la Figura 7A-C y en la Tabla 6. Las secuencias marcadoras HISMX se describen en M. S. Longtine et al., Yeast 14, 953 (jul, 1998). La propagación del ADN plasmídico se realizó en la cepa DH5α de *Escherichia coli*.

Tabla 6

Cepa	RH5'	Gen nº 1	Promotor Crick	Promotor Watson	Gen nº 2	Marcador genético	RH 3'
pAM489	TRP1	tHMGR	GAL1	GAL10	ERG20	TRP1	TRP1
pAM490	TRP1	tHMGR	CUP1	CUP1	ERG20	TRP1	TRP1
pAN491	URA3	tHMGR	GAL1	GAL10	ERG 13	URA3	URA3
pAM492	URA3	IDI1	CUP1	CUP1	tHMGR	URA3	URA3
pAM493	ADE1	tHMGR	GAL1	GAL10	IDI1	ADE1	URA3
pAM494	ADE1	tHMGR	CUP1	CUP1	IDI1	ADE1	ADE1
pAM495	HIS3	ERG12	GAL1	GAL10	ERG10	HISMx	HIS3
pAM496	HIS3	ERG12	CUP1	CUP1	ERG10	HISMx	HIS3
pAM497	LEU2	ERG19	GAL1	GAL1	ERG8	HISMx	LEU2
pAM498	LEU2	ERG19	CUP1	CUP1	ERG8	HISMx	LEU2

Se prepararon cepas de *S. cerevisiae* Y002 e Y003 para la introducción de genes de la ruta de mevalonato inducibles de la siguiente manera. El promotor *ERG9* se reemplazó con el promotor *MET3* de *S. cerevisiae* por amplificación PCR de la región KanMX-PMET3 de pAM328 (SEC ID N°: 43) usando los cebadores 50-56-pw100-G (SEC ID N°: 44) y 50-56-pw101-G (SEC ID N°: 45) que contenían 45 pares de bases de homología con el promotor *ERG9* nativo. 10 µg del producto resultante de la PCR se transformaron en las cepas Y002 e Y003 en crecimiento exponencial usando polietilenglicol 3350 al 40 % w/w (Sigma-Aldrich St Louis, MO), acetato de litio 100 mM (Sigma), ADN de esperma de salmón 10 µg (Invitrogen) e incubación a 30 °C durante 30 minutos seguido de un choque térmico a 42 °C durante 30 minutos (como describen Schiestl y Gietz, Curr. Genet. 16: 339 (1989)). Se identificaron recombinantes positivos por su capacidad para crecer en medio rico que contenía Geneticina 0,5 µg/ml (Invitrogen Co; Carlsbad, CA) y se confirmó por PCR de diagnóstico. Los clones resultantes recibieron el nombre de Y93 (MAT A) e Y94 (MAT alfa). A continuación, la fase de lectura abierta *ADE1* se reemplazó con el gen *Leu2* de *Candida glabrata* (*CgLEU2*). El locus genómico *CgLEU2* de 3,5 KB se amplificó a partir del ADN genómico de *C. glabrata* (ATCC, Manassas, VA) usando los cebadores 61-67-CPK066-G (SEC ID N°: 46) y 61-67-CPK067-G (SEC ID N°: 47) que contenían 50 pares de bases de homología flanqueante con la fase lectura de abierta (ORF, *Open Reading Frame*) *ADE1*. 10 µg del producto resultante de la PCR se transformaron en Y93 y Y94 en crecimiento exponencial como se describe anteriormente. Las cepas *ade1-* se seleccionaron para el crecimiento en ausencia de complementación con leucina y se confirmaron por PCR de diagnóstico. Los clones resultantes recibieron el nombre de Y176 (MAT A) e Y177 (MAT alfa).

Para la generar la cepa Y188 de *S. cerevisiae*; 2 µg de ADN plasmídico de pAM491 (SEC ID N°: 48) y de pAM495 (SEC ID N°: 49), respectivamente, se sometieron a digestión durante una noche con PmeI (New England Biolabs, Beverly, MA) y se introdujeron en Y176 en crecimiento exponencial como se ha descrito anteriormente. Se seleccionaron recombinantes positivos para el crecimiento en medio que carece de uracilo e histidina. La integración en el locus genómico correcto se confirmó por PCR de diagnóstico.

Para generar la cepa Y189 de *S. cerevisiae*; 2 µg de ADN plasmídico de pAM489 (SEC ID N°: 50) y de pAM497 (SEC ID N°: 51), respectivamente, se sometieron a digestión durante una noche con PmeI y se introdujeron en Y 177 en crecimiento exponencial como se ha descrito anteriormente. Se seleccionaron recombinantes positivos para el crecimiento en medio que carece de triptófano e histidina. La integración en el locus genómico correcto se confirmó por PCR de diagnóstico.

En una placa con medio YPD se mezclaron aproximadamente 1×10^7 células de Y188 e Y189 durante 6 horas a temperatura ambiente para permitir el emparejamiento. El cultivo celular mixto se sembró después en placas en medio que carecía de histidina, uracilo y triptófano para seleccionar el crecimiento de células diploides. 2 µg de ADN plasmídico de pAM493 (SEC ID N°: 52) se sometieron a digestión durante una noche con PmeI y se introdujeron en células diploides de crecimiento exponencial como se ha descrito anteriormente. Se seleccionaron recombinantes positivos por crecimiento en medio que carecía de adenina. La integración en el locus genómico correcto se confirmó por PCR de diagnóstico. La cepa resultante recibió el nombre de Y238.

Para generar cepas haploides que contenían el complemento completo de genes introducidos, Y238 se esporuló en medio líquido de acetato de potasio al 2 % y rafinosa al 0,02 %. Se aislaron aproximadamente 200 tetradas genéticas (las tetradas son cuatro productos meióticos de cuatro esporas) usando un micromanipulador Singer Instruments de la serie MSM300 (Singer Instrument Co, LTD. Somerset, RU). Se identificaron aislados genéticos independientes que contenían el complemento apropiado del material genético introducido por su capacidad para crecer en presencia de adenina, histidina, uracilo y triptófano. La integración de todo el ADN introducido se confirmó por PCR de diagnóstico. Las cepas resultantes recibieron el nombre de Y210 (MAT A) e Y211 (MAT alfa).

2 µg de ADN plasmídico de pAM426 (SEC ID N°: 53), que contenía Amorfadieno Sintasa (ADS) optimizada por codones de *S. cerevisiae* expresada a partir del promotor *GAL1* de *S. cerevisiae*, se introdujeron en Y210 e Y211 en crecimiento exponencial como se ha descrito anteriormente. Las cepas de *S. cerevisiae* que contenían el plásmido pAM426 se seleccionaron por su capacidad para crecer en ausencia de complementación de leucina. Las cepas resultantes recibieron el nombre de Y225 (MAT A) e Y227 (MAT alfa).

2 µg de ADN plasmídico de pAM322 (SEC ID N°: 54), que contenía Amorfadieno Sintasa (ADS) optimizada por codones de *S. cerevisiae* y el citocromo P450 monooxigenasa (AMO) expresado a partir de *GAL1* de *S. cerevisiae* y el citocromo P450 óxidorreductasa (CPR) expresado a partir del promotor *GAL10* de *S. cerevisiae*, se introdujeron en Y210 e Y211 en crecimiento exponencial como se ha descrito anteriormente. Las cepas de *S. cerevisiae* que contenían el plásmido pAM322 se seleccionaron por su capacidad para crecer en ausencia de complementación con leucina. Las cepas resultantes recibieron el nombre de Y222 (MAT A) e Y224 (MAT alfa).

Ejemplo 19 (ejemplo comparativo)

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

Se estabilizaron cultivos sembrados de cepas hospedadoras B552 y B592 añadiendo una alícuota madre de cada cepa a un matraz de 125 ml que contenía M9-MOPS 25 ml, glucosa al 0,8 %, extracto de levadura al 0,5 % y antibióticos como se detalla en la Tabla 1 y haciendo crecer los cultivos durante una noche.

- 5 Los cultivos sembrados se usaron para inocular, a una DO_{600} inicial de aproximadamente 0,05, matraces de 250 ml que contenían M9-MOPS 40 ml, glucosa al 2 %, extracto de levadura al 0,5 % y antibióticos. Los cultivos se incubaron a 30 °C en un matraz rotatorio a 250 rpm hasta que alcanzaron una DO_{600} de aproximadamente 0,2, momento en el cual se indujo la producción de α -farneseno o β -farneseno en las células hospedadoras añadiendo 40 μ l de IPTG 1 M. En el momento de la inducción, los cultivos se cubrieron con 8 ml de un recubrimiento orgánico para capturar el α -farneseno. Las muestras se tomaron cada 24 horas hasta 120 horas (total de 5 intervalos de tiempo) transfiriendo 2 μ l a 10 μ l del recubrimiento orgánico a un vial de vidrio aséptico que contenía 1 ml de acetato de etilo enriquecido con trans-cariofileno como patrón interno. Además, alícuotas de 1 ml de los cultivos se centrifugaron, los sedimentos celulares se resuspendieron en agua estéril 250 μ l, y las suspensiones celulares se transfirieron a un vial de vidrio que contenía acetato de etilo 1 ml enriquecido con trans-cariofileno como un patrón interno. Además, se añadieron alícuotas de 0,5 ml del caldo de cultivo completo a viales de vidrio que contenían acetato de etilo 1 ml enriquecido con trans-cariofileno como patrón interno. Las muestras de caldo de cultivo completo se extrajeron en el acetato de etilo sometiendo a agitación vorticial los viales de vidrio durante 10 minutos, después de los cuales se transfirieron 600 μ l de la extracción de acetato de etilo a cada vial de vidrio aséptico.
- 10
- 20 Las muestras de recubrimiento orgánico/acetato de etilo y las muestras de caldo de cultivo completo extraídas con el acetato de etilo se analizaron en un cromatógrafo de gases Agilent 6890N dotado de un espectrómetro de masas Agilent 5975 (CG/EM) en modo de barrido completo (50/500 m/z). Para agilizar los tiempos de ejecución, el programa de temperatura y la matriz de columna se modificaron para conseguir una resolución máxima óptima y el tiempo de ejecución global más corto. Una muestra de 1 μ l se separó usando una columna HP-5MS (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA) y un gas portador de helio. El programa de temperatura para el análisis fue el siguiente: 150 °C mantenidos durante 3 minutos, aumentando la temperatura a 25° C/minuto hasta una temperatura de 200 °C, aumentando la temperatura a 60 °C/minuto hasta una temperatura de 300 °C, y manteniendo a 300 °C durante 1 minuto. Los espectros de masas previos demostró que el producto β -farneseno sintasa era β -farneseno y que usando este protocolo de CG el β -farneseno tenía un tiempo de retención de 4,33 minutos. Las titulaciones del farneseno se calcularon comparando áreas máximas generadas frente a una curva de calibración cualitativa del β -farneseno purificado (Sigma-Aldrich Chemical Company, St. Louis, MO) en acetato de etilo enriquecido con trans-cariofileno.
- 25
- 30

- 35 La cepa hospedadora B592 produjo aproximadamente 400 mg/l de α -farneseno a las 120 horas (media establecida sobre 3 clones independientes) y tuvo una productividad específica máxima de aproximadamente 46 mg/l/ DO_{600} . La cepa hospedadora B522 produjo aproximadamente 1,1 g/l de β -farneseno a 120 horas (media establecida sobre 3 clones independientes) y tuvo una productividad específica máxima de aproximadamente 96 mg/l/ DO_{600} (1 clon representativo).

40 Ejemplo 20 (ejemplo comparativo)

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

- 45 Se establecieron cultivos sembrados de las cepas hospedadoras B650, B651, B652 y B653 añadiendo una alícuota madre de cada cepa a matraces indistintos de 125 ml que contenían M9-MOPS 25 ml y antibióticos como se detalla en la Tabla 1 y haciendo crecer los cultivos durante una noche.

- 50 Los cultivos sembrados se usaron para inocular, a una DO_{600} inicial de aproximadamente 0,05, matraces distintos de 250 ml que contenían medio mínimo M9-MOPS 40 ml, tiamina 45 μ g/ml, micronutrientes, $FeSO_4$ 1,00E-5 mol/l, MOPS 0,1 M, extracto de levadura al 0,5 %, 20 g/l de D-glucosa y antibióticos. Los cultivos se incubaron a 30 °C en un agitador de incubación humidificado a 250 rpm hasta que alcanzaron una DO_{600} de 0,2 a 0,3, momento en el cual se indujo la producción del β -farneseno en las células hospedadoras añadiendo 40 μ l de IPTG 1 M al medio de cultivo. En el momento de la inducción, los cultivos se cubrieron con 8 ml de un recubrimiento orgánico para capturar el β -farneseno. Las muestras se extrajeron a diversos momentos transfiriendo muestras de 100 μ l de la capa superior de recubrimiento orgánico a un tubo aséptico. El tubo se centrifugó para separar cualquier célula o medio restante, y 10 μ l de las muestras del recubrimiento orgánico se transfirieron a acetato de etilo 500 μ l enriquecido con beta o trans-cariofileno como patrón interno en viales de vidrio asépticos para CG. Las mezclas se sometieron a agitación vorticial durante 30 segundos y después se analizaron como se describe en el Ejemplo 19. La cepa hospedadora de *Escherichia coli* B653 produjo aproximadamente 7 mg/g DCW de β -farneseno.
- 55
- 60

Ejemplo 21 (ejemplo comparativo)

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

65

La cepa EPY300 se generó eliminando el plásmido de expresión de la cepa EPY224 de *Saccharomyces cerevisiae* (Ro et al. (2006) Nature 440: 940-943; Publicación de Patente PCT WO2007/005604) cultivando en medio rico. La cepa EPY300 se transformó después con los plásmidos de expresión pRS425-FSA o pR425-FSB, produciendo las células hospedadoras Y166 e Y164, respectivamente.

Los transformantes de las células hospedadoras se seleccionaron en medios sintéticos definidos; que contenían glucosa al 2 % y todos los aminoácidos excepto leucina (SM-glu). La cepa hospedadora EPY300 era auxotrófica para la biosíntesis de leucina (*leu2*), pero el plásmido de expresión pRS425-FSA o pRS425-FSB reestablece la prototrofia de la leucina (*LEU2*). Colonias sencillas se transfirieron a viales de cultivo que contenían 5 ml de SM-glu líquido que carecía de leucina. Los cultivos se incubaron agitando a 30 °C hasta que el crecimiento alcanzó la fase estacionaria. Las células se conservaron a -80 °C en crioviales en alícuotas de 1 ml congeladas, constituidas por 400 µl de glicerol al 50 % y 600 µl de cultivo líquido.

Se establecieron cultivos sembrados añadiendo una alícuota madre a un matraz de 125 ml que contenía SM-glu 25 ml que carecía de leucina, y cultivando los cultivos durante una noche. Los cultivos sembrados se usaron para inocular, a una DO₆₀₀ inicial de aproximadamente 0,5, matraces deflectores de 250 ml que contenían 40 ml de medios sintéticos definidos que carecían de leucina, glucosa al 0,2 % y galactosa al 1,8 %. Los cultivos se incubaron a 30 °C en un matraz rotatorio a 200 rpm. Dado que la presencia de la glucosa en los medios impide la inducción del promotor *Gal1* por galactosa, la producción del farneseno no se indujo hasta que las células agotaron la glucosa en los medios y pasaron a usar galactosa como su fuente de carbono principal. Los cultivos se cubrieron con 8 ml de oleato de metilo o miristato de isopropilo. Se tomaron muestras una vez cada 24 horas transfiriendo 2-10 µl de la capa de disolvente orgánico a un vial de vidrio aséptico que contenía acetato de etilo 500 µl que, como patrón interno, contenía una concentración conocida de beta o trans-cariofileno. Además, se añadieron alícuotas de 0,5 ml del caldo de cultivo completo a viales de vidrio que, como patrón interno, contenían acetato de etilo 1 ml enriquecido con trans-cariofileno. Las muestras de caldo de cultivo completo se extrajeron en el acetato de etilo sometiendo a agitación vorticial los viales de vidrio durante 10 minutos, después de los cuales 600 µl de la extracción del acetato de etilo se transfirieron a un vial de vidrio aséptico.

La cepa hospedadora Y166 produjo aproximadamente 9,8 mg/l de α -farneseno a las 120 horas (media establecida sobre 3 clones independientes) y tuvo una productividad específica máxima de aproximadamente 3 mg/l/DO₆₀₀) (1 clon representativo). La cepa hospedadora Y164 produjo aproximadamente 56 mg/l de β -farneseno a las 120 horas (media establecida sobre 3 clones independientes) y tuvo una productividad específica máxima de aproximadamente 20 mg/l/DO₆₀₀) (1 clon representativo).

Ejemplo 22 (ejemplo comparativo)

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

Se establecieron cultivos sembrados de cepas hospedadoras para la producción de γ -terpineno (*E. coli* DH1-T1r [pMevT, pMevB-Gpps, pAM445]), α -pineno (*E. coli* DH1-T1r [pMevT, pMevB-Gpps, pAM443 o pAM442]) o terpinoleno (*E. coli* DH1-T1r [pMevT, pMevBGpps, pAM444]) añadiendo una alícuota madre de cada cepa a matraces distintos de 125 ml que contenían M9-MOPS 25 ml, glucosa al 2 %, extracto de levadura al 0,5 % y antibióticos como se detalla en la Tabla 1 y haciendo crecer los cultivos durante una noche hasta la última fase exponencial.

Los cultivos sembrados se usaron para inocular, a una DO₆₀₀ inicial de aproximadamente 0,05, matraces de 250 ml que contenían M9-MOPS 40 ml, glucosa al 2 %, extracto de levadura al 0,5 % y antibióticos. En el momento de la inoculación los cultivos también se cubrieron con hexadecano 4 ml. Los cultivos se incubaron a 30 °C en un matraz rotatorio a 200-250 rpm hasta que alcanzaron una DO₆₀₀ de aproximadamente 0,2, momento en el cual se indujo la producción del compuesto de interés en las células hospedadoras añadiendo 40 µl de IPTG 1 M. Se tomaron muestras una vez al día durante 96 horas transfiriendo 200 µl de la capa de hexadecano a un tubo de microcentrífuga de 0,6 ml. Para el análisis, el recubrimiento de hexadecano se diluyó a 1:1 o a 1:10 con acetato de etilo enriquecido con trans-cariofileno como un patrón interno en un vial de 1,8 ml para CG. Además, alícuotas de 1 ml de los cultivos se centrifugaron, los sedimentos celulares se resuspendieron en agua estéril 250 µl y las suspensiones celulares se transfirieron a un vial de vidrio que, como patrón interno, contenía acetato de etilo 1 ml enriquecido con trans-cariofileno. Los sedimentos celulares se extrajeron en el acetato de etilo sometiendo a agitación vorticial los viales de vidrio durante 15 minutos, después de los cuales 500 µl de la extracción del acetato de etilo se transfirieron a un vial de vidrio aséptico.

Las muestras de hexadecano/acetato de etilo y las muestras de los sedimentos celulares extraídos en el acetato de etilo se analizaron en un cromatógrafo de gases Agilent 6890N dotado de un espectrómetro de masas Agilent 5975 (CG/EM) en modo de barrido completo (50-500 m/z). Para agilizar los tiempos de ejecución, el programa de temperatura y la matriz de columna se modificaron para conseguir una resolución máxima óptima y el tiempo de ejecución global más corto. Una muestra de 1 µl se dividió (se seleccionó una proporción de división entre 1:2 y 1:50 basándose en la concentración de la muestra) y después se separó usando una columna HP-5MS (Agilent

Technologies, Inc., Palo Alto, CA) y un gas portador de helio. El programa de temperatura para el análisis fue el siguiente: 75 °C mantenidos durante 3 minutos, aumentando la temperatura a 20 °C/minuto hasta una temperatura de 115 °C, aumentando la temperatura a 60 °C/minuto hasta una temperatura de 300 °C, y un mantenimiento a 300 °C durante 0,5 minutos. Los diversos productos, γ -terpineno, α -pineno y terpinoleno se observaron a los 5,4, 4,1, 5,4 y 5,9 minutos, respectivamente. Las titulaciones se calcularon comparando las áreas máximas generadas frente a una curva de calibración cuantitativa de patrones purificados en acetato de etilo.

Ejemplo 23

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

15 Se establecieron cultivos sembrados añadiendo una alícuota madre de cada cepa a matraces distintos de 125 ml que contenían M9-MOPS 25 ml, extracto de levadura al 0,5 %, glucosa al 2 % y antibióticos, como se detalla en la Tabla 1, y haciendo crecer los cultivos durante una noche.

20 Los cultivos sembrados se usaron para inocular, a una DO_{600} inicial de aproximadamente 0,05, matraces deflectores de 250 ml que contenían M9-MOPS 40 ml, extracto de levadura al 0,5 %, glucosa al 2 % y antibióticos. Los cultivos se incubaron a 30 °C en un agitador rotatorio a 250 rpm hasta que alcanzaron una DO_{600} de aproximadamente 0,2, momento en el cual la producción del compuesto de interés en las células hospedadoras se indujo añadiendo 40 μ l de IPTG 1 M al medio de cultivo. El compuesto de interés se separó del medio de cultivo a través de extracción disolvente-disolvente (no de acuerdo con el método de la invención) o por sedimentación y decantación si la titulación del compuesto de interés era lo suficientemente abundante como para saturar los medios y formar una segunda fase (de acuerdo con el método de la invención).

25

Listado de secuencias

SEC ID Nº: 1

Operón MevT66

5

GAATTCAAAGGAGGAAAAATAAAATGAAGAACTGTGTGATTGTTTCTGCGGTCCG
 CACGGCGATCGGCAGCTTTAACGGCTCTTTAGCGAGCACCTCTGCAATCGATCTG
 GGTGCGACGGTCATTAAGGCCGCCATTGAACGCGCCAAAATCGACAGCCAGCAC
 GTTGATGAGGTGATCATGGGCAATGTGTTACAAGCCGGCCTGGGTCAAAACCCA
 GCGCGTCAAGCACTGTATAAAATCTGGTCTGGCCGAGACCGTGTGTGGCTTCACCG
 TCAATAAGGTTTTCGGGCTCTGGCCTGAAGAGCGTGGCCCTGGCAGCACAAAGCGA
 TTCAAGCCGGTCAGGCACAAAGCATCGTTGCGGGTGGCATGGAGAACATGTCTC
 TGGCGCCGTACTTATTAGATGCCAAAGCCCGCAGCGGTTATCGCCTGGGCGATGG
 TCAGGTGTACGACGTCATCTTACGCGATGGCTTAATGTGCGCGACCCACGGTTAC
 CACATGGGTATTACGGCCGAAAACGTGGCGAAAGAATAACGGCATTACGCGCGAG
 ATGCAGGATGAATTAGCACTGCACTCTCAGCGCAAAGCAGCAGCCGCGATCGAG
 TCTGGTGCGTTTACGGCGGAAATCGTGCCAGTTAACGTGGTCACGCGCAAGAAG
 ACGTTCGTTTTTCAGCCAGGACGAGTTCCCGAAGGCAAACAGCACCGCGGAGGCC
 TTAGGTGCCTTACGCCCAGCCTTTGACAAAGCGGGCACGGTCACCGCCGGTAATG
 CGAGCGGCATCAATGATGGTGCAGCGGCACTGGTCATCATGGAAGAGAGCGCCG
 CATTAGCAGCGGGTCTGACCCCAATTAGCGCGCATTAATCTTATGCCAGCGGCGG
 CGTCCCACCAGCCCTGATGGGCATGGGTCCGGTCCCAGCCACGCAAAAAGCCCT
 GCAATTAGCGGGCCTGCAACTGGCCGACATTGATCTGATCGAGGCGAACGAGGC
 GTTTCAGCGCGAGTTCCTGGCGGTGGGTAAGAATCTGGGCTTCGACAGCGAGAA
 AGTCAATGTGAACGGTGGCGCGATTGCGTTAGGCCATCCGATTGGTGCAAGCGG
 CGCACGCATCTTAGTGACGTTACTGCACGCCATGCAGGCACGCGACAAGACCTTA
 GGCCTGGCGACCTTATGTATTGGTGGCGGTCAAGGTATCGCCATGGTGATCGAAC
 GCCTGAACTGAAGATCTAGGAGGAAAGCAAAATGAAACTGAGCACCAAGCTGTG
 CTGGTGTGGCATCAAGGGTCGCCTGCGCCACAAAAGCAGCAACAGCTGCACAA
 CACGAACCTGCAAATGACCGAGCTGAAAAAGCAGAAGACGGCCGAGCAAAAGA
 CCCGCCCCGAGAACGTTGGCATCAAGGGCATCCAGATTTATATCCCGACGCAGTG
 TGTCACCAATCTGAGCTGGAGAAATTCGATGGCGTCAGCCAGGGTAAGTACAC
 CATCGGCCTGGGCCAGACCAACATGAGCTTCGTGAACGACCGTGAGGACATCTA
 TTCTATGAGCCTGACGGTGCTGTCTAAGCTGATCAAGAGCTACAACATCGACACG

AATAAGATCGGTCGTCTGGAGGTGGGTACGGAGACGCTGATTGACAAGAGCAAA
 AGCGTGAAGTCTGTCTTAATGCAGCTGTTTCGGCGAGAACACGGATGTCGAGGGT
 ATCGACACCCTGAACGCGTGTTACGGCGGCACCAACGCACTGTTCAATAGCCTGA
 ACTGGATTGAGAGCAACGCCTGGGATGGCCGCGATGCGATCGTCGTGTGCGGCG
 ATATCGCCATCTATGACAAGGGTGCGGCACGTCCGACCGGCGGTGCAGGCACCG
 TTGCGATGTGGATTGGCCCGGACGCACCAATTGTCTTCGATTCTGTCCGCGCGTC
 TTACATGGAGCACGCCTACGACTTTTACAAGCCGGA CTTCACGAGCGAATACCCG
 TACGTGGACGGCCACTTCTCTCTGACCTGCTATGTGAAGGCGCTGGACCAGGTTT
 ATAAGTCTTATAGCAAAAAGGCGATTTCTAAGGGCCTGGTCAGCGACCCGGCAG
 GCAGCGACGCCCTGAACGTGCTGAAGTATTTGACTACAACGTGTTCCATGTCCC
 GACCTGCAAATTAGTGACCAAATCTTATGGCCGCCTGTTATATAATGATTTCCGT
 GCCAACCCGCAGCTGTTCCCGGAGGTTGACGCCGAGCTGGCGACGCGTGATTAC
 GACGAGAGCCTGACCGACAAGAACATCGAGAAGACCTTCGTCAACGTGCGGAAG
 CCGTTCCACAAAGAGCGTGTGGCCCAAAGCCTGATCGTCCCGACCAACACGGGC
 AACATGTATACCGCGTCTGTCTACGCGGCATTCGCGAGCCTGCTGAATTACGTGCG
 GTTCTGACGACCTGCAGGGCAAGCGCGTTGGCCTGTTTCAGCTACGGTAGCGGCTT
 AGCGGCGCAGCCTGTATAGCTGCAAAATTGTTCGGCGACGTCCAGCACATCATCAA
 GGAGCTGGACATCACCAACAAGCTGGCGAAGCGCATCACCGAGACGCCGAAAG
 ATTACGAGGCAGCGATCGAGTTACGCGAGAATGCGCATCTGAAGAAGAACTTCA
 AGCCGCAAGGTAGCATCGAGCACCTGCAGAGCGGCGTCTACTACCTGACGAACA
 TTGACGACAAGTTCCGCCGTTCTTATGACGTCAAAAAGTAACTAGTAGGAGGAA
 AACATCATGGTGCTGACGAACAAAACCGTCATTAGCGGCAGCAAGGTGAAGTCT
 CTGAGCAGCGCCCAAAGCTCTAGCAGCGGCCCGTCTAGCAGCAGCGAGGAGGAC
 GACAGCCGTGACATTGAGTCTCTGGACAAGAAGATCCGCCCCGCTGGAGGAGTTA
 GAGGCCCTGCTGAGCAGCGGCAACACCAAGCAGCTGAAGAACAAGGAAGTTGC
 AGCGCTGGTGATCCACGGTAAGCTGCCACTGTATGCGCTGGAAAAGAACTGGG
 CGATACGACGCGTGCGGTGCGGTGCGTCGCAAAGCCTTAAGCATCTTAGCGGA
 GGCCCCGGTGTTAGCCAGCGACCGCCTGCCGTACAAGAACTACGACTACGACCG
 CGTGTTTGGCGCGTGCTGCGAGAATGTCATTGGCTACATGCCGTTACCGGTTGGT
 GTGATCGGCCCCGCTGGTCATTGATGGCACGAGCTATCACATTCCAATGGCGACCA
 CGGAAGGTTGCTTAGTCGCCAGCGCCATGCGTGGCTGTAAGGCGATTAAACGCCG
 GCGGTGGCGCGACGACCGTGTTAACCAAGGATGGTATGACGCGCGGTCCGGTCCG
 TCCGCTTCCCAACGCTGAAGCGCAGCGGCGCGTGTAAGATTGGCTGGATTCTGA
 GGAGGGCCAAAACGCGATCAAGAAAGCCTTCAACTCTACGAGCCGTTTCGCGCG

TTTACAGCATATCCAGACCTGCCTGGCCGGCGACCTGCTGTTTCATGCGCTTCCGC
 ACCACCACGGGCGATGCGATGGGCATGAACATGATCAGCAAGGGCGTCGAATAT
 AGCCTGAAACAAATGGTGGAGAATATGGCTGGGAGGACATGGAGGTTGTCTCT
 GTGAGCGGCAACTATTGCACCGACAAGAAGCCGGCAGCCATTAAGTGGATTGAG
 GGTCGCGGCAAAAGCGTCGTGGCAGAAGCGACCATCCCAGGCGACGTGGTCCGT
 AAGGTTCTGAAGAGCGACGTCAGCGCCCTGGTTGAGTTAAATATCGCGAAAAAC
 CTGGTCGGCAGCGCGATGGCGGGCAGCGTGGGTGGCTTTAACGCACATGCAGCG
 AATCTGGTTACGGCGGTTTCTTAGCCTTAGGTCAGGACCCAGCCCAAAATGTCG
 AGAGCAGCAACTGCATTACCTTAATGAAAGAGGTTGACGGTGACCTGCGCATCA
 GCGTTTCTATGCCGTCTATCGAGGTGCGCACGATCGGCGGCGGCACCGTTTTAGA
 ACCGCAAGGTGCGATGCTGGATCTGCTGGGCGTGCGCGGCCACATGCAACGGC
 CCCAGGCACCAATGCCCGCCAAGTGGCCCGTATCGTGGCCTGCGCGGTTCTGGCG
 GGTGAGCTGAGCCTGTGCGCCGATTAGCCGCGGGCCATTTAGTTCAATCTCACA
 TGACCCACAACCGCAAGCCGGCAGAACCAACCAAGCCAAATAACCTGGACGCAA
 CCGACATTAACCGTCTGAAGGATGGCAGCGTCACGTGCATTAAAAGCTGAGCAT
 GCTACTAAGCTT

SEC ID Nº: 2

Cebador 4-49 mvaA SpeI

5'-GCTACTAGTAGGAGGAAAAACATCATGCAAAGTTTAGATAAGAATTTCCG-3'

SEC ID Nº: 3

Cebador 4-49 mvaAR XbaI

5'-GCTTCTAGACTATTGTTGTCTAATTTCTTGTAATGCG-3'

SEC ID Nº: 4

Cebador HMGS 5' Sa mvaS-S

5'-

GAAGTGAAGATCTAGGAGGAAAGCAAAATGACAATAGGTATCGACAAAATAAA
 CT-3'

SEC ID Nº: 5

Cebador HMGS 3' Sa mvaS-AS

5'-TTGCATGATGTTTTCTCCTACTAGTTACTCTGGTCTGTGATATTCGCGAAC-3'

SEC ID Nº: 6

Cebador 19-25 atoB SfiI-S

5'-GCTAGGCCATCCTGGCCATGAAGAACTGTGTGATTGTTTCTG-3'

SEC ID Nº: 7

Cebador 19-25 mvaA-AsiSI-AS

5'-GCTTGCATCGCCGGCGGATTTGTCCTACTCAG-3'

SEC ID Nº: 8

Cebador 9-70C

5'-CCACCTCGAGATGTCATTACCGTTCTTAAGTTCTG-3'

SEC ID Nº: 9

Cebador 26-39B

5'-TGGTGGAGCTCTTATTTAAGCTGGGTAAATGCAGATAATCG-3'

SEC ID Nº: 10

Cebador 26-39A

5'-TTCTTGAGCTCTTATTCCTTTGGTAGACCAGTCTTTGCG-3'

5

SEC ID Nº: 11

Cebadores 4-40 mvaEF BamHI

5' – TATGGATCCTAAGGAGGATATTTAGATGAAAACAGTAGTTATTATTGATGC –
3'

SEC ID Nº: 12

Cebador 4-40 mvaER HindIII

5'-AGCTAAGCTTTTATTGTTTTCTTAAATCATTTAAATAGC - 3'

10

SEC ID Nº: 13

Cebador 4-40 mvaSF BgIII

5' – TATAGATCTTAAGGAGGATATTTAGATGACAATTGGGATTGATAAAATTAG -
3'

15

SEC ID Nº: 14

Cebador 4-39 mvaSR BamHI

5'-TTTGGATCCTTAGTTTCGATAAGAGCGAACGG - 3'

20

SEC ID Nº: 15

Cebador 67-1A-C para la amplificación por PCR de la secuencia codificante del gen dxs

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

25

SEC ID Nº: 16

Cebador 67-1B-C para la amplificación por PCR de la secuencia codificante del gen dxs

5'- TGA TGG TAC CTT ATG CCA GCC AGG CCT TGA TTT TGG C -3'

SEC ID Nº: 17

Cebador 67-1 C-C para la amplificación por PCR de la secuencia codificante del gen dxr

5'- ACT AGG TAC CAG GAG GAA TAA ATG AAG CAA CTC ACC ATT CTG GGC -3'

30

SEC ID Nº: 18

Cebador 67-1D-C para la amplificación por PCR de la secuencia codificante del gen dxr

5'- AAT TGA TGG GCC CTC AGC TTG CGA GAC GCA TCA CCT C -3'

35

SEC ID Nº: 19

Cebador 67-1E-C para la amplificación por PCR de la secuencia codificante del gen ispD

5'- CAT AAA GGG CCC AGG AGG AAT AAA TGG CAA CCA CTC ATT TGG ATG -3'

40

SEC ID Nº: 20

Cebador 67-1 F-C para la amplificación por PCR de la secuencia codificante del gen ispD

5'- TAT TGT TCA TAT GTT ATG TAT TCT CCT GAT GGA TGG TTC G -3'

45

SEC ID Nº: 21

Cebador 67-1G-C para la amplificación por PCR de la secuencia codificante del gen ispE

5'- AAC TAA CAC ATA TGA GGA GGA ATA AAT GCG GAC ACA GTG GCC CTC -3'

SEC ID Nº: 22

Cebador 67-1H-C para la amplificación por PCR de la secuencia codificante del gen ispE

5'- TOT TAG TTA CGC GTT TAA AGC ATG GCT CTG TGC AAT GG -3'

50

SEC ID Nº: 23

Cebador 67-2A-C para la amplificación por PCR de la secuencia codificante del gen ispF

5'- ACG GGA TCC AGG AGG AAT AAA TGC GAA TTG GAC ACG GTT TTG ACG -3'

55

SEC ID Nº: 24

Cebador 67-2B-C para la amplificación por PCR de la secuencia codificante del gen ispF

5'- TTT AGT TGG GCC CTC ATT TTG TTG CCT TAA TGA GTA GCG CC -3'

60

SEC ID Nº: 25

Cebador 67-2C-C para la amplificación por PCR de la secuencia codificante del gen ispG

5'- TAC TAA GGG CCC AGG AGG AAA TAA TGC ATA ACC AGG CTC CAA TTC
AAC G -3'

5

SEC ID Nº: 26.

Cebador 67-2D-C para la amplificación por PCR de la secuencia codificante del gen ispG

5'- TCC GGG TAC CTT ATT TTT CAA CCT GCT GAA CGT CAA TTC G -3'

10

SEC ID Nº: 27

Cebador 67-2E-C para la amplificación por PCR de la secuencia codificante del gen ispH

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

SEC ID Nº: 28

Cebador 67-2F-C para la amplificación por PCR de la secuencia codificante del gen ispH

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

15

SEC ID Nº: 29

Cebador 67-2G-C para la amplificación por PCR de la secuencia codificante del gen idi

20

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

SEC ID Nº: 30

Cebador 67-2H-C para la amplificación por PCR de la secuencia codificante del gen idi

25

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

SEC ID Nº: 31

Cebador 67-2I-C para la amplificación por PCR de la secuencia codificante del gen ispA

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

30

SEC ID Nº: 32

Cebador 67-2J-C para la amplificación por PCR de la secuencia codificante del gen ispA

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

35

SEC ID Nº: 33

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

5'- ACATAGACGTGGGAAAGCGAGGATCTAGGTAGGG -3'

SEC ID Nº: 34

Cebador 9-156B para la amplificación por PCR de locus *par* de RK2

40

5'- TTCCCGCTCGAGGTGGCGGACCATATAGGCAGATCAG -3'

SEC ID Nº: 35

Cebador 19-137 cml-pAM37-AS

45

5' - GACGTCGATATCTGGCGAAAATG - 3'

SEC ID Nº: 36

Cebador 19-137 cm1-pAM37-S

50

5'- TACTAGTGCTTGGATTCTCACC - 3'

SEC ID Nº: 37

Cebador par la amplificación por PCR de una secuencia de nucleótidos que codifica una β -farneseno sintasa

5'-CCATGGACACTCTGCCGATCTCTCCGTAAGC-3'

55

SEC ID Nº: 38

Cebador par la amplificación por PCR de una secuencia de nucleótidos que codifica una β -farneseno sintasa

5'-GAGCTCTCATACGACCATAGGGTGTACG-3'

SEC ID Nº: 39

Cebador par la amplificación por PCR de una secuencia de nucleótidos que codifica una α -farneseno sintasa

60

5'-CCATGGACCTGGCAGTAGAAATTGC-3'

SEC ID Nº: 40

Cebador par la amplificación por PCR de una secuencia de nucleótidos que codifica una α -farneseno sintasa
5'-GAGCTCTTACATCGGTACCGGCTCCAG-3'

5

SEC ID Nº: 41

Operón *atoB*(opt):*HMGS*(opt):*mvaA*

ATGAAGAACTGTGTGATTGTTTCTGCGGTCCGCACGGCGATCGGCAGCTTTAACG
GCTCTTTAGCGAGCACCTCTGCAATCGATCTGGGTGCGACGGTCATTAAGGCCGC
CATTGAACGCGCCAAAATCGACAGCCAGCACGTTGATGAGGTGATCATGGGCAA
TGTGTTACAAGCCGGCCTGGGTCAAAACCCAGCGCGTCAAGCACTGTTAAAATCT
GGTCTGGCCGAGACCGTGTGTGGCTTCACCGTCAATAAGGTTTGCGGCTCTGGCC
TGAAGAGCGTGGCCCTGGCAGCACAAAGCGATTCAAGCCGGTCAGGCACAAAGCA
TCGTTGCGGGTGGCATGGAGAACATGTCTCTGGCGCCGTA CTTATTAGATGCCAA
AGCCCGCAGCGGTTATCGCCTGGGCGATGGTCAGGTGTACGACGTCATCTTACGC
GATGGCTTAATGTGCGCGACCCACGGTTACCACATGGGTATTACGCCCGAAAAC
GTGGCGAAAGAATACGGCATTACGCGCGAGATGCAGGATGAATTAGCACTGCAC
TCTCAGCGCAAAGCAGCAGCCGCGATCGAGTCTGGTGCCTTTACGGCGGAAATC
GTGCCAGTTAACGTGGTCACGCGCAAGAAGACGTTTCGTTTTACGCCAGGACGAG
TTCCCGAAGGCAAACAGCACCCGCGGAGGCCTTAGGTGCCTTACGCCCAGCCTTTG
ACAAAGCGGGCACGGTCACCGCCGGTAATGCGAGCGGCATCAATGATGGTGCAG
CGGCACTGGTCATCATGGAAGAGAGCGCCGCATTAGCAGCGGGTCTGACCCCAT
TAGCGCGCATTAAATCTTATGCCAGCGGCGGCGTCCCACCAGCCCTGATGGGCAT
GGGTCCGGTCCCAGCCACGCAAAAAGCCCTGCAATTAGCGGGCCTGCAACTGGC
CGACATTGATCTGATCGAGGCGAACGAGGCGTTTGCAGCGCAGTTCCTGGCGGT
GGGTAAGAATCTGGGCTTCGACAGCGAGAAAGTCAATGTGAACGGTGGCGCGAT
TGCGTTAGGCCATCCGATTGGTGCAAGCGGCGCACGCATCTTAGTGACGTTACTG
CACGCCATGCAGGCACGCGACAAGACCTTAGGCCTGGCGACCTTATGTATTGGTG
GCGGTCAAGGTATCGCCATGGTGATCGAACGCCTGAACTGAAGATCTAGGAGGA
AAGCAAAATGAACTGAGCACCAAGCTGTGCTGGTGTGGCATCAAGGGTCGCCT
GCGCCCAAAAAGCAGCAACAGCTGCACAACACGAACCTGCAATGACCGAGCT

GAAAAAGCAGAAGACGGCCGAGCAAAAGACCCGCCCGCAGAACGTTGGCATCA
 AGGGCATCCAGATTTATATCCCGACGCAGTGTGTCAACCAATCTGAGCTGGAGA
 AATTCGATGGCGTCAGCCAGGGTAAGTACACCATCGGCCTGGGCCAGACCAACA
 TGAGCTTCGTGAACGACCGTGAGGACATCTATTCTATGAGCCTGACGGTGCTGTC
 TAAGCTGATCAAGAGCTACAACATCGACACGAATAAGATCGGTCGTCTGGAGGT
 GGGTACGGAGACGCTGATTGACAAGAGCAAAAGCGTGAAGTCTGTCTTAATGCA
 GCTGTTCCGGCGAGAACACGGATGTTCGAGGGTATCGACACCCTGAACGCGTGTTA
 CGGCGGCACCAACGCACTGTTCAATAGCCTGAACTGGATTGAGAGCAACGCCTG
 GGATGGCCGCGATGCGATCGTTCGTGTGCGGCGATATCGCCATCTATGACAAGGG
 TGCGGCACGTCCGACCGGCGGTGCAGGCACCGTTGCGATGTGGATTGGCCCGGA
 CGCACCAATTGTCTTCGATTCTGTCCGCGCGTCTTACATGGAGCACGCCTACGAC
 TTTTACAAGCCGGACTTCACGAGCGAATACCCGTACGTGGACGGCCACTTCTCTC
 TGACCTGCTATGTGAAGGCGCTGGACCAGGTTTATAAGTCTTATAGCAAAAAGGC
 GATTTCTAAGGGCCTGGTCAGCGACCCGGCAGGCAGCGACGCCCTGAACGTGCT
 GAAGTATTTTCGACTACAACGTGTTCCATGTCCCGACCTGCAAATTAGTGACCAAA
 TCTTATGGCCGCCTGTTATATAATGATTTCCGTGCCAACCCGCAGCTGTTCCCGGA
 GGTTGACGCCGAGCTGGCGACGCGTGATTACGACGAGAGCCTGACCGACAAGAA
 CATCGAGAAGACCTTCGTCAACGTTCGCGAAGCCGTTCCACAAAGAGCGTGTGGC
 CCAAAGCCTGATCGTCCCGACCAACACGGGCAACATGTATACCGCGTCTGTCTAC
 GCGGCATTCCGCGAGCCTGCTGAATTACGTTCGGTTCTGACGACCTGCAGGGCAAGC
 GCGTTGGCCTGTTTACGCTACGGTAGCGGCTTAGCGGCCAGCCTGTATAGCTGCAA
 AATTGTTCGGCGACGTCCAGCACATCATCAAGGAGCTGGACATCACCACAAGCT
 GGCGAAGCGCATCACCGAGACGCCGAAAGATTACGAGGCAGCGATCGAGTTACG
 CGAGAATGCGCATCTGAAGAAGAACTTCAAGCCGCAAGGTAGCATCGAGCACCT
 GCAGAGCGGCGTCTACTACCTGACGAACATTGACGACAAGTTCCGCCGTTCTTAT
 GACGTCAAAAAGTAACTAGTAGGAGGAAAACATCATGCAAAGTTTAGATAAGAA
 TTTCCGACATTTATCTCGTCAACAAAAGTTACAACAATTGGTAGATAAGCAATGG
 TTATCAGAAGATCAATTCGACATTTTATTGAATCATCCATTAATTGATGAGGAAG
 TAGCAAATAGTTTAATTGAAAATGTCATCGCGCAAGGTGCATTACCCGTTGGATT
 ATTACCGAATATCATTGTGGACGATAAGGCATATGTTGTACCTATGATGGTGGAA
 GAGCCTTCAGTTGTCGCTGCAGCTAGTTATGGTGCAAAGCTAGTGAATCAGACTG
 GCGGATTTAAAACGGTATCTTCTGAACGTATTATGATAGGTCAAATCGTCTTTGA
 TGGCGTTGACGATACTGAAAAATTATCAGCAGACATTAAAGCTTTAGAAAAGCA
 AATTCATAAAATTGCGGATGAGGCATATCCTTCTATTAAAGCGCGTGGTGGTGGT

TACCAACGTATAGCTATTGATACATTTCTGAGCAACAGTTACTATCTTTAAAAG
TATTTGTTGATACGAAAGATGCTATGGGCGCTAATATGCTTAATACGATTTTAGA
GGCCATAACTGCATTTTTTAAAAAATGAATCTCCACAAAGCGACATTTTAATGAGT
ATTTTATCCAATCATGCAACAGCGTCCGTTGTTAAAGTTCAAGGCGAAATTGACG
TTAAAGATTTAGCAAGGGGCGAGAGAACTGGAGAAGAGGTTGCCAAACGAATG
GAACGTGCTTCTGTATTGGCACAAGTTGATATTCATCGTGCTGCAACACATAATA
AAGGTGTTATGAATGGCATAACATGCCGTTGTTTTAGCAACAGGAAATGATACGCG
TGGTGCAGAAGCAAGTGCGCATGCATACGCGAGTCGTGACGGACAGTATCGTGG
TATTGCAACATGGAGATACGATCAAAAACGTCAACGTTTAATTGGTACAATAGA
AGTGCCTATGACATTGGCAATCGTTGGCGGTGGTACAAAAGTATTACCAATTGCT
AAAGCTTCTTTAGAATTGCTAAATGTAGATTACAGCACAGAATTAGGTCATGTAG
TTGCTGCCGTTGGTTTAGCACAGAACTTTGCAGCATGTGCGCGCTCGTTTCCGA
AGGTATCCAGCAAGGCCATATGAGCTTGCAATATAAATCTTTAGCTATTGTTGTA
GGTGCAAAAGGTGATGAAATTGCGCAAGTAGCTGAAGCATTGAAGCAAGAACCC
CGTGCGAATACACAAGTAGCTGAACGCATTTTACAAGAAATTAGACAACAATAG

SEC ID Nº: 42

Operón atoB(opt):mvaS(opt): mvaA

5

ATGAAGAAGTGTGTGATTGTTTCTGCGGTCCGCACGGCGATCGGCAGCTTTAACG
GCTCTTTAGCGAGCACCTCTGCAATCGATCTGGGTGCGACGGTCATTAAGGCCGC
CATTGAACGCGCCAAAATCGACAGCCAGCACGTTGATGAGGTGATCATGGGCAA
TGTGTTACAAGCCGGCCTGGGTCAAAACCCAGCGCGTCAAGCACTGTTAAAATCT
GGTCTGGCCGAGACCGTGTGTGGCTTCACCGTCAATAAGGTTTGCGGCTCTGGCC
TGAAGAGCGTGGCCCTGGCAGCACAAAGCGATTCAAGCCGGTCAGGCACAAAGCA
TCGTTGCGGGTGGCATGGAGAACATGTCTCTGGCGCCGTACTTATTAGATGCCAA
AGCCCGCAGCGGTTATCGCCTGGGCGATGGTCAGGTGTACGACGTCATCTTACGC
GATGGCTTAATGTGCGCGACCCACGGTTACCACATGGGTATTACGGCCGAAAAC
GTGGCGAAAGAATACGGCATTACGCGCGAGATGCAGGATGAATTAGCACTGCAC
TCTCAGCGCAAAGCAGCAGCCGCGATCGAGTCTGGTGCGTTTACGGCGGAAATC
GTGCCAGTTAACGTGGTCACGCGCAAGAAGACGTTTCGTTTTACGCCAGGACGAG
TTCCCGAAGGCCAAACAGCACCGCGGAGGCCTTAGGTGCCTTACGCCAGCCTTTG
ACAAAGCGGGCACGGTCACCGCCGGTAATGCGAGCGGCATCAATGATGGTGCAG
CGGCACTGGTCATCATGGAAGAGAGCGCCGCATTAGCAGCGGGTCTGACCCCAT
TAGCGCGCATTAAATCTTATGCCAGCGGCGGCGTCCCACCAGCCCTGATGGGCAT

GGGTCCGGTCCCAGCCACGCAAAAAGCCCTGCAATTAGCGGGCCTGCAACTGGC
 CGACATTGATCTGATCGAGGCGAACGAGGCGTTTGCAGCGCAGTTCCTGGCGGT
 GGGTAAGAATCTGGGCTTCGACAGCGAGAAAGTCAATGTGAACGGTGGCGCGAT
 TCGGTTAGGCCATCCGATTGGTGCAAGCGGCGCACGCATCTTAGTGACGTTACTG
 CACGCCATGCAGGCACGCGACAAGACCTTAGGCCTGGCGACCTTATGTATTGGTG
 GCGGTCAAGGTATCGCCATGGTGATCGAACGCCTGAACTGAAGATCTAGGAGGA
 AAGCAAAATGACAATAGGTATCGACAAAATAAACTTTTACGTTCCAAAGTACTA
 TGTAGACATGGCTAAATTAGCAGAAGCACGCCAAGTAGACCCAAACAAATTTTT
 AATTGGAATTGGTCAAACCTGAAATGGCTGTTAGTCCTGTAAACCAAGACATCGTT
 TCAATGGGCGCTAACGCTGCTAAGGACATTATAACAGACGAAGATAAAAAGAAA
 ATTGGTATGGTAATTGTGGCAACTGAATCAGCAGTTGATGCTGCTAAAGCAGCCG
 CTGTTCAAATTCACAACTTATTAGGTATTCAACCTTTTGCACGTTGCTTTGAAATG
 AAAGAAGCTTGTTATGCTGCAACACCAGCAATTCAATTAGCTAAAGATTATTTAG
 CAACTAGACCGAATGAAAAAGTATTAGTTATTGCTACAGATACAGCACGTTATG
 GATTGAATTCAGGCGGCGAGCCAACACAAGGTGCTGGCGCAGTTGCGATGGTTA
 TTGCACATAATCCAAGCATTTTGGCATTAAATGAAGATGCTGTTGCTTACACTGA
 AGACGTTTATGATTTCTGGCGTCCAACCTGGACATAAATATCCATTAGTTGATGGT
 GCATTATCTAAAGATGCTTATATCCGCTCATTCCAACAAAGCTGGAATGAATACG
 CAAAACGTCAAGGTAAGTCGCTAGCTGACTTCGCATCTCTATGCTTCCATGTTCC
 ATTTACAAAAATGGGTAAAAAGGCATTAGAGTCAATCATTGATAACGCTGATGA
 AACAACTCAAGAGCGTTTACGTTTCAGGATATGAAGATGCTGTAGATTATAACCGT
 TATGTCGGTAATATTTATACTGGATCATTATATTTAAGCCTAATATCATTACTTGA
 AAATCGTGATTTACAAGCTGGTGAAACAATCGGTTTATTTCAGTTATGGCTCAGGT
 TCAGTTGGTGAATTTTATAGTGCGACATTAGTTGAAGGCTACAAAGATCATTTAG
 ATCAAGCTGCACATAAAGCATTATTAATAACCGTACTGAAGTATCTGTTGATGC
 ATATGAAACATTCTTCAAACGTTTTGATGACGTTGAATTTGACGAAGAACAAGAT
 GCTGTTTCATGAAGATCGTCATATTTTCTACTTATCAAATATTGAAAATAACGTTCC
 CGAATATCACAGACCAGAGTAAGTAGTAGGAGGAAAACATCATGCAAAGTTTAG
 ATAAGAATTTCCGACATTTATCTCGTCAACAAAAGTTACAACAATTGGTAGATAA
 GCAATGGTTATCAGAAGATCAATTGACATTTTATTGAATCATCCATTAATTGAT
 GAGGAAGTAGCAAATAGTTTAATTGAAAATGTCATCGCGCAAGGTGCATTACCC
 GTTGGATTATTACCGAATATCATTGTGGACGATAAGGCATATGTTGTACCTATGA
 TGGTGGAAGAGCCTTCAGTTGTCGCTGCAGCTAGTTATGGTGCAAAGCTAGTGAA
 TCAGACTGGCGGATTTAAAACGGTATCTTCTGAACGTATTATGATAGGTCAAATC

GTCTTTGATGGCGTTGACGATACTGAAAAATTATCAGCAGACATTAAAGCTTTAG
AAAAGCAAATTCATAAAATTGCGGATGAGGCATATCCTTCTATTAAAGCGCGTG
GTGGTGGTTACCAACGTATAGCTATTGATACATTTCTGAGCAACAGTTACTATC
TTTAAAAGTATTTGTTGATACGAAAGATGCTATGGGCGCTAATATGCTTAATACG
ATTTTAGAGGCCATAACTGCATTTTTTAAAAAATGAATCTCCACAAAGCGACATTT
TAATGAGTATTTTATCCAATCATGCAACAGCGTCCGTTGTTAAAGTTCAAGGCGA
AATTGACGTTAAAGATTTAGCAAGGGGCGAGAGAACTGGAGAAGAGGTTGCCAA
ACGAATGGAACGTGCTTCTGTATTGGCACAAGTTGATATTTCATCGTGCTGCAACA
CATAATAAAGGTGTTATGAATGGCATAACATGCCGTTGTTTTAGCAACAGGAAATG
ATACGCGTGGTGCAGAAGCAAGTGCAGCATGCATACGCGAGTCGTGACGGACAGT
ATCGTGGTATTGCAACATGGAGATACGATCAAAAACGTCAACGTTTAATTGGTAC
AATAGAAGTGCCTATGACATTGGCAATCGTTGGCGGTGGTACAAAAGTATTACC
AATTGCTAAAGCTTCTTTAGAATTGCTAAATGTAGATTCAGCACAAGAATTAGGT
CATGTAGTTGCTGCCGTTGGTTTTAGCACAGAACTTTGCAGCATGTCGCGCGCTCG
TTTCCGAAGGTATCCAGCAAGGCCATATGAGCTTGCAATATAAATCTTTAGCTAT
TGTGTAGGTGCAAAAGGTGATGAAATTGCGCAAGTAGCTGAAGCATTGAAGCA
AGAACCCCGTGCGAATACACAAGTAGCTGAACGCATTTTACAAGAAATTAGACA
ACAATAG

SEC ID Nº: 43

Promotor ERG9 reemplazado con MET3 región KANMX-ERG9 de pAM328 (excluyendo la estructura del vector)

5

CAATACCGACTTACCATCCTATTTGCTTTGCCCTTTTTCTTTTCCACTGCATGGCG
GCGTTAGTATCGAATGGATGGCGGCGTTAGTATCGAATCGACAGCAGTATAGCG
ACCAGCATTACATACGATTGACGCATGATATTACTTTCTGCGCACTTAACTTCG
CATCTGGGCAGATGATGTCGAGGCGAAAAAAATATAAATCACGCTAACATTTG
ATTAAAATAGAACAACTACAATATAAAAAAACTATACAAATGACAAGTTCTTGA
AAACAAGAATCTTTTTATTGTCAGTACTGATTAGAAAACTCATCGAGCATCAAA
TGAAACTGCAATTTATTCATATCAGGATTATCAATACCATATTTTTGAAAAAGCC
GTTTCTGTAATGAAGGAGAAAACTCACCGAGGCAGTTCCATAGGATGGCAAGAT
CCTGGTATCGGTCTGCGATTCCGACTCGTCCAACATCAATACAACCTATTAATTTT
CCCTCGTCAAAAATAAGGTTATCAAGTGAGAAATCACCATGAGTGACGACTGAA
TCCGGTGAGAATGGCAAAAGCTTATGCATTTCTTTCCAGACTTGTTCAACAGGCC
AGCCATTACGCTCGTCATCAAAATCACTCGCATCAACCAAACCGTTATTCATTCCG
TGATTGCGCCTGAGCGAGACGAAATACGCGATCGCTGTAAAAGGACAATTACA

AACAGGAATCGAATGCAACCGGCGCAGGAACACTGCCAGCGCATCAACAATATT
 TTCACCTGAATCAGGATATTCTTCTAATACTGGAATGCTGTTTTGCCGGGGATC
 GCAGTGGTGAGTAACCATGCATCATCAGGAGTACGGATAAAATGCTTGATGGTC
 GGAAGAGGCATAAATTCGGTCAGCCAGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGTAACAT
 CATTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTTTCAGAAACAACCTCTGGCGCATCGGGCTT
 CCCATACAATCGATAGATTGTGCGCACCTGATTGCCCCGACATTATCGCGAGCCCAT
 TTATACCCATATAAATCAGCATCCATGTTGGAATTTAATCGCGGCCTCGAAACGT
 GAGTCTTTTCCTTACCCATGGTTGTTTATGTTTCGGATGTGATGTGAGAACTGTATC
 CTAGCAAGATTTTAAAAGGAAGTATATGAAAGAAGAACCCTCAGTGGCAAATCCT
 AACCTTTTATATTTCTCTACAGGGGCGCGGGCGTGGGGACAATTCAACGCGTCTGT
 GAGGGGAGCGTTTCCCTGCTCGCAGGTCTGCAGCGAGGAGCCGTAATTTTGTCTT
 CGCGCCGTGCGGCCATCAAAATGTATGGATGCAAATGATTATACATGGGGATGT
 ATGGGCTAAATGTACGGGCGACAGTCACATCATGCCCCTGAGCTGCGCACGTCA
 AGACTGTCAAGGAGGGTATTCTGGGCCTCCATGTCGCTGGCCGGGTGACCCGGC
 GGGGACGAGGCAAGCTAAACAGATCTGATCTTGAAACTGAGTAAGATGCTCAGA
 ATACCCGTCAAGATAAGAGTATAATGTAGAGTAATATACCAAGTATTCAGCATAT
 TCTCCTCTTCTTTTGTATAAATCACGGAAGGGATGATTTATAAGAAAAATGAATA
 CTATTACACTTCATTTACCACCCTCTGATCTAGATTTTCCAACGATATGTACGTAG
 TGGTATAAGGTGAGGGGGTCCACAGATATAACATCGTTTAATTTAGTACTAACAG
 AGACTTTTGTACAACTACATATAAGTGTACAAATATAGTACAGATATGACACAC
 TTGTAGCGCCAACGCGCATCCTACGGATTGCTGACAGAAAAAAGGTCACGTGA
 CCAGAAAAGTCACGTGTAATTTTGTAACTCACCGCATTCTAGCGGTCCCTGTCGT
 GCACACTGCACTCAACACCATAAACCTTAGCAACCTCCAAAGGAAATCACCGTA
 TAACAAAGCCACAGTTTACAACCTTAGTCTCTTATGAAGTTACTTACCAATGAGA
 AATAGAGGCTCTTTCTCGAGAAATATGAATATGGATATATATATATATATATA
 TATATATATATATATGTAACTTGGTTCTTTTTTAGCTTGTGATCTCTAGCTTGGG
 TCTCTCTGTGCGTAACAGTTGTGATATCGGCTGCCTTCATCTCGACCGGATGCAA
 TGCCAATTGTAATAGCTTTCCCATGTTAATTATACTTTATTCTT

SEC ID N°: 44

GAGTGAACCTGCTGCCTGGCGTGCTCTGACTCAGTACATTTCATAGTGGATGGCG
 GCGTTAGTATC

5

SEC ID N°: 45

CGTGTATACGTTTTCCGCTTCTGCTCTTCGTCTTTTCTCTTCTCCGATATCACAAAC
 TGTTACGA

10

SEC ID Nº: 46

GGTAAGACGGTTGGGTTTTATCTTTTGCAGTTGGTACTATTAAGAACAATCACAG
GAAACAGCTATGACC

5 SEC ID Nº: 47

TTGCGTTTTGTACTTTGGTTCGCTCAATTTTGCAGGTAGATAATCGAAAAGTTGTA
AAACGACGGCCAGT

SEC ID Nº: 48

10 Secuencia de pAM491 (excluyendo la estructura del vector)

GTTTAAACTTGCTAAATTCGAGTGAAACACAGGAAGACCAGAAAATCCTCATTTC
ATCCATATTAACAATAATTTCAAATGTTTATTTGCATTATTTGAAACTAGGGAAG
ACAAGCAACGAAACGTTTTGAAAATTTTGAGTATTTTCAATAAATTTGTAGAGGA
CTCAGATATTGAAAAAAAGCTACAGCAATTAATACTTGATAAGAAGAGTATTGA
GAAGGGCAACGGTTCATCATCTCATGGATCTGCACATGAACAAACACCAGAGTC
AAACGACGTTGAAATTGAGGCTACTGCGCCAATTGATGACAATACAGACGATGA
TAACAAACCGAAGTTATCTGATGTAGAAAAGGATTAAAGATGCTAAGAGATAGT
GATGATATTTCATAAATAATGTAATTCTATATATGTTAATTACCTTTTTTTCGAGG
CATATTTATGGTGAAGGATAAGTTTTGACCATCAAAGAAGGTTAATGTGGCTGTG
GTTTCAGGGTCCATACCCGGGAGTTATGACAATTACAACAACAGAATTCTTTCTA
TATATGCACGAACCTTGTAATATGGAAGAAATTATGACGTACAACTATAAAGTA
AATATTTTACGTAACACATGGTGCTGTTGTGCTTCTTTTTCAAGAGAATACCAATG
ACGTATGACTAAGTTTAGGATTTAATGCAGGTGACGGACCCATCTTTCAAACGAT
TTATATCAGTGGCGTCCAAATTGTTAGGTTTTGTTGGTTCAGCAGGTTTCCTGTTG
TGGGTCATATGACTTTGAACCAAATGGCCGGCTGCTAGGGCAGCACATAAGGAT
AATTCACCTGCCAAGACGGCACAGGCAACTATTCTTGCTAATTGACGTGCGTTGG
TACCAGGAGCGGTAGCATGTGGGCCTCTTACACCTAATAAGTCCAACATGGCACC
TTGTGTTCTAGAACAGTACCACCACCGATGGTACCTACTTCGATGGATGGCATG
GATACGGAAATTCTCAAATCACCGTCCACTTCTTTCATCAATGTTATACAGTTGG
AACTTTCGACATTTTGTGCAGGATCTTGTCTAATGCCAAGAAAACAGCTGTCAC

TAAATTAGCTGCATGTGCGTTAAATCCACCAACAGACCCAGCCATTGCAGATCCA
ACCAAATTCTTAGCAATGTTCAACTCAACCAATGCGGAAACATCACTTTTTAACA
CTTTTCTGACAACATCACCAGGAATAGTAGCTTCTGCGACGACACTCTTACCACG
ACCTTCGATCCAGTTGATGGCAGCTGGTTTTTTGTGCGGTACAGTAGTTACCAGAA
ACGGAGACAACCTCCATATCTTCCCAGCCATACTCTTCTACCATTGCTTTAATGA
GTATTCGACACCCCTTAGAAATCATATTCATACCCATTGCGTCACCAGTAGTTGTTC
TAAATCTCATGAAGAGTAAATCTCCTGCTAGACAAGTTTGAATATGTTGCAGACG
TGCAAATCTTGATGTAGAGTTAAAAGCTTTTTTAATTGCGTTTTGTCCCTCTTCTG
AGTCTAACCATATCTTACAGGCACCAGATCTTTTCAAAGTTGGGAAACGGACTAC
TGGGCCTCTTGTCATACCATCCTTAGTTAAAACAGTTGTTGCACCACCGCCAGCA
TTGATTGCCTTACAGCCACGCATGGCAGAAGCTACCAAACAACCCTCTGTAGTTG
CCATTGGTATATGATAAGATGTACCATCGATAACCAAGGGGCCTATAACACCAA
CGGGCAAAGGCATGTAACCTATAACATTTTCACAACAAGCGCCAAATACGCGGT
CGTAGTCATAATTTTTATATGGTAAACGATCAGATGCTAATACAGGAGCTTCTGC
CAAAATTGAAAGAGCCTTCCTACGTACCGCAACCGCTCTCGTAGTATCACCTAAT
TTTTCTCCAAAGCGTACAAAGGTAACCTACCGTGAATAACCAAGGCAGCGACCT
CTTTGTTCTTCAATTGTTTTGTATTTCCACTACTTAATAATGCTTCTAATTCTTCTA
AAGGACGTATTTTCTTATCCAAGCTTTCAATATCGCGGGAATCATCTTCCTCACTA
GATGATGAAGGTCCTGATGAGCTCGATTGCGCAGATGATAAACTTTTGACTTTTCG
ATCCAGAAATGACTGTTTTATTGGTTAAAACCTGGTGTAGAAGCCTTTTGACAGG
AGCAGTAAAAGACTTCTTGGTGACTTCAGTCTTCACCAATTGGTCTGCAGCCATT
ATAGTTTTTTCTCCTTGACGTTAAAGTATAGAGGTATATTAACAATTTTTTGTGA
TACTTTTATGACATTTGAATAAGAAGTAATACAAACCGAAAATGTTGAAAGTATT
AGTTAAAGTGTTTATGCAGCTTTTGCATTTATATATCTGTTAATAGATCAAAAAT
CATCGCTTCGCTGATTAATTACCCAGAAATAAGGCTAAAAAACTAATCGCATTA
TTATCCTATGGTTGTTAATTTGATTTCGTTGATTTGAAGGTTTGTGGGGCCAGGTTA
CTGCCAATTTTTCTCCTTTCATAACCATAAAAGCTAGTATTGTAGAATCTTTATTGT
TCGGAGCAGTGCGGCGCGAGGCACATCTGCGTTTCAGGAACGCGACCGGTGAAG
ACCAGGACGCACGGAGGAGAGTCTTCCGTCGGAGGGCTGTGCGCCCGCTCGGCGG
CTTCTAATCCGTACTTCAATATAGCAATGAGCAGTTAAGCGTATTACTGAAAGTT
CCAAAGAGAAGGTTTTTTTAGGCTAAGATAATGGGGCTCTTTACATTTCCACAAC
ATATAAGTAAGATTAGATATGGATATGTATATGGTGGTATTGCCATGTAATATGA
TTATTAAACTTCTTTGCGTCCATCCAAAAAAAAGTAAGAATTTTTGAAAATTCA
ATATAAATGAAACTCTCAACTAACTTTGTTGGTGTGGTATTAAAGGAAGACTTA

GGCCGCAAAAGCAACAACAATTACACAATACAACTTGCAAATGACTGAACTAA
 AAAAACAAAAGACCGCTGAACAAAAAACAGACCTCAAAATGTCTGGTATTAAAG
 GTATCCAAATTTACATCCCAACTCAATGTGTCAACCAATCTGAGCTAGAGAAATT
 TGATGGCGTTTCTCAAGGTAAATACACAATTGGTCTGGGCCAAACCAACATGTCT
 TTTGTCAATGACAGAGAAGATATCTACTCGATGTCCCTAACTGTTTTGTCTAAGTT
 GATCAAGAGTTACAACATCGACACCAACAAAATTGGTAGATTAGAAGTCGGTAC
 TGAAACTCTGATTGACAAGTCCAAGTCTGTCAAGTCTGTCTTGATGCAATTGTTT
 GGTGAAAACACTGACGTCGAAGGTATTGACACGCTTAATGCCTGTTACGGTGGTA
 CCAACGCGTTGTTCAACTCTTTGAACTGGATTGAATCTAACGCATGGGATGGTAG
 AGACGCCATTGTAGTTTGCGGTGATATTGCCATCTACGATAAGGGTGCCGCAAGA
 CCAACCGGTGGTGCCGGTACTGTTGCTATGTGGATCGGTCCTGATGCTCCAATTG
 TATTTGACTCTGTAAGAGCTTCTTACATGGAACACGCCTACGATTTTTACAAGCC
 AGATTTCAACCAGCGAATATCCTTACGTCGATGGTCATTTTTTCATTAAGTTGTTACG
 TCAAGGCTCTTGATCAAGTTTACAAGAGTTATTCCAAGAAGGCTATTTCTAAAGG
 GTTGGTTAGCGATCCCGCTGGTTTCGGATGCTTTGAACGTTTTGAAATATTTGACT
 ACAACGTTTTCCATGTTCCAACCTGTAAATTGGTCACAAAATCATACGGTAGATT
 ACTATATAACGATTTTCAAGCCAATCCTCAATTGTTCCCAGAAGTTGACGCCGAA
 TTAGCTACTCGCGATTATGACGAATCTTTAACCGATAAGAACATTGAAAAAACTT
 TTGTTAATGTTGCTAAGCCATTCCACAAAGAGAGAGTTGCCCAATCTTTGATTGT
 TCCAACAAACACAGGTAACATGTACACCGCATCTGTTTATGCCGCTTTGCATCT
 CTATTAACTATGTTGGATCTGACGACTTACAAGGCAAGCGTGTTGGTTTATTTTC
 TTACGGTTCCGGTTTAGCTGCATCTCTATATTCTTGCAAAATTGTTGGTGACGTCC
 AACATATTATCAAGGAATTAGATATTACTAACAAATTAGCCAAGAGAATCACCG
 AAACTCCAAAGGATTACGAAGCTGCCATCGAATTGAGAGAAAATGCCCATTTGA
 AGAAGAACTTCAAACCTCAAGGTTCCATTGAGCATTGCAAAGTGTTGTTTACTA
 CTTGACCAACATCGATGACAAATTTAGAAGATCTTACGATGTTAAAAAATAATCT
 TCCCCCATCGATTGCATCTTGCTGAACCCCTTCATAAATGCTTTATTTTTTTGGC
 AGCCTGCTTTTTTTTAGCTCTCATTTAATAGAGTAGTTTTTTAATCTATATACTAGG
 AAAACTCTTTATTTAATAACAATGATATATATATACCCGGGAAGCTTTTCAATTC
 ATCTTTTTTTTTTTTGTCTTTTTTTTIGATTCCGGTTTCTTTGAAATTTTTTTGATTC
 GGTAATCTCCGAGCAGAAGGAAGAACGAAGGAAGGAGCACAGACTTAGATTGG
 TATATATACGCATATGTGGTGTTGAAGAAACATGAAATTGCCCAGTATTCTTAAC
 CCAACTGCACAGAACAAAAACCTGCAGGAAACGAAGATAAATCATGTGCGAAAGC
 TACATATAAGGAACGTGCTGCTACTCATCCTAGTCCTGTTGCTGCCAAGCTATTT

AATATCATGCACGAAAAGCAAACAAACTTGTGTGCTTCATTGGATGTTTCGTACCA
CCAAGGAATTACTGGAGTTAGTTGAAGCATTAGGTCCCAAAATTTGTTTACTAAA
AACACATGTGGATATCTTGACTGATTTTTCCATGGAGGGCACAGTTAAGCCGCTA
AAGGCATTATCCGCCAAGTACAATTTTTACTCTTCGAAGACAGAAAATTTGCTG
ACATTGGTAATACAGTCAAATTGCAGTACTCTGCGGGTGTATACAGAATAGCAG
AATGGGCAGACATTACGAATGCACACGGTGTGGTGGGCCAGGTATTGTTAGCG
GTTTGAAGCAGGCGGCGGAAGAAGTAACAAAGGAACCTAGAGGCCCTTTTGATGT
TAGCAGAATTGTCATGCAAGGGCTCCCTAGCTACTGGAGAATATACTAAGGGTA
CTGTTGACATTGCGAAGAGCGACAAAGATTTTGTTATCGGCTTTATTGCTCAAAG
AGACATGGGTGGAAGAGATGAAGGTTACGATTGGTTGATTATGACACCCGGTGT
GGGTTTAGATGACAAGGGAGACGCATTGGGTCAACAGTATAGAACCGTGGATGA
TGTGGTCTCTACAGGATCTGACATTATTATTGTTGGGTTTAAAC

SEQ ID, NO: 49

Secuencia de pAM492 (excluyendo la estructura del vector)

5

GTTTAAACTTGCTAAATTCGAGTGAAACACAGGAAGACCAGAAAATCCTCATTTC
ATCCATATTAACAATAATTTCAAATGTTTATTTGCATTATTTGAAACTAGGGAAG
ACAAGCAACGAAACGTTTTTGAAAATTTTGAGTATTTTCAATAAATTTGTAGAGG
ACTCAGATATTGAAAAAAGCTACAGCAATTAATACTTGATAAGAAGAGTATTG
AGAAGGGCAACGGTTCATCATCTCATGGATCTGCACATGAACAAACACCAGAGT
CAAACGACGTTGAAATTGAGGCTACTGCGCCAATTGATGACAATACAGACGATG
ATAACAAACCGAAGTTATCTGATGTAGAAAAGGATTAAAGATGCTAAGAGATAG
TGATGATATTTTCATAAATAATGTAATTCTATATATGTTAATTACCTTTTTTGCGAG
GCATATTTATGGTGAAGGATAAGTTTTGACCATCAAAGAAGGTTAATGTGGCTGT
GGTTTCAGGGTCCATACCCGGGTATATATATATCATTGTTATTAAATAAAGAGTT
TTCCTAGTATATAGATTAAAAAACTACTCTATTAAATGAGAGCTAAAAAAAGCA
GGCTGCCAAAAAAATAAAGCATTTATGAAGGGGGTTCAGCAAGATGCAATCGAT
GGGGGAAGATTATTTTTTAACATCGTAAGATCTTCTAAATTTGTCATCGATGTTG
GTCAAGTAGTAAACACCACTTTGCAAATGCTCAATGGAACCTTGAGGTTTGAAGT
TCTTCTTCAAATGGGCATTTTCTCTCAATTCGATGGCAGCTTCGTAATCCTTTGGA
GTTTCGGTGATTCTCTTGGCTAATTTGTTAGTAATATCTAATTCCTTGATAATATG
TTGGACGTCACCAACAATTTTGCAAGAATATAGAGATGCAGCTAAACCGGAACC
GTAAGAAAATAAACCAACACGCTTGCCTTGTAAGTCGTCAGATCCAACATAGTTT
AATAGAGATGCAAAGGCGGCATAAACAGATGCGGTGTACATGTTACCTGTGTTT

GTTGGAAACAATCAAAGATTGGGCAACTCTCTCTTTGTGGAATGGCTTAGCAACAT
 TAACAAAAGTTTTTTCAATGTTCTTATCGGTTAAAGATTCGTCATAATCGCGAGT
 AGCTAATTCGGCGTCAACTTCTGGGAACAATTGAGGATTGGCTCTGAAATCGTTA
 TATAGTAATCTACCGTATGATTTTGTGACCAATTTACAGGTTGGAACATGGAAAA
 CGTTGTAGTCGAAATATTTCAAAACGTTCAAAGCATCCGAACCAGCGGGATCGCT
 AACCAACCCTTTAGAAATAGCCTTCTTGGAATAACTCTTGTAACCTTGATCAAGA
 GCCTTGACGTAACAAGTTAATGAAAAATGACCATCGACGTAAGGATATTGCTG
 GTGAAATCTGGCTTGTA AAAATCGTAGGCGTGTTCCATGTAAGAAGCTCTTACAG
 AGTCAAATACAATTGGAGCATCAGGACCGATCCACATAGCAACAGTACCGGCAC
 CACCGGTTGGTCTTGCGGCACCCTTATCGTAGATGGCAATATCACCGCAAACCTAC
 AATGGCGTCTCTACCATCCCATGCGTTAGATTCAATCCAGTTCAAAGAGTTGAAC
 AACGCGTTGGTACCACCGTAACAGGCATTAAGCGTGTCAATACCTTCGACGTCAG
 TGTTTTACCAAACAATTGCATCAAGACAGACTTGACAGACTTGGAAGTTGTCAAT
 CAGAGTTTCAGTACCGACTTCTAATCTACCAATTTTGTGGTGTGCGATGTTGTAAC
 TCTTGATCAACTTAGACAAAACAGTTAGGGACATCGAGTAGATATCTTCTCTGTC
 ATTGACAAAAGACATGTTGGTTTGGCCCAGACCAATTGTGTATTTACCTTGAGAA
 ACGCCATCAAATTTCTCTAGCTCAGATTGGTTGACACATTGAGTTGGGATGTAAA
 TTTGGATACCTTTAATACCGACATTTTGAGGTCTGGTTTTTTGTTACCGGTCTTT
 TGTTTTTTTAGTTTCAGTCATTTGCAAGTTTGTATTGTGTAATTGTTGTTGCTTTTGC
 GGCCTAAGTCTTCCTTTAATACCACACCAACAAAGTTTAGTTGAGAGTTTCATTTT
 ATGTGATGATTGATTGATTGATTGTACAGTTTGTTTTTCTTAATATCTATTTGAT
 GACTTCTATATGATATTGCACTAACAAGAAGATATTATAATGCAATTGATACAAG
 ACAAGGAGTTATTTGCTTCTCTTTTATATGATTCTGACAATCCATATTGCGTTGGT
 AGTCTTTTTTCTGGAACGGTTCAGCGGAAAAGACGCATCGCTCTTTTTGCTTCTA
 GAAGAAATGCCAGCAAAAGAATCTCTTGACAGTGACTGACAGCAAAAATGTCTT
 TTTCTAACTAGTAACAAGGCTAAGATATCAGCCTGAAATAAAGGGTGGTGAAGT
 AATAATTAAATCATCCGTATAAACCTATACACATATATGAGGAAAAATAATACA
 AAAGTGTTTTAAATACAGATACATACATGAACATATGCACGTATAGCGCCCAAAT
 GTCGGTAATGGGATCGGCTTACTAATTATAAAATGCATCATAGAAATCGTTGAAG
 TTGACGCAGCGACTCGAGATCCATAGGAGCAACTCATGTCTGAACTTCAACGATT
 TCTATGATGCATTTTATAATTAGTAAGCCGATCCCATACCGACATTTGGGCGCT
 ATACGTGCATATGTTTATGTATGTATCTGTATTTAAACACTTTTGTATTATTTT
 CCTCATATATGTGTATAGGTTTATACGGATGATTTAATTATTACTTCACCACCCTT
 TATTTACGGCTGATATCTTAGCCTTGTTACTAGTTAGAAAAAGACATTTTGTCTGT

CAGTCACTGTCAAGAGATTCTTTTGCTGGCATTCTTCTAGAAGCAAAAAGAGCG
 ATGCGTCTTTTCCGCTGAACCGTTCCAGCAAAAAGACTACCAACGCAATATGGA
 TTGTCAGAATCATATAAAAGAGAAGCAAATAACTCCTTGTCTTGTATCAATTGCA
 TTATAATATCTTCTTGTAGTGCAATATCATATAGAAGTCATCGAAATAGATATT
 AAGAAAAACAACTGTACAATCAATCAATCAATCATCACATAAAATGGCTGCAG
 ACCAATTGGTGAAGACTGAAGTCACCAAGAAGTCTTTTACTGCTCCTGTACAAAA
 GGCTTCTACACCAGTTTTAACCAATAAAACAGTCATTTCTGGATCGAAAGTCAAA
 AGTTTATCATCTGCGCAATCGAGCTCATCAGGACCTTCATCATCTAGTGAGGAAG
 ATGATTCCCGCGATATTGAAAGCTTGGATAAGAAAATACGTCCTTTAGAAGAATT
 AGAAGCATTATTAAGTAGTGGAATAACAAAACAATTGAAGAACAAAGAGGTGCG
 TGCCTTGGTTATTCACGGTAAGTTACCTTTGTACGCTTTGGAGAAAAAATTAGGT
 GATACTACGAGAGCGGTTGCGGTACGTAGGAAGGCTCTTTCAATTTTGGCAGAA
 GCTCCTGTATTAGCATCTGATCGTTTACCATATAAAAATTATGACTACGACCGCG
 TATTTGGCGCTTGTGTGAAAATGTTATAGGTTACATGCCTTTGCCCGTTGGTGT
 ATAGGCCCTTGGTTATCGATGGTACATCTTATCATATACCAATGGCAACTACAG
 AGGGTTGTTTGGTAGCTTCTGCCATGCGTGGCTGTAAGGCAATCAATGCTGGCGG
 TGGTGCAACAACCTGTTTTAACTAAGGATGGTATGACAAGAGGCCCAGTAGTCCGT
 TTCCCAACTTTGAAAAGATCTGGTGCCTGTAAGATATGGTTAGACTCAGAAGAGG
 GACAAAACGCAATTAaaaaagctTTTTAACTCTACATCAAGATTTGCACGTCTGCA
 ACATATTCAAACCTTGTCTAGCAGGAGATTTACTCTTCATGAGATTTAGAACAAC
 ACTGGTGACGCAATGGGTATGAATATGATTTCTAAGGGTGTGCAATACTCATTAA
 AGCAAATGGTAGAAGAGTATGGCTGGGAAGATATGGAGGTTGTCTCCGTTTCTG
 GTAACACTGTACCGACAAAAAACCAGCTGCCATCAACTGGATCGAAGGTGCTG
 GTAAGAGTGTGCTCGCAGAAGCTACTATTCCTGGTGATGTTGTCAGAAAAGTGTT
 AAAAAGTGATGTTTCCGCATTGGTTGAGTTGAACATTGCTAAGAATTTGGTTGGA
 TCTGCAATGGCTGGGTCTGTTGGTGGATTTAACGCACATGCAGCTAATTTAGTGA
 CAGCTGTTTTCTTGGCATTAGGACAAGATCCTGCACAAAATGTCGAAAGTTCCAA
 CTGTATAACATTGATGAAAGAAGTGGACGGTGATTGAGAATTTCCGTATCCATG
 CCATCCATCGAAGTAGGTACCATCGGTGGTGGTACTGTTCTAGAACCACAAGGTG
 CCATGTTGGACTTATTAGGTGTAAGAGGCCACATGCTACCGCTCCTGGTACCAA
 CGCACGTCAATTAGCAAGAATAGTTGCCTGTGCCGTCTTGGCAGGTGAATTATCC
 TTATGTGCTGCCCTAGCAGCCGGCCATTTGGTTCAAAGTCATATGACCCACAACA
 GGAAACCTGCTGAACCAACAAAACCTAACAATTTGGACGCCACTGATATAAATC
 GTTTGAAAGATGGGTCCGTCACCTGCATTAAATCCTAACTTAGTCATACGTCAT

TGGTATTCTCTTGAAAAAGAAGCACAAACAGCACCATGTGTTACGTAAAAATATTTA
 CTTTATAGTTTGTACGTCATAATTTCTTCCATATTACAAGTTCGTGCATATATAGA
 AAGAATTCTGTTGTTGTAATTGTCATAACTCCCGGGAAGCTTTTCAATTCATCTTT
 TTTTTTTTTGTTCTTTTTTTTTGATTCCGGTTTCTTTGAAATTTTTTTGATTCCGGTAAT
 CTCCGAGCAGAAGGAAGAACGAAGGAAGGAGCACAGACTTAGATTGGTATATAT
 ACGCATATGTGGTGTGTAAGAAACATGAAATTGCCCAGTATTCTTAACCCAACTG
 CACAGAACAAAAACCTGCAGGAAACGAAGATAAATCATGTGCAAAGCTACATAT
 AAGGAACGTGCTGCTACTCATCCTAGTCCTGTTGCTGCCAAGCTATTTAATATCA
 TGCACGAAAAGCAAACAAACTTGTGTGCTTCATTGGATGTTTCGTACCACCAAGGA
 ATTACTGGAGTTAGTTGAAGCATTAGGTCCCAAAATTTGTTTACTAAAAACACAT
 GTGGATATCTTGACTGATTTTTCCATGGAGGGGCACAGTTAAGCCGCTAAAGGCAT
 TATCCGCCAAGTACAATTTTTTACTCTTCGAAGACAGAAAATTTGCTGACATTGG
 TAATACAGTCAAATTGCAGTACTCTGCGGGTGTATACAGAATAGCAGAATGGGC
 AGACATTACGAATGCACACGGTGTGGTGGGCCCAGGTATTGTTAGCGGTTTGAA
 GCAGGCGGCGGAAGAAGTAACAAAGGAACCTAGAGGCCTTTTGATGTTAGCAGA
 ATTGTCATGCAAGGGCTCCCTAGCTACTGGAGAATATACTAAGGGTACTGTTGAC
 ATTGCGAAGAGCGACAAAGATTTTGTATCGGCTTTATTGCTCAAAGAGACATGG
 GTGGAAGAGATGAAGGTTACGATTGGTTGATTATGACACCCGGTGTGGGTTTAG
 ATGACAAGGGAGACGCATTGGGTCAACAGTATAGAACCGTGGATGATGTGGTCT
 CTACAGGATCTGACATTATTATTGTTGGGTTTAAAC

SEC ID Nº: 50

Secuencia de pAM489 (excluyendo la estructura del vector)

5

GTTTAAACTACTATTAGCTGAATTGCCACTGCTATCGTTGTTAGTGGCGTTAGTGC
 TTGCATTCAAAGACATGGAGGGCGTTATTACGCCGGAGCTCCTCGACAGCAGATC
 TGATGACTGGTCAATATATTTTTGCATTGAGGCTCTGTTTGGAATTATATTTTGA
 ATGACCCATCTAATGTACTGGTATCACCAGATTTTCATGTCTGTTTTTAAAGCGGCT
 GCTTGAGTCTTAGCAATAGCGTCACCATCTGGTGAATCCTTTGAAGGAACCACTG
 ACGAAGGTTTGGACAGTGACGAAGAGGATCTTTCCTGCTTTGAATTAGTCGCGCT
 GGGAGCAGATGACGAGTTGGTGGAGCTGGGGGCAGGATTGCTGGCCGTCGTGGG
 TCCTGAATGGGTCCTTGGCTGGTCCATCTCTATTCTGAAAACGGAAGAGGAGTAG
 GGAATATTACTGGCTGAAAATAAGTCTTGAATGAACGTATACGCGTATATTTCTA
 CCAATCTCTCAACACTGAGTAATGGTAGTTATAAGAAAGAGACCGAGTTAGGGA
 CAGTTAGAGGCGGTGGAGATATTCCTTATGGCATGTCTGCCGATGATAAACTTT

TCAAACGGCAGCCCCGATCTAAAAGAGCTGACACCCGGGAGTTATGACAATTAC
 AACAAACAGAATTCTTTCTATATATGCACGAACTTGTAATATGGAAGAAATTATGA
 CGTACAAACTATAAAAGTAAATATTTTACGTAACACATGGTGCTGTTGTGCTTCTTT
 TTCAAGAGAATACCAATGACGTATGACTAAGTTTAGGATTTAATGCAGGTGACG
 GACCCATCTTTCAAACGATTTATATCAGTGGCGTCCAAATTGTTAGGTTTTGTGG
 TTCAGCAGGTTTCCTGTTGTGGGTCATATGACTTTGAACCAAATGCCCGGCTGCT
 AGGGCAGCACATAAGGATAATTCACCTGCCAAGACGGCACAGGCAACTATTCTT
 GCTAATTGACGTGCGTTGGTACCAGGAGCGGTAGCATGTGGGCCTCTTACACCTA
 ATAAGTCCAACATGGCACCTTGTGGTTCTAGAACAGTACCACCACCGATGGTACC
 TACTTCGATGGATGGCATGGATACGGAAATTCTCAAATCACCGTCCACTTCTTTC
 ATCAATGTTATACAGTTGGAACCTTTCGACATTTTGTGCAGGATCTTGTCTAATGC
 CAAGAAAACAGCTGTCATAAATTAGCTGCATGTGCGTTAAATCCACCAACAGA
 CCCAGCCATTGCAGATCCAACCAAATTCTTAGCAATGTTCAACTCAACCAATGCG
 GAAACATCACTTTTTAACACTTTTCTGACAACATCACCAGGAATAGTAGCTTCTG
 CGACGACACTCTTACCACGACCTTCGATCCAGTTGATGGCAGCTGGTTTTTTGTC
 GGTACAGTAGTTACCAGAAACGGAGACAACCTCCATATCTTCCCAGCCATACTCT
 TCTACCATTTGCTTTAATGAGTATTCGACACCCTTAGAAATCATATTCATACCCAT
 TGCGTCACCAGTAGTTGTTCTAAATCTCATGAAGAGTAAATCTCCTGCTAGACAA
 GTTTGAATATGTTGCAGACGTGCAAATCTTGATGTAGAGTTAAAAGCTTTTTTAA
 TTGCGTTTTGTCCCTCTTCTGAGTCTAACCATATCTTACAGGCACCAGATCTTTTC
 AAAGTTGGGAAACGGACTACTGGGCCTCTTGTCATACCATCCTTAGTTAAAACAG
 TTGTTGCACCACCGCCAGCATTGATTGCCTTACAGCCACGCATGGCAGAAGCTAC
 CAAACAACCCTCTGTAGTTGCCATTGGTATATGATAAGATGTACCATCGATAACC
 AAGGGGCCTATAACACCAACGGGCAAAGGCATGTAACCTATAACATTTTCACAA
 CAAGCGCCAAATACGCGGTCGTAGTCATAATTTTTATATGGTAAACGATCAGATG
 CTAATACAGGAGCTTCTGCCAAAATTGAAAGAGCCTTCCTACGTACCGCAACCGC
 TCTCGTAGTATCACCTAATTTTTCTCCAAAGCGTACAAAGGTAACCTACCGTGA
 ATAACCAAGGCAGCGACCTCTTTGTTCTTCAATTGTTTTGTATTTCCACTACTTAA
 TAATGCTTCTAATTCTTCTAAAGGACGTATTTTCTTATCCAAGCTTTCATATCGC
 GGGAATCATCTTCCTCACTAGATGATGAAGGTCCTGATGAGCTCGATTGCGCAGA
 TGATAAACTTTTGACTTTCGATCCAGAAATGACTGTTTTATTGGTTAAAACCTGGTG
 TAGAAGCCTTTTGTACAGGAGCAGTAAAAGACTTCTTGGTGACTTCAGTCTTCAC
 CAATTGGTCTGCAGCCATTATAGTTTTTTCTCCTTGACGTTAAAGTATAGAGGTAT
 ATTAACAATTTTTTGTGATACTTTTATGACATTTGAATAAGAAGTAATACAAAC

CGAAAATGTTGAAAGTATTAGTTAAAGTGGTTATGCAGCTTTTGCATTTATATAT
 CTGTTAATAGATCAAAAATCATCGCTTCGCTGATTAATTACCCCAGAAATAAGGC
 TAAAAAACTAATCGCATTATTATCCTATGGTTGTTAATTTGATTGTTGATTGAA
 GGTTTGTGGGGGCCAGGTTACTGCCAATTTTTCTCTTCATAACCATAAAAGCTAG
 TATTGTAGAATCTTTATTGTTTCGGAGCAGTGCGGCGCGAGGCACATCTGCGTTTC
 AGGAACGCGACCGGTGAAGACCAGGACGACGAGGAGAGTCTTCCGTCGGAG
 GGCTGTCGCCCCGCTCGGCGGCTTCTAATCCGTA CTTC AATATAGCAATGAGCAGT
 TAAGCGTATTACTGAAAGTTCCAAAGAGAAGGTTTTTTTTAGGCTAAGATAATGGG
 GCTCTTTACATTTCCACAACATATAAGTAAGATTAGATATGGATATGTATATGGT
 GGTATTGCCATGTAATATGATTATTAACTTCTTTGCGTCCATCCAAAAAAAAG
 TAAGAATTTTTGAAAATTCAATATAAATGGCTTCAGAAAAAGAAATTAGGAGAG
 AGAGATTCTTGAACGTTTTCCCTAAATTAGTAGAGGAATTGAACGCATCGCTTTT
 GGCTTACGGTATGCCTAAGGAAGCATGTGACTGGTATGCCCACTCATTGAACTAC
 AACACTCCAGGCGGTAAAGCTAAATAGAGGTTTGTCCGTTGTGGACACGTATGCTA
 TTCTCTCCAACAAGACCGTTGAACAATTGGGGCAAGAAGAATACGAAAAGGTTG
 CCATTCTAGGTTGGTGCATTGAGTTGTTGCAGGCTTACTTCTTGGTCGCCGATGAT
 ATGATGGACAAGTCCATTACCAGAAGAGGCCAACCATGTTGGTACAAGGTTTCCT
 GAAGTTGGGGAAATTGCCATCAATGACGCATTTCATGTTAGAGGCTGCTATCTACA
 AGCTTTTGAAATCTCACTTCAGAAACGAAAAATACTACATAGATATCACCGAATT
 GTTCCATGAGGTCACCTTCCAAACCGAATTGGGCCAATTGATGGACTTAATCACT
 GCACCTGAAGACAAAGTCGACTTGAGTAAGTTCTCCCTAAAGAAGCACTCCTTCA
 TAGTTACTTTCAAGACTGCTTACTATTCTTTCTACTTGCCTGTTCGCATTGGCCATG
 TACGTTGCCGGTATCACGGATGAAAAGGATTTGAAACAAGCCAGAGATGTCTTG
 ATTCCATTGGGTGAATACTTCCAAATTCAAGATGACTACTTAGACTGCTTCGGTA
 CCCCAGAACAGATCGGTAAGATCGGTACAGATATCCAAGATAACAAATGTTCTT
 GGGTAATCAACAAGGCATTGGAAC TTGCTTCCGCAGAACAAAGAAAGACTTTAG
 ACGAAAATTACGGTAAGAAGGACTCAGTCGCAGAAGCCAAATGCAAAAAGATTT
 TCAATGACTTGAAAATTGAACAGCTATACCACGAATATGAAGAGTCTATTGCCAA
 GGATTTGAAGGCCAAAATTTCTCAGGTCGATGAGTCTCGTGGCTTCAAAGCTGAT
 GTCTTAACTGCGTTCTTGAACAAAGTTTACAAGAGAAGCAAATAGAACTAACGCT
 AATCGATAAAACATTAGATTTCAAAC TAGATAAGGACCATGTATAAGAACTATA
 TACTTCCAATATAATATAGTATAAGCTTTAAGATAGTATCTCTCGATCTACCGTTC
 CACGTGACTAGTCCAAGGATTTTTTTTAAACCGGGATATATGTGTACTTTGCAGTT
 ATGACGCCAGATGGCAGTAGTGGAAGATATTCTTTATTGAAAAATAGCTTGTAC

CTTACGTACAATCTTGATCCGGAGCTTTTCTTTTTTTGCCGATTAAGAATTCGGTC
 GAAAAAAGAAAAGGAGAGGGCCAAGAGGGAGGGCATTGGTGACTATTGAGCAC
 GTGAGTATACGTGATTAAGCACACAAAGGCAGCTTGGAGTATGTCTGTTATTAAT
 TTCACAGGTAGTTCTGGTCCATTGGTGAAAGTTTGCGGCTTGCAGAGCACAGAGG
 CCGCAGAATGTGCTCTAGATTCCGATGCTGACTTGCTGGGTATTATATGTGTGCC
 CAATAGAAAGAGACAATTGACCCGGTTATTGCAAGGAAAATTTCAAGTCTTGT
 AAAAGCATATAAAAATAGTTCAGGCACTCCGAAATACTTGGTTGGCGTGTTTCGT
 AATCAACCTAAGGAGGATGTTTTGGCTCTGGTCAATGATTACGGCATTGATATCG
 TCCAACCTGCATGGAGATGAGTCGTGGCAAGAATACCAAGAGTTCCTCGGTTTGCC
 AGTTATTAAAAGACTCGTATTTCCAAAAGACTGCAACATACTACTCAGTGCAGCT
 TCACAGAAACCTCATTTCGTTTATTCCTTGTGTTGATTGAGAAGCAGGTGGGACAG
 GTGAACTTTTGGATTGGAACCTCGATTCTGACTGGGTGGAAGGCAAGAGAGCCC
 CGAAAGCTTACATTTTATGTTAGCTGGTGGACTGACGCCGTTTAAAC

SEC ID Nº: 51

Secuencia de pAM497 (excluyendo la estructura del vector)

5

GTTTAAACTTTTCCAATAGGTGGTTAGCAATCGTCTTACTTTCTAACTTTTCTTAC
 CTTTTACATTTTCAAGCAATATATATATATATATTTCAAGGATATACCATTCTAATGT
 CTGCCCCTAAGAAGATCGTCGTTTTGCCAGGTGACCACGTTGGTCAAGAAATCAC
 AGCCGAAGCCATTAAGGTTCTTAAAGCTATTTCTGATGTTTCGTTCCAATGTCAAG
 TTCGATTTTCGAAAATCATTTAATTGGTGGTGCTGCTATCGATGCTACAGGTGTTCC
 ACTTCCAGATGAGGCGCTGGAAGCCTCCAAGAAGGCTGATGCCGTTTTGTTAGGT
 GCTGTGGGTGGTCTTAAATGGGGTACCGGTAGTGTTAGACCTGAACAAGGTTTAC
 TAAAAATCCGTAAAGAACTTCAATTGTACGCCAACTTAAGACCATGTAACTTTGC
 ATCCGACTCTCTTTTAGACTTATCTCCAATCAAGCCACAATTTGCTAAAGGTACTG
 ACTTCGTTGTTGTCAGAGAATTAGTGGGAGGTATTTACTTTGGTAAGAGAAAGGA
 AGACGTTTAGCTTGCCTCGTCCCCGCCGGGTACCCGGCCAGCGACATGGAGGCC
 CAGAATACCCCTCCTTGACAGTCTTGACGTGCGCAGCTCAGGGGCATGATGTGACT
 GTCGCCCCGTACATTTAGCCCCATACATCCCCATGTATAATCATTTGCATCCATACAT
 TTTGATGGCCGCACGGCGCGAAGCAAAAATTACGGCTCCTCGCTGCAGACCTGC
 GAGCAGGGAAACGCTCCCCCTCACAGACGCGTTGAATTGTCCCCACGCCGCGCCC
 CTGTAGAGAAATATAAAAGGTTAGGATTTGCCACTGAGGTTCTTCTTTCATATAC
 TTCCTTTTAAATCTTGCTAGGATACAGTTCTCACATCACATCCGAACATAAACA
 ACCATGGCAGAACCAGCCCCAAAAAAGCAAAAACAACTGTTTCAGGAGCGCAA

GGC GTT TAT CT CCC GT AT CACT AAT GAA ACT AAA ATT CAA AT CG CT ATT TC GT G
 AAT GGT GGT TAT ATT CAA ATA AAA GATT CG ATT CT TC CT GCAA AGA AGG AT GAC G
 AT GT AG CT TC CCA AG CT ACT CAG TCAC AGG TCAT CG AT ATT CAC AC AGG TGT TGG
 CTTTT TGG AT CAT AT GAT CC AT GCG TT GGG CAAA AC ACT CT GGT TGG TCT CT TATT G
 TT GA AT GT ATT GGT GAC CT GC AC ATT GAC GAT CACC ATA CT ACC GA AG ATT GCG G
 TAT CG CAT TAG GGC AAG CG TT CAA AGA AG CA AT GGG TGT GT CCG TGG TGT AAA
 AAG ATT CG GT ACT GGG TT CG CACC ATT GGT AT GAG GCG CT AT CAC GT GCC GT AG TC
 GAT TT AT CT AG TAG ACC ATT TGT CT GTA AT CG AC CT TGG ATT GA AG AG AG AT GA
 TT GGT GAT TT AT CCA CT GAA AT GATT CC AC ACT TTT TGG AAA GT TT CG CG GAG GC
 GG CC AGA ATT ACT TT GCA TGT TGA TT GT CT GAG AG GT TT CA AC GAT CACC AC AGA
 AG TGA GAG TCG GT TCA AG GCT TT GGT GT TGC CATA AG AGA AG CT ATT TCT AG CA
 AT GGC ACCA AT GAC GT TC CCT CA ACC AA AG GT TTT TGA TGT GA AG TACT GAC AA
 TAAAA AG ATT CT TGT TTT CA AGA ACT TGT CAT TT GT AT AG TTT TTT TAT ATT GT AG
 TT GT TCT AT TTTA AT CAA AT GT TAG CG TGA TT TAT AT TTT TTT TCG CCT CG AC AT CA
 TCT GCC CAG AT GCGA AG TTA AG TGC G CAG AAA AG TA AT AT CAT GCG TCA AT CGT AT
 GT GA AT GCT GGT CG CT AT ACT GCT GT CG ATT CG AT ACT AAC GCC CGC AT CC ACC C
 GGG TT TCT CAT TCA AG TGGTAA CT GCT GT TAAA ATTA AG AT ATTT ATA AA ATT GAA
 GCT TGG TCG TT CCG ACCA AT ACC GT AG GGA AAC GT AA ATT AG CT ATT GT AAAAAA
 AG GAAA AGAAA AGAAA AGAAA AT GTT AC AT AT CGA ATT GAT CT TAT TC TT TGT
 GT AG ACC AG TCT TT GCG TCA AT CAA AG ATT CG TT TGT TCT TGT GGG CCT GA ACC
 GACT TG AG TT AAA AT CACT CT GGC AAC AT CCT TT TGC AAC TCA AG AT CCA ATT CA
 CGT GC AG TAA AG TT AG AT GATT CAA ATT GAT GGT TGA AG CCT CA AG CT GCT CAG
 TAG TAA ATTT CT TGT CCC AT CC AG GA AC AG AG CCAA ACA ATTT AT AG ATA AA TGC
 AA AG AG TT TCG ACT CAT TT TCA GCTA AG TAGTACA AC AC AG CAT TT GG AC CT GCA
 TCAA CGT GT AT GCA AC GA TT GT TT CT CCG TAAA ACT GATTA AT GGT GT GGC ACC
 AACT GAT GAT AC GCT TGG AAG TGT CAT TC AT GT AGA AT ATT GG AG GGA AG AGT
 CCAA AC AT GT GGC AT GGA AG AG TT GGA AT CC AT CAT TGT TT CCT TT GCAA AG GT
 GG CG AA AT CT TTTT CA ACA AT GG CT TT AC GC AT GACT TCAA AT CT CT TT GGT AC G
 AC AT GT TCA ATT CT TT CT TTA AT AG TT CG GAG GT TGC CAC GT CA ATT GC AT ACC
 CT GAG TGG AAC TCA AT CCT TT TTA AT AT CG CT GACA ACT AGG AC ACA AG CT TT C
 AT CT GAG GCC AG TC AG AG CT GT CT GCG ATT TGT ACT GCC AT GGA AT CAT GACC AT
 CT TC AG CT TT TCC AT TT CCA GGC CAC GT AT CCG CCAA ACA CG AT CT ACA AG C
 TGA ACC AG ACC CT TT CT TGT AT TCT AG AT AT TT CT GA AG TT GACT GT GGT AAT T
 GGT ATA ACT TAG CA ATT GC AG AG ACCA AT GC AG CAA AG CC AG CAG CGG AG GA AG

CTAAACCAGCTGCTGTAGGAAAGTTATTTTCGGAGACAATGTGGAGTTTCCATTG
 AGATAATGTGGGCAATGAGGCGTCCTTCGATTCCATTTCCTTTCTTAATTGGCGTA
 GGTCGCGCAGACAATTTTGAGTTCTTTCATTGTTCGATGCTGTGTGGTTCTCCATTT
 AACCACAAAGTGTGCGGTTCAAACCTCAGGTGCAGTAGCCGCAGAGGTCAACGTT
 CTGAGGTCATCTTGCGATAAAGTCACTGATATGGACGAATTGGTGGGCAGATTCA
 ACTTCGTGTCCCTTTTCCCCCAATACTTAAGGGTTGCGATGTTGACGGGTGCGGT
 AACGGATGCTGTGTAAACGGTCATTATAGTTTTTCTCCTTGACGTTAAAGTATA
 GAGGTATATTAACAATTTTTTGTGATACTTTTATGACATTTGAATAAGAAGTAAT
 ACAAACCGAAAATGTTGAAAGTATTAGTTAAAGTGGTTATGCAGCTTTTGCATTT
 ATATATCTGTTAATAGATCAAAAATCATCGCTTCGCTGATTAATTACCCAGAAA
 TAAGGCTAAAAAACTAATCGCATTATTATCCTATGGTTGTTAATTTGATTTCGTTGA
 TTTGAAGGTTTGTGGGGCCAGGTTACTGCCAATTTTCTCCTTTCATAACCATAAAA
 GCTAGTATTGTAGAATCTTTATTGTTTCGGAGCAGTGCGGCGCGAGGCACATCTGC
 GTTTCAGGAACGCGACCGGTGAAGACCAGGACGCACGGAGGAGAGTCTTCCGTC
 GGAGGGCTGTGCCCCGCTCGGCGGCTTCTAATCCGTACTTCAATATAGCAATGAG
 CAGTTAAGCGTATTACTGAAAGTTCCAAAGAGAAGGTTTTTTTAGGCTAAGATAA
 TGGGGCTCTTTACATTTCCACAACATATAAGTAAGATTAGATATGGATATGTATA
 TGGTGGTATTGCCATGTAATATGATTATTAAACTTCTTTGCGTCCATCCAAAAAA
 AAAGTAAGAATTTTTGAAAATTCAATATAAATGTCAGAGTTGAGAGCCTTCAGTG
 CCCCAGGGAAAGCGTTACTAGCTGGTGGATATTTAGTTTTAGATCCGAAATATGA
 AGCATTTGTAGTCGGATTATCGGCAAGAAATGCATGCTGTAGCCCATCCTTACGGT
 TCATTGCAAGAGTCTGATAAGTTTGAAGTGCCTGTGAAAAGTAAACAATTTAAA
 GATGGGGAGTGGCTGTACCATATAAGTCCTAAAACTGGCTTCATTCTGTTCGA
 TAGGCGGATCTAAGAACCCTTTCATTGAAAAAGTTATCGCTAACGTATTTAGCTA
 CTTTAAGCCTAACATGGACGACTACTGCAATAGAACTTGTTTCGTTATTGATATT
 TTCTCTGATGATGCCTACCATTTCTCAGGAGGACAGCGTTACCGAACATCGTGGCA
 ACAGAAGATTGAGTTTTTCATTTCGCACAGAATTGAAGAAGTTCCCAAAACAGGGC
 TGGGCTCCTCGGCAGGTTTAGTCACAGTTTTAACTACAGCTTTGGCCTCCTTTTTT
 GTATCGGACCTGGAAAATAATGTAGACAAATATAGAGAAGTTATTCATAATTTAT
 CACAAGTTGCTCATTGTCAAGCTCAGGGTAAAATTGGAAGCGGGTTTGATGTAGC
 GCGGCGCAGCATATGGATCTATCAGATATAGAAGATTCCCACCCGCATTAATCTCT
 AATTTGCCAGATATTGGAAGTGCTACTTACGGCAGTAACTGGCGCATTTGGTTA
 ATGAAGAAGACTGGAATATAACGATTAAAAGTAACCATTTACCTTCGGGATTAA
 CTTTATGGATGGGCGATATTAAGAATGGTTCAGAAACAGTAAAACTGGTCCAGA

AGGTAAAAAATTGGTATGATTCGCATATGCCGGAAAGCTTGAAAATATATACAG
 AACTCGATCATGCAAATTCTAGATTTATGGATGGACTATCTAAACTAGATCGCTT
 ACACGAGACTCATGACGATTACAGCGATCAGATATTTGAGTCTCTTGAGAGGAAT
 GACTGTACCTGTCAAAAGTATCCTGAGATCACAGAAGTTAGAGATGCAGTTGCC
 ACAATTAGACGTTCCCTTTAGAAAAATAACTAAAGAATCTGGTGCCGATATCGAAC
 CTCCCGTACAAACTAGCTTATTGGATGATTGCCAGACCTTAAAAGGAGTTCTTAC
 TTGCTTAATACCTGGTGCTGGTGGTTATGACGCCATTGCAGTGATTGCTAAGCAA
 GATGTTGATCTTAGGGCTCAAACCGCTGATGACAAAAGATTTTCTAAGGTTCAAT
 GGCTGGATGTAACCTCAGGCTGACTGGGGTGTTAGGAAAGAAAAAGATCCGGAAA
 CTTATCTTGATAAATAACTTAAGGTAGATAATAGTGGTCCATGTGACATCTTTAT
 AAATGTGAAGTTTGAAGTGACCGCGCTTAACATCTAACCATTTCATCTTCCGATAG
 TACTTGAAATTGTTCCCTTTCCGGCGCATGATAAAATTCTTTTAATGGGTACAAGCT
 ACCCGGGAAAGATTCTCTTTTTTTATGATATTTGTACATAAACTTTATAAATGAAA
 TTCATAATAGAAACGACACGAAATTACAAAATGGAATATGTTTCATAGGGTAGAC
 GAAACTATATACGCAATCTACATACATTTATCAAGAAGGAGAAAAAGGAGGATG
 TAAAGGAATACAGGTAAGCAAATTGATACTAATGGCTCAACGTGATAAGGAAAA
 AGAATTGCACTTTAACATTAATATTGACAAGGAGGAGGGCACCACACAAAAAGT
 TAGGTGTAACAGAAAATCATGAACTATGATTCCTAATTTATATATTGGAGGATT
 TTCTCTAAAAAATAACAATAAAAAACACTCAATGACCTGACCAT
 TTGATGGAGTTTAAGTCAATACCTTCTTGAACCATTTCCTAATGGTGAAAGTT
 CCCTCAAGAATTTTACTCTGTCAGAAACGGCCTTAACGACGTAGTCGACCTCCTC
 TTCAGTACTAAATCTACCAATACCAAATCTGATGGAAGAATGGGCTAATGCATCA
 TCCTTACCCAGCGCATGTAAACATAAGAAGGTTCTAGGGAAGCAGATGTACAG
 GCTGAACCCGAGGATAATGCGATATCCCTTAGTGCCATCAATAAAGATTCTCCTT
 CCACGTAGGCGAAAGAAACGTTAACACGTTTAAAC

SEC ID Nº: 52

Secuencia de pAM493 (excluyendo la estructura del vector)

5

GTTTAAACTACTCAGTATATTAAGTTTCGAATTGAAGGGCGAACTCTTATTCGAA
 GTCGGAGTCACCACAACACTTCCGCCCATACTCTCCGAATCCTCGTTTCCTAAAG
 TAAGTTTACTTCCACTTGTAGGCCTATTATTAATGATATCTGAATAATCCTCTATT
 AGGGTTGGATCATTTCAGTAGCGCGTGCGATTGAAAGGAGTCCATGCCCCGACGTC
 GACGTGATTAGCGAAGGCGCGTAACCATTGTCATGTCTAGCAGCTATAGAACTA
 ACCTCCTTGACACCACTTGCGGAAGTCTCATCAACATGCTCTTCCTTATTACTCAT

TCTCTTACCAAGCAGAGAATGTTATCTAAAACTACGTGTATTTACCTCTTTCTC
 GACTTGAACACGTCCAACCTCTTAAGTACTACCACAGCCAGGAAAGAATGGATC
 CAGTTCTACACGATAGCAAAGCAGAAAACACAACCAGCGTACCCCTGTAGAAGC
 TTCTTTGTTTACAGCACTTGATCCATGTAGCCATACTCGAAATTTCAACTCATCTG
 AAACTTTTCTGAAGGTTGAAAAAGAATGCCATAAGGGTCACCCGAAGCTTATTC
 ACGCCCGGGAGTTATGACAATTACAACAACAGAATTCTTTCTATATATGCACGAA
 CTTGTAATATGGAAGAAATTATGACGTACAACTATAAAGTAAATATTTTACGTA
 ACACATGGTGCTGTTGTGCTTCTTTTTCAAGAGAATACCAATGACGTATGACTAA
 GTTTAGGATTTAATGCAGGTGACGGACCCATCTTTCAAACGATTTATATCAGTGG
 CGTCCAAATTGTTAGGTTTTGTTGGTTCAGCAGGTTTCCTGTTGTGGGTCATATGA
 CTTTGAACCAAATGGCCGGCTGCTAGGGCAGCACATAAGGATAATTCACCTGCC
 AAGACGGCACAGGCAACTATCTTGCTAATTGACGTGCGTTGGTACCAGGAGCG
 GTAGCATGTGGGCCTCTTACACCTAATAAGTCCAACATGGCACCTTGTGGTTCTA
 GAACAGTACCACCACCGATGGTACCTACTTCGATGGATGGCATGGATACGGAAA
 TTCTCAAATCACCGTCCACTTCTTTCATCAATGTTATACAGTTGGAACTTTCGACA
 TTTTGTGCAGGATCTTGTCTAATGCCAAGAAAACAGCTGTCACTAAATTAGCTG
 CATGTGCGTTAAATCCACCAACAGACCCAGCCATTGCAGATCCAACCAAAT
 TCTTAGCAATGTTCAACTCAACCAATGCGGAAACATCACTTTTTAACACTTTTCTG
 ACAACATCACCAGGAATAGTAGCTTCTGCGACGACACTCTTACCACGACCTTCGA
 TCCAGTTGATGGCAGCTGGTTTTTTGTCGGTACAGTAGTTACCAGAAACGGAGAC
 AACCTCCATATCTTCCCAGCCATACTCTTCTACCA'TTTGCTTTAATGAGTATTCGA
 CACCCTTAGAAATCATATTCATACCCATTGCGTCACCAGTAGTTGTTCTAAATCTC
 ATGAAGAGTAAATCTCCTGCTAGACAAGTTTGAATATGTTGCAGACGTGCAAATC
 TTGATGTAGAGTTAAAAGCTTTTTTAATTGCGTTTTGTCCCTCTTCTGAGTCTAAC
 CATATCTTACAGGCACCAGATCTTTTCAAAGTTGGGAAACGGACTACTGGGCCTC
 TTGTCATACCATCCTTAGTTAAAACAGTTGTTGCACCACCGCCAGCATTGATTGC
 CTTACAGCCACGCATGGCAGAAGCTACCAAACAACCCTCTGTAGTTGCCATTGGT
 ATATGATAAGATGTACCATCGATAACCAAGGGGCCTATAACACCAACGGGCAAA
 GGCATGTAACCTATAACATTTTCAACAACAAGCGCCAAATACGCGGTTCGTAGTCAT
 AATTTTTATATGGTAAACGATCAGATGCTAATACAGGAGCTTCTGCCAAAATTGA
 AAGAGCCTTCCTACGTACCGCAACCGCTCTCGTAGTATCACCTAATTTTTTCTCCA
 AAGCGTACAAAGGTAACCTTACCGTGAATAACCAAGGCAGCGACCTCTTTGTTCTT
 CAATTGTTTTGTATTTCCACTACTTAATAATGCTTCTAATTCTTCTAAAGGACGTA
 TTTTCTTATCCAAGCTTTCATATCGCGGGAATCATCTTCCTCACTAGATGATGAA

GGTCTGATGAGCTCGATTGCGCAGATGATAAACTTTTGACTTTCGATCCAGAAA
 TGACTGTTTTATTGGTTAAAACTGGTGTAGAAGCCTTTTGACAGGAGCAGTAAA
 AGACTTCTTGGTGACTTCAGTCTTCACCAATTGGTCTGCAGCCATTATAGTTTTTT
 CTCCTTGACGTTAAAGTATAGAGGTATATTAACAATTTTTTGTTGATACTTTTATG
 ACATTTGAATAAGAAGTAATACAAACCGAAAAATGTTGAAAGTATTAGTTAAAGT
 GGTATGACAGCTTTTGCAATTTATATATCTGTTAATAGATCAAAAATCATCGCTTCG
 CTGATTAATTACCCAGAAATAAGGCTAAAAAACTAATCGCATTATTATCCTATG
 GTTGTTAATTTGATTTCGTTGATTGAAGGTTTGTGGGGCCAGGTTACTGCCAATTT
 TTCCTCTTCATAACCATAAAAGCTAGTATTGTAGAATCTTTATTGTTCCGAGCAGT
 GCGGCGCGAGGCACATCTGCGTTTCAGGAACGCGACCGGTGAAGACCAGGACGC
 ACGGAGGAGAGTCTTCCGTCGGAGGGCTGTGCGCCGCTCGGCGGCTTCTAATCCG
 TACTTCAATATAGCAATGAGCAGTTAAGCGTATTACTGAAAGTTCCAAAGAGAA
 GGTTTTTTTAGGCTAAGATAATGGGGCTCTTTACATTTCCACAACATATAAGTAA
 GATTAGATATGGATATGTATATGGTGGTATTGCCATGTAATATGATTATTAACT
 TCTTTGCGTCCATCCAAAAAAAAGTAAGAATTTTTGAAAATTCAATATAAATGA
 CTGCCGACAACAATAGTATGCCCCATGGTGACAGTATCTAGTTACGCCAAATTAGT
 GCAAAACCAAACACCTGAAGACATTTTGGAAGAGTTTCCTGAAATTATTCCATTA
 CAACAAAGACCTAATACCCGATCTAGTGAGACGTCAAATGACGAAAGCGGAGAA
 ACATGTTTTTCTGGTCATGATGAGGAGCAAATTAAGTTAATGAATGAAAATTGTA
 TTGTTTTGGATTGGGACGATAATGCTATTGGTGCCGGTACCAAGAAAGTTTGTCA
 TTAAATGGAAAATATTGAAAAGGGTTTACTACATCGTGCAATTCTCCGTCTTTATTT
 TCAATGAACAAGGTGAATTACTTTTACAACAAAGAGCCACTGAAAAAATAACTT
 TCCCTGATCTTTGGACTAACACATGCTGCTCTCATCCACTATGTATTGATGACGAA
 TTAGGTTTTGAAGGGTAAGCTAGACGATAAGATTAAGGGCGCTATTACTGCGGCG
 GTGAGAAAACCTAGATCATGAATTAGGTATTCCAGAAGATGAAACTAAGACAAGG
 GGTAAGTTTCACTTTTTAAACAGAATCCATTACATGGCACCAAGCAATGAACCAT
 GGGGTGAACATGAAATTGATTACATCCTATTTTATAAGATCAACGCTAAAGAAA
 ACTTGACTGTCAACCCAAACGTCAATGAAGTTAGAGACTTCAAATGGGTTTCACC
 AAATGATTTGAAAACCTATGTTTGCTGACCCAAGTTACAAGTTTACGCCTTGGTTT
 AAGATTATTTGCGAGAATTACTTATTCAACTGGTGGGAGCAATTAGATGACCTTT
 CTGAAGTGGAATAATGACAGGCAAATTCATAGAATGCTATAACAACGCGTCAATA
 ATATAGGCTACATAAAAAATCATAATAACTTTGTTATCATAGCAAAATGTGATATA
 AAACGTTTTCATTTACCTGAAAAATAGTAAAAATAGGCGACAAAAATCCTTAGT
 AATATGTAACTTTATTTTCTTTATTTACCCGGGAGTCAGTCTGACTCTTGCGAGA

GATGAGGATGTAATAATACTAATCTCGAAGATGCCATCTAATACATATAGACATA
 CATATATATATATATACATTCTATATATTCTTACCCAGATTCTTTGAGGTAAGACG
 GTTGGGTTTTATCTTTTGCAGTTGGTACTATTAAGAACAATCGAATCATAAGCATT
 GCTTACAAAGAATACACATACGAAATATTAACGATAATGTCAATTACGAAGACT
 GAACTGGACGGTATATTGCCATTGGTGGCCAGAGGTAAAGTTAGAGACATATAT
 GAGGTAGACGCTGGTACGTTGCTGTTTGTGCTACGGATCGTATCTCTGCATATG
 ACGTTATTATGGAAAACAGCATTCTCTGAAAAGGGGATCCTATTGACCAAACCTGTC
 AGAGTTCTGGTTCAAGTTCTGTCCAACGATGTTTCGTAATCATTTGGTTCGACATC
 GCCCCAGGTAAGACTATTTTCGATTATCTACCTGCAAAATTGAGCGAACCAGT
 ACAAACGCAACTAGAAGACCGCTCTCTATTGGTTCACAAACATAAACTAATTCC
 ATTGGAAGTAATTGTCAGAGGCTACATCACCGGATCTGCTTGGAAAGAGTACGT
 AAAAACAGGTAAGTGTGCATGGTTTGAAACAACCTCAAGGACTTAAAGAATCTCA
 AGAGTTCCCAGAACCAATCTTCACCCCATCGACCAAGGCTGAACAAGGTGAACA
 TGACGAAAACATCTCTCCTGCCAGGCCGCTGAGCTGGTGGGTGAAGATTTGTCA
 CGTAGAGTGGCAGAAGTGGCTGTAAAAGTGTACTCCAAGTGCAAAGATTATGCT
 AAGGAGAAGGGCATCATCATCGCAGACACTAAATTGTTTAAAC

SEC ID Nº: 53

Secuencia de pAM426

5

TCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGAC
 GGTACACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGC
 GTCAGCGGGTGTGCGGGGTGTCGGGGCTGGCTTAAGTATGCGGCATCAGAGCA
 GATTGTACTGAGAGTGCACCATATCGACTACGTCGTAAGGCCGTTTCTGACAGAG
 TAAAATTCTTGAGGGAACCTTCACCATTATGGGAAATGCTTCAAGAAGGTATTGA
 CTTAAACTCCATCAAATGGTCAGGTCATTGAGTGTTTTTTATTTGTTGTATTTTTT
 TTTTTTAGAGAAAATCCTCCAATATCAAATTAGGAATCGTAGTTTCATGATTTTCT
 GTTACACCTAACTTTTTGTGTGGTGCCCTCCTCCTTGTCAATATTAATGTTAAAGT
 GCAATTCTTTTTCCTTATCACGTTGAGCCATTAGTATCAATTTGCTTACCTGTATT
 CCTTTACTATCCTCCTTTTTCTCCTTCTTGATAAATGTATGTAGATTGCGTATATAG
 TTTTCGTCTACCCTATGAACATATTCCATTTTGTAATTTTCGTGTCGTTTCTATTATGA
 ATTTCAATTTATAAAGTTTATGTACAAATATCATAAAAAAAGAGAATCTTTTAAAG
 CAAGGATTTTCTTAACTTCTTCGGCGACAGCATCACCGACTTCGGTGGTACTGTT
 GGAACCACTAAATCACCAGTTCTGATACCTGCATCCAAAACCTTTTAACTGCA
 TCTTCAATGGCCTTACCTTCTTCAGGCAAGTTCAATGACAATTTCAACATCATTGC

AGCAGACAAGATAGTGGCGATAGGGTCAACCTTATTCTTTGGCAAATCTGGAGC
 AGAACCGTGGCATGGTTCGTACAAACCAAATGCGGTGTTCTTGTCTGGCAAAGA
 GGCCAAGGACGCAGATGGCAACAAACCCAAGGAACCTGGGATAACGGAGGCTT
 CATCGGAGATGATATCACCAAAACATGTTGCTGGTGATTATAATACCATTTAGGTG
 GGTGGGTCTTAAGTAGGATCATGGCGGCAGAATCAATCAATTGATGTTGAACC
 TTCAATGTAGGGAATTCGTTCTTGATGGTTTCCTCCACAGTTTTTCTCCATAATCT
 TGAAGAGGCCAAAAGATTAGCTTTATCCAAGGACCAAATAGGCAATGGTGGCTC
 ATGTTGTAGGGCCATGAAAGCGGCCATTCTTGTGATTCTTTGCACTTCTGGAACG
 GTGTATTGTTCACTATCCCAAGCGACACCATCACCATCGTCTTCCTTTCTCTTACC
 AAAGTAAATACCTCCCCTAATTCTCTGACAACAACGAAGTCAGTACCTTTAGCA
 AATTGTGGCTTGATTGGAGATAAGTCTAAAAGAGAGTCGGATGCAAAGTTACAT
 GGTCTTAAGTTGGCGTACAATTGAAGTTCTTTACGGATTTTATAGTAAACCTTGTTT
 AGGTCTAACACTACCGGTACCCCATTTAGGACCAGCCACAGCACCTAACAAAAC
 GGCATCAACCTTCTTGGAGGCTTCCAGCGCCTCATCTGGAAGTGGGACACCTGTA
 GCATCGATAGCAGCACCACTAACCAATTAAATGATTTTCGAAATCGAACTTGACATTGG
 AACGAACATCAGAAATAGCTTTAAGAACCTTAATGGCTTCGGCTGTGATTCTTG
 ACCAACGTGGTCACCTGGCAAACGACGATCTTCTTAGGGGCAGACATTACAAT
 GGTATATCCTTGAAATATATATAAAAAAGGCGCCTTAGACCGCTCGGCCAAAC
 AACCAATTACTTGTGAGAAATAGAGTATAATTATCCTATAAATATAACGTTTTT
 GAACACACATGAACAAGGAAGTACAGGACAATTGATTTTGAAGAGAATGTGGAT
 TTTGATGTAATTGTTGGGATTCCATTTTAAATAAGGCAATAATATTAGGTATGTGG
 ATATACTAGAAGTTCTCCTCGACCGTCGATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGAT
 GCGTAAGGAGAAAAATACCGCATCAGGAAATTGTAAACGTTAATATTTTGTAAA
 ATTCGCGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATTTTAAACCAATAGGCCGAAATCG
 GCAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTC
 CAGTTTGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGC
 GAAAAACCGTCTATCAGGCGGATGGCCCACTACGTGGAAGATCCGAGGCCTAGC
 TTTAACGAACGCAGAATTTTCGAGTTATTAAACTTAAATACGCTGAACCCGAAC
 ATAGAAATATCGAATGGGAAAAAAACTGCATAAAGGCATTAAAAGAGGAGC
 GAATTTTTTTTAAATAAAAAATCTTAATAATCATTAAAAGATAAATAATAGTCTAT
 ATATACGTATATAAATAAAAAATATTCAAAAAATAAAATAAACTATTATTTAGC
 GTAAAGGATGGGGAAAGAGAAAAAGAAAAAAATTGATCTATCGATTTCAATTCAA
 TTCAATTTATTTCTTTTCGGATAAGAAAGCAACACCTGGCAATTCCTTACCTTCCA
 ATAATTCCAAAGAAGCACCACCACAGTAGAGACATGGGAGACCCGGGCCATGG

TTAGATAGACATAGGGTAAACTAGCAATGATTTGATCAAATGCTTGTATTCATCT
 CCCATTCTCGTAAAATTGTCTTTACCTGCATATTGGACCTCTAAAAATTGGCAAA
 GATATATAACAGCCATAAGTAAAGGTCTTGGGATATTCTTTGTTGTTAAATACTC
 TCTGTTTATGTCTTTCCAAACGTCCTCCACTTCCTTATAAATCAGTGTCTGAGCAT
 ATTCTTCGTTGACATTGTATTCCCTTCATGTAAGATTCTAAAGAGCTTGAACATATGT
 TTTCTCTCCTGTTCCGCTTTATGAGTCATCAGGTCATTTAATCTCCTACCCAGAAT
 ACCACTGTAACGGAATAAAGGCGGAGCAGATACAGCCCACTCAACTGATTCCTT
 AGTGAAAATATCGCTCATTCCCTAGATAACAGGTAGTTGTTAGCAAGTTTGCACCA
 CCAGTGATAATAACTACGGGATCGTGCTCTTCAGTTGTCGGTATGTGTCCTTCATT
 AGCCCATTTTCGCTTCTACCATTAGATTCCCTACGAATTCCTTAACGAACCTCCTTCC
 CACAGTTGAATAAATCAGTTCTACCTTCTTTGGCCAGAAACTCCTCCATTTCTGTG
 TAGGTATCCATGAATAATTTGTAAATAGGCTTCATGTATTCCGGCAACGTGTCTA
 AGCAGGTGATCGACCATCTTTCCACGGCTTCAGTGAAAATCTTTAACTCCTCGTA
 AGTTCCATATGCGTCATACGTGTCATCAATAAGTGTTATCACAGCAACTGCCTTA
 GTGAAAAAAACTCTAGCTCTTGAATACTGGGGTTCGTAACCAGAACCTAAACCCC
 AAAAATAGCATTCAACGATACGATCTCTCAGACATGGGGCATTTTTCTTAATATC
 AAATGCCTTCCACCACTTGCATACGTGACTCAACTCTTCCTTATGTAGGCTCTGCA
 ATAGATTGAACTCCAGTTTAGCTAACTTTAGCAGAGTTTTATTATGGGAGTCTTGT
 TGCTGATAGAAGGGTATGTACTGGGCGGCCTCGATCCTTGGCAATCTCTCCACA
 ATGGTTGCTTTAAAGCTCTCTGGATTTCAGTGAATAAAGCGGGGTTTGTACTAAA
 CGCGTCCTTTGTCATAATCGATAGCCTTGATCTTGTGAATCCCAGGGCATCTTCAA
 GAATTATTTTCGCCCAGAACTCTCATGGACGTAGCCTCATATAATTCCAACAATCC
 TTCAACATCATTTCGCTAACGATTGTTTAAAAGCACCATTCTTGTCTTTATAGTTAT
 TAAACACATCACACGTGACATAGTATCCTTGTTTACGCATCAGCCTAAACCATAA
 GCTAGACCTGTCGCCATTCCAATTATCACCATAGGTCTCGTAAATACATTGCAAT
 GCATGATCAATTTACGTTCAAAATGATACGGAATACCTAAACGTTGAATCTCGT
 CAATCAGCTTCAACAAATTTGCATGTTTCATAGGAATATCCAATGCTTCCTTTAAC
 AACTGTCTTACTTCCTTCTTTAGATCGTTTACTATTTGCTCCACACCCTGTTCAACT
 TGTTTCTCATAAATCAAAAATTGATCGCCCCAAATAGAAGGTGGGAAATTTGCAA
 TTGGCCTTATAGGTTTCTCTTCAGTCAAGGCCATTGTTTTCTGCAGATCCGGGGTT
 TTTCTCCTTGACGTTAAAGTATAGAGGTATATTAACAATTTTTTGTGATACTTT
 TATTACATTTGAATAAGAAGTAATACAAACCGAAAATGTTGAAAGTATTAGTTAA
 AGTGGTTATGCAGTTTTCGATTTATATATCTGTTAATAGATCAAAAATCATCGCT
 TCGCTGATTAATTACCCAGAAATAAGGCTAAAAAACTAATCGCATTATCATCCT

ATGGTTGTTAATTTGATTTCGTTTCATTTGAAGGTTTGTGGGGCCAGGTTACTGCCAA
 TTTTTCCTCTTCATAACCATAAAAAGCTAGTATTGTAGAATCTTTATTGTTCCGAGC
 AGTGCGGCGCGAGGCACATCTGCGTTTCAGGAACGCGACCGGTGAAGACGAGGA
 CGCACGGAGGAGAGTCTTCCTTCGGAGGGCTGTCACCCGCTCGGCGGCTTCTAAT
 CCGTACTAAGATCTGCTTTAATTTGGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGA
 AGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTG
 CGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCGCGC
 CATTCGCCATTACAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTT
 CGCTATTACGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTT
 TGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTT
 CGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACA
 GAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGC
 CAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCT
 GACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGG
 ACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTT
 CCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGG
 CGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGCTCC
 AAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCG
 GTAACATATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGC
 AGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTT
 CTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGC
 GCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCA
 AACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATTACGCG
 CAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCT
 CAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGG
 ATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTA
 TATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTAT
 CTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGA
 TAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCG
 AGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAG
 GGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAAT
 TGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTG
 TTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTC
 AGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAA

AAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGT
 GTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCG
 TAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTG
 TATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCA
 CATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAA
 CTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGAC
 CCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAAC
 AGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAA
 TACTCATACTCTTCCTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTC
 ATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCG
 CGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGAACGAAGCATCTGTGCTTCATTTTGTA
 GAACAAAAATGCAACGCGAGAGCGCTAATTTTTCAAACAAAGAATCTGAGCTGC
 ATTTTTACAGAACAGAAATGCAACGCGAAAGCGCTATTTTACCAACGAAGAATC
 TGTGCTTCATTTTTGTAAAACAAAAATGCAACGCGAGAGCGCTAATTTTTCAAAC
 AAAGAATCTGAGCTGCATTTTTACAGAACAGAAATGCAACGCGAGAGCGCTATT
 TTACCAACAAAGAATCTATACTTCTTTTTTGTCTACAAAAATGCATCCCGAGAG
 CGCTATTTTTCTAACAAAGCATCTTAGATTACTTTTTTCTCCTTTGTGCGCTCTAT
 AATGCAGTCTCTTGATAACTTTTTGCACTGTAGGTCCGTTAAGGTTAGAAGAAGG
 CTACTTTGGTGTCTATTTTCTCTTCCATAAAAAAAGCCTGACTCCACTTCCCGCGT
 TTA CTGATTACTAGCGAAGCTGCGGGTGCAATTTTTTCAAGATAAAGGCATCCCCG
 ATTATATTCTATACCGATGTGGATTGCGCATACTTTGTGAACAGAAAGTGATAGC
 GTTGATGATTCTTCATTGGTCAGAAAATTATGAACGGTTTCTTCTATTTTGTCTCT
 ATATACTACGTATAGGAAATGTTTACATTTTCGTATTGTTTTCGATTCACTCTATG
 AATAGTTCTTACTACAATTTTTTGTCTAAAGAGTAATACTAGAGATAAACATAA
 AAAATGTAGAGGTCGAGTTTAGATGCAAGTTCAAGGAGCGAAAGGTGGATGGGT
 AGGTTATATAGGGATATAGCACAGAGATATATAGCAAAGAGATACTTTTGAGCA
 ATGTTTGTGGAAGCGGTATTCGCAATATTTTAGTAGCTCGTTACAGTCCGGTGCG
 TTTTGGTTTTTTGAAAGTGCGTCTTCAGAGCGCTTTTGGTTTTCAAAGCGCTCT
 GAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTTCAAAGCGT
 TTCCGAAAACGAGCGCTTCCGAAAATGCAACGCGAGCTGCGCACATACAGCTCA
 CTGTTACGTCGACCTATATCTGCGTGTTGCCTGTATATATATATACATGAGAA
 GAACGGCATAGTGCGTGTTTATGCTTAAATGCGTACTTATATGCGTCTATTTATGT
 AGGATGAAAGGTAGTCTAGTACCTCCTGTGATATTATCCCATTCATGCGGGGTA
 TCGTATGCTTCCTTCAGCACTACCCTTTAGCTGTTCTATATGCTGCCACTCCTCAA
 TTGGATTAGTCTCATCCTTCAATGCTATCATTTCCTTTGATATTGGATCATACTAA
 GAAACCATTATTATCATGACATTAACTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCT
 TTCGTC

SEC ID Nº: 54

Secuencia de pAM322

TCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGAC
 GGTACACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGC
 GTCAGCGGGTGTTGGCGGGTGTCGGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCA
 GATTGTAAGTGCAGAGTGCACCATATCGACTACGTCGTAAGGCCGTTTCTGACAGAG
 TAAATTCTTGAGGGAACTTTCACCATATGCGGAAATGCTTCAAGAAGGTATTGA
 CTTAACTCCATCAAATGGTCAGGTCATTGAGTGTTTTTTATTGTTGTATTTTTT
 TTTTGTAGAGAAAATCCTCCAATATCAAATTAGGAATCGTAGTTTCATGATTTTCT
 GTTACACCTAACTTTTTGTGTGGTGCCCTCCTCCTGTCAATATTAATGTAAAGT
 GCAATTCCTTTTCCCTATCACGTTGAGCCATTAGTATCAATTTGCTTACCTGTATT
 CCTTACTATCCTCCTTTTTCTCCTTCTTGATAAATGTATGTAGATTGCGTATATAG
 TTTGCTCTACCCTATGAACATATTCCATTTTGTAATTTGCTGTCGTTTCTATTATGA
 ATTTCAATTTATAAAGTTTATGTACAAATATCATAAAAAAAGAGAATCTTTTTAAG
 CAAGGATTTTCTTAACTTCTTCGGCGACAGCATCACCGACTTCGGTGGTACTGTT
 GGAACCACCTAAATCACCAGTTCTGATACCTGCATCCAAAACCTTTTTAACTGCA
 TCTTCAATGGCCTTACCTTCTTCAGGCAAGTTCAATGACAATTTCAACATCATTGC
 AGCAGACAAGATAGTGGCGATAGGGTCAACCTTATTCTTTGGCAAATCTGGAGC
 AGAACCGTGGCATGGTTCGTACAAACCAAATGCGGTGTTCTTGTCTGGCAAAGA
 GGCCAAGGACGCAGATGGCAACAAACCAAGGAACCTGGGATAACGGAGGCTT
 CATCGGAGATGATATCACCAACATGTTGCTGGTGATTATAATACCATTTAGGTG
 GGTGGGTTCTTAACTAGGATCATGGCGGCAGAATCAATCAATTGATGTTGAACC
 TTCAATGTAGGGGAATTCGTTCTTGATGGTTTTCTCCACAGTTTTTCTCCATAATCT
 TGAAGAGGCCAAAAGATTAGCTTTATCCAAGGACCAAATAGGCAATGGTGGCTC
 ATGTTGTAGGGCCATGAAAGCGGCCATTCTTGTGATTCTTTCACCTTCTGGAACG
 GTGTATTGTTCACTATCCCAAGCGACACCATCACCATCGTCTTCCTTTCTCTTACC
 AAAGTAAATACCTCCCACTAATTCTCTGACAACAACGAAGTCAGTACCTTTAGCA
 AATTGTGGCTTGATTGGAGATAAGTCTAAAAGAGAGTCGGATGCAAAGTTACAT
 GGTCTTAAGTTGGCGTACAATTGAAGTTCTTTACGGATTTTGTAAACCTTGTTT
 AGGTCTAACACTACCGGTACCCCATTTAGGACCAGCCACAGCACCTAACAAAAC

GGCATCAACCTTCTTGGAGGCTTCCAGCGCCTCATCTGGAAGTGGGACACCTGTA
GCATCGATAGCAGCACCACCAATTAAATGATTTTCGAAATCGAACTTGACATTGG
AACGAACATCAGAAATAGCTTTAAGAACCTTAATGGCTTCGGCTGTGATTTCTTG
ACCAACGTGGTCACCTGGCAAAACGACGATCTTCTTAGGGGCAGACATTACAAT
GGTATATCCTTGAAATATATATAAAAAAAGGCGCCTTAGACCGCTCGGCCAAAC
AACCAATTACTTGTTGAGAAATAGAGTATAATTATCCTATAAATATAACGTTTTT
GAACACACATGAACAAGGAAGTACAGGACAATTGATTTTGAAGAGAATGTGGAT
TTTGATGTAATTGTTGGGATTCCATTTTAAATAAGGCAATAATATTAGGTATGTGG
ATATACTAGAAGTTCTCCTCGACCGTCGATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGAT
GCGTAAGGAGAAAATACCGCATCAGGAAATTGTAAACGTTAATATTTTGTTAAA
ATTTCGCGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATTTTTAAACCAATAGGCCGAAATCG
GCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTC
CAGTTTGGACAAGAGTCCACTATTAAGAAGCGTGGACTCCAACGTCAAAGGGC
GAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGGAAGATCCGAGGCCTAGC
TTTAACGAACGCAGAATTTTCGAGTTATTAACTTAAAATACGCTGAACCCGAAC
ATAGAAATATCGAATGGGAAAAAAAAAACTGCATAAAGGCATTAAAAGAGGAGC
GAATTTTTTTTAAATAAAAAATCTTAATAATCATTAAAAGATAAATAATAGTCTAT
ATATACGTATATAAATAAAAAATATTCAAAAAATAAATAAACTATTATTTTAGC
GTAAAGGATGGGGAAAGAGAAAAGAAAAAAATTGATCTATCGATTTCATTCAA
TTCAATTTATTTCTTTTCGGATAAGAAAGCAACACCTGGCAATTCCCTACCTTCCA
ATAATTCCAAAGAAGCACCACCACCAGTAGAGACATGGGAGACCCGGGCCATGG
TTAGATAGACATAGGGTAAACTAGCAATGATTTGATCAAATGCTTGTATTTCATCT
CCCATTCTCGTAAAATTGTCTTTACCTGCATATTGGACCTCTAAAAATTGGCAAA
GATATATAACAGCCATAAGTAAAGGTCTTGGGATATTCTTTGTTGTTAAATACTC
TCTGTTTATGTCTTTCCAAACGTCTCCTCCACTTCCTTATAAATCAGTGTCTGAGCAT
ATTCTTCGTTGACATTGTATTCCTTCATGTAAGATTCTAAAGAGCTTGAACATATGT
TTTCTCTCCTGTTCCGCTTTATGAGTCATCAGGTCATTAAATCTCCTACCCAGAAT
ACCACTGTAACGGAATAAAGGCGGAGCAGATACAGCCCACTCAACTGATTCCCTT
AGTGAATAATCGCTCATTCCCTAGATAACAGGTAGTTGTTAGCAAGTTTGCACCA
CCAGTGATAATAACTACGGGATCGTGCTCTTCAGTTGTCTGGTATGTGTCCTTCATT
AGCCCATTTTCGCTTCTACCATTAGATTCCCTTACGAATTCTTTAACGAACCTCCTCC
CACAGTTGAATAAATCAGTTCTACCTTCTTTGGCCAGAACTCCTCCATTTCTGTG
TAGGTATCCATGAATAATTTGTAAATAGGCTTCATGTATTCCGGCAACGTGTCTA
AGCAGGTGATCGACCATCTTCCACGGCTTCAGTGAAAATCTTTAACTCCTCGTA

AGTTCCATATGCGTCATACGTGTCATCAATAAGTGTTATCACAGCAACTGCCTTA
 GTGAAAAAACTCTAGCTCTTGAATACTGGGGTTCGTAACCAGAACCTAAACCCC
 AAAAATAGCATTCAACGATACGATCTCTCAGACATGGGGCATTCTTCTTAATATC
 AAATGCCTTCCACCACTTGCATACGTGACTCAACTCTTCCTTATGTAGGCTCTGCA
 ATAGATTGAACTCCAGTTTAGCTAACTTTAGCAGAGTTTTATTATGGGAGTCTTGT
 TGCTGATAGAAGGGTATGTACTGGGCGGCCTCGATCCTTGGCAATCTCTTCCACA
 ATGGTTGCTTTAAAGCTCTCTGGATTTCAGTGAATAAAGCGGGGTTTGTACTAAA
 CGCGTCCTTTGTCATAATCGATAGCCTTGATCTTGTGAATCCCAGGGCATCTTCAA
 GAATTATTTGCCCCGGAACCTCTCATGGACGTAGCCTCATATAATTCCAACAATCC
 TTCAAGATCATTGCTAACGATTGTTTAAAGCACCATTCTTGTCTTTATAGTTAT
 TAAACACATCACACGTGACATAGTATCCTTGTTTACGCATCAGCCTAAACCATAA
 GCTAGACCTGTGCGCCATTCCAATTATCACCATAGGTCTCGTAAATACATTGCAAT
 GCATGATCAATTTACGTTCAAAATGATACGGAATACCTAAACGTTGAATCTCGT
 CAATCAGCTTCAACAAATTTGCATGTTTCATAGGAATATCCAATGCTTCCTTTAAC
 AACTGTCTTACTTCTTCTTTAGATCGTTTACTATTTGCTCCACACCCTGTTCAACT
 TGTTTCTCATAAATCAAAAATTGATCGCCCCAAATAGAAGGTGGGAAATTTGCAA
 TTGGCCTTATAGGTTTCTCTTCAGTCAAGGCCATTGTTTTCTGCAGATCCGGGGTT
 TTTTCTCCTTGACGTTAAAGTATAGAGGTATATTAACAATTTTTTGTGATACTTT
 TATTACATTTGAATAAGAAGTAATACAAACCGAAAATGTTGAAAGTATTAGTTAA
 AGTGGTTATGCAGTTTTTGCATTTATATATCTGTTAATAGATCAAAAATCATCGCT
 TCGCTGATTAATTACCCAGAAATAAGGCTAAAAAACTAATCGCATTATCATCCT
 ATGGTTGTTAATTTGATTGTTTCAATTTGAAGGTTTGTGGGGCCAGGTTACTGCCAA
 TTTTCTCCTTTCATAACCATAAAAGCTAGTATTGTAGAATCTTTATTGTTTCGGAGC
 AGTGCGGCGCGAGGCACATCTGCGTTTCAGGAACGCGACCGGTGAAGACGAGGA
 CGCACGGAGGAGAGTCTTCCTTCGGAGGGCTGTCACCCGCTCGGCGGCTTCTAAT
 CCGTACTAAGATCTGCTTTAATTTGGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGA
 AGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTG
 CGCGTAACCACCACACCCGCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTTCGCGC
 CATTGCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTT
 CGCTATTACGCCAGCTGAATTGGAGCGACCTCATGCTATACCTGAGAAAGCAACC
 TGACCTACAGGAAAGAGTTACTCAAGAATAAGAATTTTCGTTTTAAACCTAAGA
 GTCACTTTAAAATTTGTATACACTTATTTTTTTTATAACTTATTTAATAATAAAAA
 TCATAAATCATAAGAAATTCGCTTATTTAGAAGTGCAACAACGTATCTACCAAC
 GATTTGACCCTTTTCCATCTTTTCGTAAATTTCTGGCAAGGTAGACAAGCCGACA

ACCTTGATTGGAGACTTGACCAAACCTCTGGCGAAGAATTGTTAATTAAGAGTCA
 GTCGACTTAAAAACTAGGGACCAATAGCAATTCTGTTTTACGTTGCATTGTTGCA
 CCTGAACTTTCCGTCATGTCAATTTGATCATATGAAACTCCATTGGGCAACTTCCA
 GTTGAAATGATAAAGAATGTTGGCTAGTGGCAGTTGAACATTGGCCAAACCTAA
 CGCAGCGCCAGGACACATACGACGTCCAGCCCCAAATGGTAAATATTCATATTC
 GCGGCCCATCACTGTTGCCGAAGAGTTTTCAAATCTTTCAGGTATAAACGCTTCT
 GCATCCTTCCAGTATTCAGGATCTCTATTGATCGCAAACACATTAACGATTAATTT
 CGTTTTGTTAGGGATATTATAACCAGCCAAGTTTACTGGCTGACGACATTCTCTA
 GGTAGCACTAACGGCAAGGGTGGGTGTAGTCTAAGAGTCTCTTTGATGACCATAT
 TCAAGTAGGACAATTCTTGTATATCTTCTTCATGTATTTTTCTTTCCCATTC AAG
 GCCTTACGTAATTCAGCCTGAACCTTTTCCATTGCTTTCCGACATTTTATTAGCTC
 GCTTATAGCCCATTCATGTTAGAACTTGAAGTGTCGGTCCCTGCACCGAACATG
 TCCAAAATTATTGCTTTGATATTATCCGAAGTCAGAGGAACTCAGCAGAATCCT
 TTAATCTAAGTAATACATCTAATAGGGTTTCGTTGGTTTTGGATGACGTATTTACG
 GTATGTTTACGTACCAAATTGTCAATTAAGTTATCAATCTTTTTACGTAGGCTAGT
 TAATCTTGCTCTCTTACCGCTCAAGTGATGCAAGAACTTTTTAGATGGGAAAATA
 TCGGCAACATCGAAACCGCCTGTTTGTCTCAGTATTTCTTTAACAATTTT CAGTAAG
 TTCCTTTTGATCTTTAATTCCCTTACCAAACGCAGCACGGGATAGTATAGTGGCA
 ATTAGTTTTAAAAACGTTTTCACTTAAATTTACTGGTCTACCACTACCTGAAGCCTT
 TATTTCCCTGGACTAAATTCCAACATTCTTCTTCCCTCAACGATTGAAATGACTTAA
 CCTTTTTTACAGACAACAATTCAAGAGTACAAATCTTCCTTAATTGTCTCCAGTAT
 TCCCCATATGGAGCAAGGACAACATCAGTGTTATGATATAAACTATTTCCCCAG
 TTAAGTTTTCGGGTCTATTAGCGAAAGTAATATCGTAGGTTGTAAGAATTTCTT
 AGCCCACTTAGGACTCGACACGACTATTGTGGGTACCTCTCCCAATTGAAGGTGC
 ATTAGCGAACCATATTTTCTCGCTAAATCCCTTACACCCCTGTGTGGTGTGGTTCC
 GATCAAATGGTGTCATGTGACCAATGATGGGTAGCCTCCAAGTTCCGGCAAGGA
 CTTTTTAGTTGACTTACTTCTAGTGGCAAATTTGTACACGAACAACAAAATAGTT
 GCTAAAGCAATTGATGTAGTTAAAGATAGTGCCATAGCCTTTAAAATTGACTTCA
 TTGTTTTCTAGGCCTTTAGTGAGGGTTGAATTCGAATTTTCAAAAATTCTTACTT
 TTTTTTTGGATGGACGCAAAGAAGTTTAATAATCATATTACATGGCATTACCACC
 ATATACATATCCATATACATATCCATATCTAATCTTACTTATATGTTGTGGAAATG
 TAAAGAGCCCCATTATCTTAGCCTAAAAAAACCTTCTCTTTGGAACCTTTCAGTAA
 TACGCTTAACTGCTCATTGCTATATTGAAGTACGGATTAGAAGCCGCCGAGCGGG
 TGACAGCCCTCCGAAGGAAGACTCTCCTCCGTGCGTCCTCGTCTTCACCGGTCGC

GTTCCTGAAACGCAGATGTGCCTCGCGCCGCACTGCTCCGAACAATAAAGATTCT
 ACAATACTAGCTTTTATGGTTATGAAGAGGAAAAAATTGGCAGTAACCTGGCCCCA
 CAAACCTTCAAATGAACGAATCAAATTAACAACCATAGGATGATAATGCGATTA
 GTTTTTTAGCCTTATTTCTGGGGTAATTAATCAGCGAAGCGATGATTTTTGATCTA
 TTAACAGATATATAAATGCAAAAACTGCATAACCACTTTAACTAATACTTTCAAC
 ATTTTCGGTTTGTATTACTTCTTATTCAAATGTAATAAAAGTATCAACAAAAAATT
 GTTAATATACCTCTATACTTTAACGTCAAGGAGAAAAAACCCCAAGCTTCCCGGG
 AAAACAATGCAATCGACAACCTTCCGTAAACTATCACCTTTCGATCTTATGACTG
 CCTTGTTAAATGGTAAAGTTAGTTTCGACACGTCCAATACTTCCGATACAAATAT
 ACCACTGGCGGTTTTTCATGGAAAACAGGGAATTGCTTATGATATTAACAACCAGT
 GTGGCCGTTTTTAATTGGTTGTGTGGTTGTATTGGTATGGAGAAGATCATCAAGTG
 CCGCTAAGAAGGCCGCCGAATCACCAGTCATTGTCGTCCCAAAGAAAGTCACTG
 AAGATGAGGTTGATGACGGCAGAAAGAAAGTTACTGTATTTTTCGGGACACAAA
 CGGGGACTGCGGAAGGTTTTGCGAAAGCTCTAGTTGAAGAAGCCAAGGCAAGGT
 ACGAAAAAGCAGTATTCAAAGTTATTGATTTAGATGACTACGCCGCAGAAGATG
 ATGAATACGAAGAAAAGCTAAAGAAAGAATCTTTGGCATTCTTCTTTTTAGCTAC
 CTATGGTGACGGAGAACCAACAGATAACGCCGCTAGATTCTATAAATGGTTTACT
 GAAGGAGAAGAAAAAGGTGAGTGGTTAGATAAGTTACAATACGCTGTCTTTGGA
 TTGGGAAATCGTCAATATGAACACTTCAATAAGATTGCAAAAGTGGTCGATGAA
 AAATTAGTTGAGCAGGGGGCTAAAAGGTTAGTGCCTGTCGGTATGGGTGATGAC
 GATCAATGTATCGAAGATGATTTTACTGCTTGGAAGGAATTGGTTTGGCCAGAAT
 TAGATCAGCTATTGAGGGACGAAGATGACACAAGTGTGCTACTCCGTACACCG
 CCGCTGTTGGCGAATATCGTGTGTTTTTCACGATAAACCTGAACTTACGATCA
 AGATCAATTGACCAACGGACACGCAGTTCACGACGCCCAACACCCATGCAGATC
 GAACGTTGCGGTCAAGAAAGAATTACACAGTCCCTTATCCGATAGGAGTTGTACT
 CATTTAGAATTTGATATTTCCAATACTGGACTATCGTATGAACTGGCGACCATG
 TCGGTGTATATGTGGAAAACCTGTCTGAAGTTGTAGATGAAGCCGAAAAAATTGAT
 TGGGCTTCCTCCACATACATACTTTTCTGTGCATACAGATAATGAAGATGGTACT
 CCACTTGGCGGAGCCTCGTTACCACCTCCCTTTCCACCATGTACACTTAGAAAAG
 CTCTTGCACTCTTATGCAGATGTACTTTCTTCACCAAAGAAAAGTGCATTACTAGCT
 CTAGCCGCCCATGCTACCGACTCTACTGAAGCTGACCGTTTGAAATTCTTTGCTTC
 ACCTGCTGGCAAAGACGAGTACGCACAGTGGATTGTGGCATCTCACAGATCATT
 GCTGGAAGTGATGGAAGCCTTCCCATCGGCAAAGCCACCATTAGCGGTGTTTTTC
 GCATCTGTTGCCCCACGTTTACAGCCTAGATACTATTCCATATCTTCTAGCCCAA

ATTTGCCCCCAATCGTATTCATGTGACGTGTGCGCTGGTGTATGAACAAACTCCA
 TCAGGAAGGGTACATAAAGGTGTCTGTAGTACATGGATGAAAAACGCGGTGCCA
 ATGACTGAATCTCAAGATTGTTTCGTGGGCACCAATTTATGTTTCGTACTTCTAATTT
 TAGACTACCTAGTGACCCTAAAGTACCAGTGATTATGATCGGGCCTGGGACAGG
 ACTAGCGCCATTCAGAGGTTTCTTACAAGAAAGATTGGCCCAAAGGAAGCAGG
 TACGGAATTAGGAACCGCAATTCTATTCTTTGGTTGTCGTAATAGAAAAGTTGAC
 TTTATATACGAAGATGAGTTAAACAACCTTCGTTGAAACTGGAGCGTTATCAGAAT
 TAGTGACAGCATTCTCTAGGGAAGGTGCAACAAAAGAATACGTCCAACATAAAA
 TGACCCAAAAGGCCAGCGATATATGGAATTTGCTGTCCGAGGGGTGCCTATTTGTA
 CGTTTGTGGTGATGCAAAGGGAATGGCTAAAGATGTTTCACAGGACATTGCATAC
 AATTGTTTCAGGAACAAGGTTCCCTTGGAATTCCTCTAAGGCAGAACTTTATGTTAAA
 AACCTTCAGATGGCTGGTAGATATTTGCGTGATGTTTGGTGAGCTAGCTAAGATC
 CGCTCTAACCGAAAAGGAAGGAGTTAGACAACCTGAAGTCTAGGTCCCTATTTAT
 TTTTTTATAGTTATGTTAGTATTAAGAACGTTATTTATATTTCAAATTTTTCTTTTT
 TTTCTGTACAGACGCGTGACGCATGTAACATTATACTGAAAACCTTGCTTGAGA
 AGGTTTTGGGACGCTCGAAGATCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGG
 GGAGAGGCGGTTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCT
 GCGCTCGGTTCGTTCCGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAAT
 ACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAG
 GCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATA
 GGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGC
 GAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGT
 GCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTT
 CGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTA
 GGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGC
 TGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTAT
 CGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCG
 GTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAG
 TATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAG
 CTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGTTTGCAAG
 CAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTA
 CGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGA
 GATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTAA
 ATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATC

AGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACT
 CCCCCTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCT
 GCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACC GGCTCCAGATTTATCAGCAATAAAC
 CAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCC
 ATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATA
 GTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTT
 GGTATGGCTTCATT CAGCTCCGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCC
 CCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAG
 TAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTT
 ACTGTCATGCCATCCGTAAAGATGCTTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGT
 CATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACG
 GGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACG
 TTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATG
 TAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTC
 TGGGTGAGCAAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGA
 CACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTAT
 CAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAAC
 AAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGAACGAAGCATCT
 GTGCTTCATTTTGTAGAACAAAAATGCAACGCGAGAGCGCTAATTTTTCAAACAA
 AGAATCTGAGCTGCATTTTTACAGAACAGAAATGCAACGCGAAAGCGCTATTTTA
 CCAACGAAGAATCTGTGCTTCATTTTTGTAAAACAAAAATGCAACGCGAGAGCG
 CTAATTTTTCAAACAAAGAATCTGAGCTGCATTTTTACAGAACAGAAATGCAACG
 CGAGAGCGCTATTTTACCAACAAAGAATCTATACTTCTTTTTTGTCTACAAAAAT
 GCATCCCGAGAGCGCTATTTTTCTAACAAAGCATCTTAGATTACTTTTTTTCTCCT
 TTGTGCGCTCTATAATGCAGTCTCTTGATAACTTTTTGCACTGTAGGTCCGTTAAG
 GTTAGAAGAAGGCTACTTTGGTGTCTATTTTCTCTTCCATAAAAAAAGCCTGACT
 CCACTTCCCGCGTTTACTGATTACTAGCGAAGCTGCGGGTGCATTTTTTCAAGAT
 AAAGGCATCCCCGATTATATTCTATACCGATGTGGATTGCGCATACTTTGTGAAC
 AGAAAGTGATAGCGTTGATGATTCTTCATTGGTCAGAAAATTATGAACGGTTTCT
 TCTATTTTGTCTCTATATACTACGTATAGGAAATGTTTACATTTTCGTATTGTTTTC
 GATTCACCTCTATGAATAGTTCTTACTACAATTTTTTTGTCTAAAGAGTAATACTAG
 AGATAAACATAAAAAATGTAGAGGTGAGTTTAGATGCAAGTTCAAGGAGCGAA
 AGGTGGATGGGTAGGTTATATAGGGATATAGCACAGAGATATATAGCAAAGAGA
 TACTTTTGAGCAATGTTTGTGGAAGCGGTATTCGCAATATTTTAGTAGCTCGTTAC

AGTCCGGTGCGTTTTTGGTTTTTTGAAAGTGCGTCTTCAGAGCGCTTTTGGTTTTTC
AAAAGCGCTCTGAAGTTCCTATACTTTCTAGAGAATAGGAACTTCGGAATAGGA
ACTTCAAAGCGTTTCCGAAAACGAGCGCTTCCGAAAATGCAACGCGAGCTGCGC
ACATACAGCTCACTGTTACGTCGCACCTATATCTGCGTGTTGCCTGTATATATAT
ATACATGAGAAGAACGGCATAAGTGCGTGTTTATGCTTAAATGCGTACTTATATGC
GTCTATTTATGTAGGATGAAAGGTAGTCTAGTACCTCCTGTGATATTATCCCATT
CATGCGGGGTATCGTATGCTTCCTTCAGCACTACCCTTTAGCTGTTCTATATGCTG
CCTCCTCAATTGGATTAGTCTCATCCTTCAATGCTATCATTTCTTTGATATTG
GATCATACTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTAT
CACGAGGCCCTTTCGTC

REIVINDICACIONES

1. Un sistema de producción de un compuesto bio-orgánico que comprende:

- a. un recipiente que tiene una capacidad de al menos 100 litros;
- b. un medio acuoso, en el recipiente, formando una primera fase;
- c. una pluralidad de células hospedadoras bacterianas o fúngicas genéticamente modificadas, en el medio acuoso, capaces de convertir una fuente de carbono del hidrato de carbono presente en el medio acuoso en al menos un compuesto bio-orgánico que tiene al menos diez átomos de carbono; y
- d. una segunda fase orgánica líquida, que comprende el al menos un compuesto bio-orgánico en una cantidad del 40-99 % o de al menos 90 %, en contacto con la primera fase;

en el que el al menos un compuesto bio-orgánico es un compuesto isoprenoide; y en el que en la segunda fase orgánica se forma espontáneamente.

2. El sistema de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el al menos un compuesto bio-orgánico es un compuesto bio-orgánico C₁₀, un compuesto bio-orgánico C₁₅, un compuesto bio-orgánico C₂₀ o un compuesto bio-orgánico C₂₀₊.

3. El sistema de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el recipiente tiene una capacidad de al menos 1000, al menos 10.000 litros, al menos 50.000 litros, al menos 100.000 litros, al menos 500.000 litros o al menos 1.000.000 litros.

4. Un sistema para elaborar compuestos isoprenoides C₁₀-C₂₀ que comprende:

- a. un recipiente que tiene una capacidad de al menos 100 litros;
- b. un medio acuoso, en el recipiente, formando una primera fase;
- c. una pluralidad de células hospedadoras bacterianas o fúngicas genéticamente modificadas, en el medio acuoso, capaces de convertir una fuente de carbono del hidrato de carbono presente en el medio acuoso en al menos un isoprenoide C₁₀-C₂₀;
- y
- d. una segunda fase orgánica líquida, que comprende el al menos un isoprenoide en una cantidad del 40-99 %, en contacto con la primera fase;

en el que la segunda fase orgánica se forma espontáneamente.

5. El sistema de la reivindicación 4, en el que el compuesto isoprenoide es un monoterpeno, un sesquiterpeno o un diterpeno.

6. Un método de producción de un compuesto bio-orgánico que comprende:

- a. cultivar, en un medio acuoso, una pluralidad de células hospedadoras bacterianas o fúngicas genéticamente modificadas que producen al menos un compuesto bio-orgánico que tiene al menos diez átomos de carbono, en donde el medio acuoso forma una primera fase, y en donde las células en la pluralidad convierten una fuente de carbono del hidrato de carbono presente en el medio acuoso en el al menos un compuesto bio-orgánico que tiene al menos diez átomos de carbono;
- b. formar una segunda fase orgánica líquida, que comprende el al menos un compuesto bio-orgánico en una cantidad del 40-99 %, en contacto con la primera fase;
- c. separar de la primera fase al menos una parte de la segunda fase; y
- d. aislar el al menos un compuesto bio-orgánico de la segunda fase; en donde el al menos un compuesto bio-orgánico es un compuesto isoprenoide; y

en el que la segunda fase orgánica se forma espontáneamente.

7. El método de la reivindicación 6, en el que la segunda fase orgánica se separa decantando la segunda fase de la primera fase.

8. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el al menos un compuesto bio-orgánico es un compuesto bio-orgánico C₁₀, un compuesto bio-orgánico C₁₅, un compuesto bio-orgánico C₂₀ o un compuesto bio-orgánico C₂₀₊.

9. Un método de producción de un compuesto isoprenoide C₁₀-C₂₀ que comprende:

- a. cultivar, en un medio acuoso, una pluralidad de células hospedadoras bacterianas o fúngicas genéticamente modificadas que producen al menos un compuesto isoprenoide C₁₀-C₂₀ a partir de una fuente de carbono del hidrato de carbono presente en el medio acuoso, en un recipiente que tiene una capacidad de al menos 100 litros;
- b. formar una segunda fase orgánica, que comprende el al menos un compuesto isoprenoide C₁₀-C₂₀ en una

cantidad del 40-99 %, en contacto con el medio acuoso;
 c. separar del medio acuoso al menos una parte de la segunda fase orgánica; y
 d. aislar el al menos un compuesto isoprenoide C_{10} - C_{20} de la segunda fase orgánica;

5 en el que la segunda fase orgánica se forma espontáneamente.

10. El método de la reivindicación 9, en el que el al menos un compuesto isoprenoide es un monoterpeneo, un sesquiterpeneo o un diterpeneo.

10 11. El método de la reivindicación 9, en el que la segunda fase orgánica se separa decantando la segunda fase orgánica de la fase acuosa.

12. El método de las reivindicaciones 6 o 9, en el que la etapa de aislamiento comprende una adsorción, una destilación, una extracción gas-líquido, una extracción líquido-líquido o una ultrafiltración.

15 13. Un sistema de producción de una composición de combustible que comprende:

a. uno o más sistemas de fermentación que comprenden:

- 20 i) al menos un recipiente que tiene una capacidad de al menos 100 litros;
 ii) un medio acuoso, en el menos un recipiente, formando una primera fase;
 iii) una pluralidad de células hospedadoras bacterianas o fúngicas genéticamente modificadas, presentes en el medio acuoso, capaces de convertir una fuente de carbono del hidrato de carbono presente en el medio acuoso en al menos un compuesto bio-orgánico que comprende al menos diez átomos de carbono; y
 25 iv) una segunda fase orgánica líquida, que comprende el al menos un compuesto bio-orgánico en una cantidad del 40-99 %, en contacto con la primera fase;
 v) en el que al menos un compuesto bio-orgánico es un compuesto isoprenoide; y

en el que la segunda fase orgánica se forma espontáneamente:

- 30 b. uno o varios sistemas de separación de la primera fase mediante los cuales la primera fase y la segunda fase orgánica o uno o más componentes de la segunda fase orgánica se separan;
 c. opcionalmente uno o más sistemas de separación de la segunda fase, mediante los cuales el al menos un compuesto bio-orgánico se separa de la segunda fase orgánica;
 35 d. opcionalmente uno o varios reactores o recipientes en los que el al menos un compuesto bio-orgánico se modifica química o biológicamente;
 e. opcionalmente uno o varios sistemas de purificación mediante los cuales el compuesto bio-orgánico o el compuesto bio-orgánico modificado se purifican o se purifican adicionalmente;
 f. opcionalmente uno o varios recipientes o sistemas de mezcla para mezclar el al menos un compuesto bio-orgánico con uno o más componentes combustibles adicionales; y
 40 g. opcionalmente uno o más sistemas de purificación adicionales, mediante los cuales la mezcla del al menos un compuesto bio-orgánico y del uno o más componentes combustibles adicionales se purifica o se purifican adicionalmente.

45 14. Un método de elaboración de una composición de combustible que comprende:

- a. cultivar, en un medio acuoso, una pluralidad de células hospedadoras bacterianas o fúngicas genéticamente modificadas, que convierten una fuente de carbono del hidrato de carbono presente en el medio acuoso, en al menos un compuesto bio-orgánico que comprende al menos diez átomos de carbono, en donde el medio acuoso forma una primera fase; en donde el al menos un compuesto bio-orgánico es un compuesto isoprenoide.
 50 b. formar una segunda fase orgánica líquida, que comprende el 40-99 % del al menos un compuesto bio-orgánico, en contacto con la primera fase; en donde la segunda fase orgánica se forma espontáneamente;
 c. separar de la primera fase al menos una parte de la segunda fase;
 d. aislar el al menos un compuesto bio-orgánico de la segunda fase;
 e. opcionalmente modificar química o biológicamente el al menos un compuesto bio-orgánico;
 55 f. opcionalmente purificar el compuesto bio-orgánico o el compuesto bio-orgánico modificado;
 g. opcionalmente mezclar el al menos un compuesto bio-orgánico con uno o más componentes combustibles adicionales; y
 h. opcionalmente purificar la mezcla del uno o más compuestos bio-orgánicos y del uno o más componentes combustibles adicionales.

60

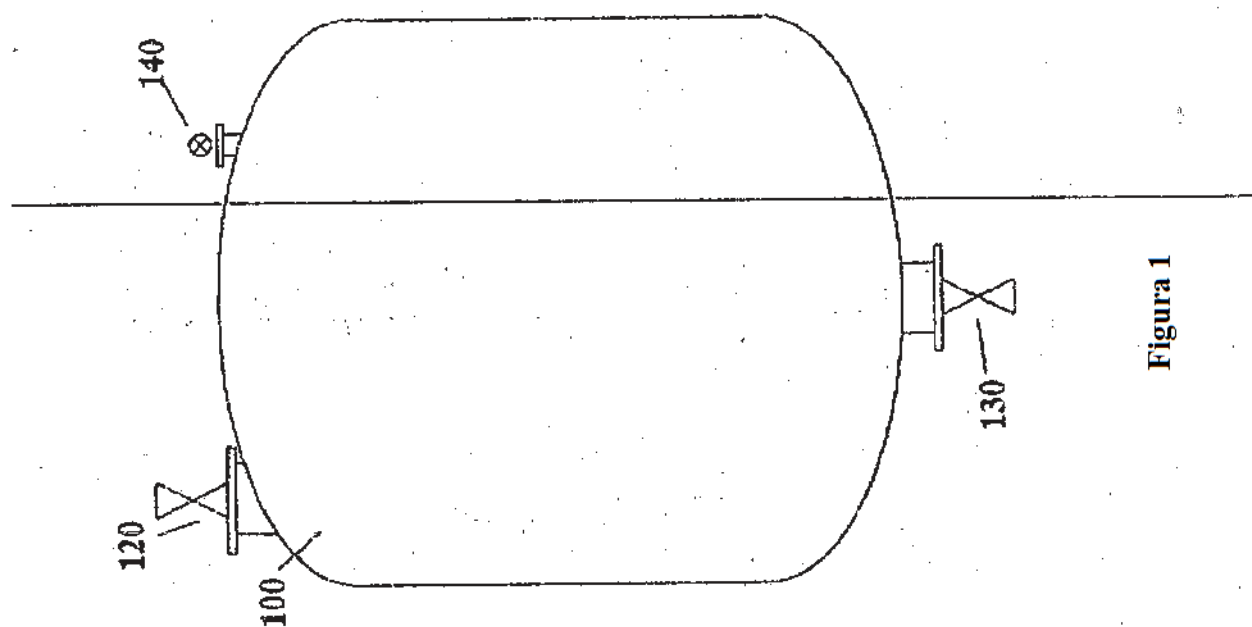


Figura 1

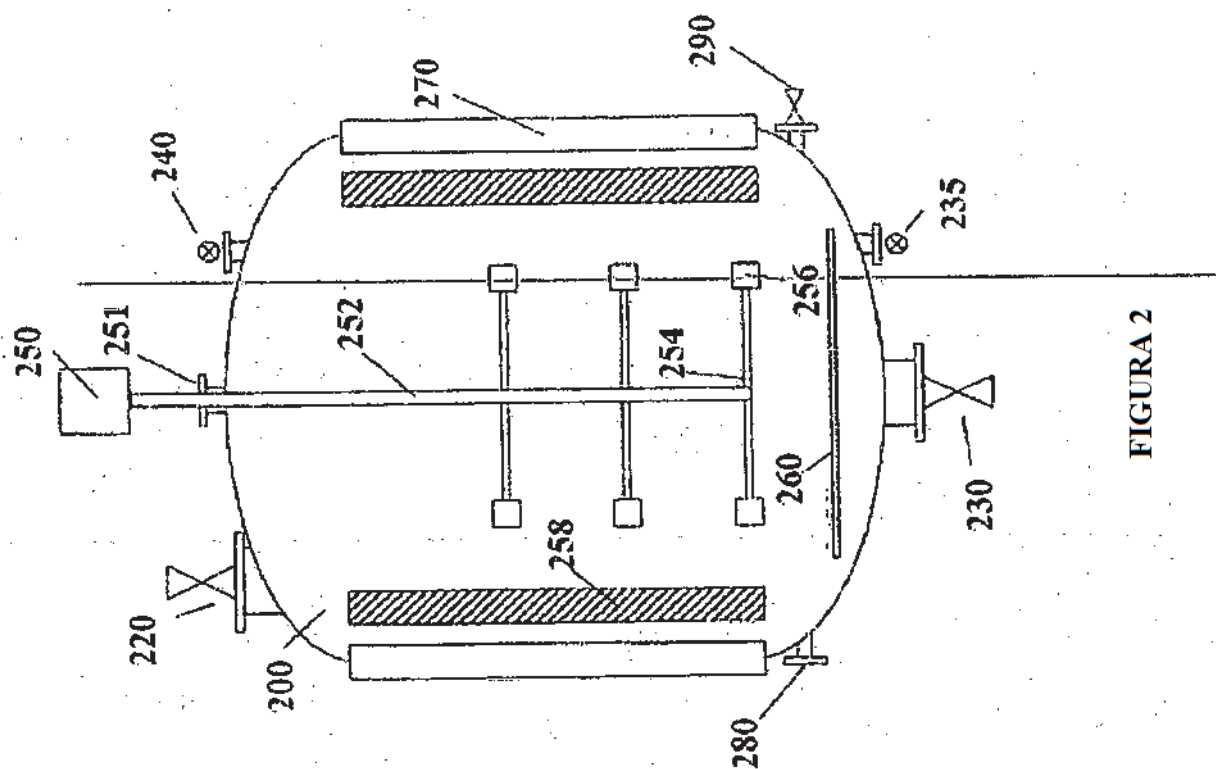


FIGURA 2

Figura 3
Ruta del mevalonato

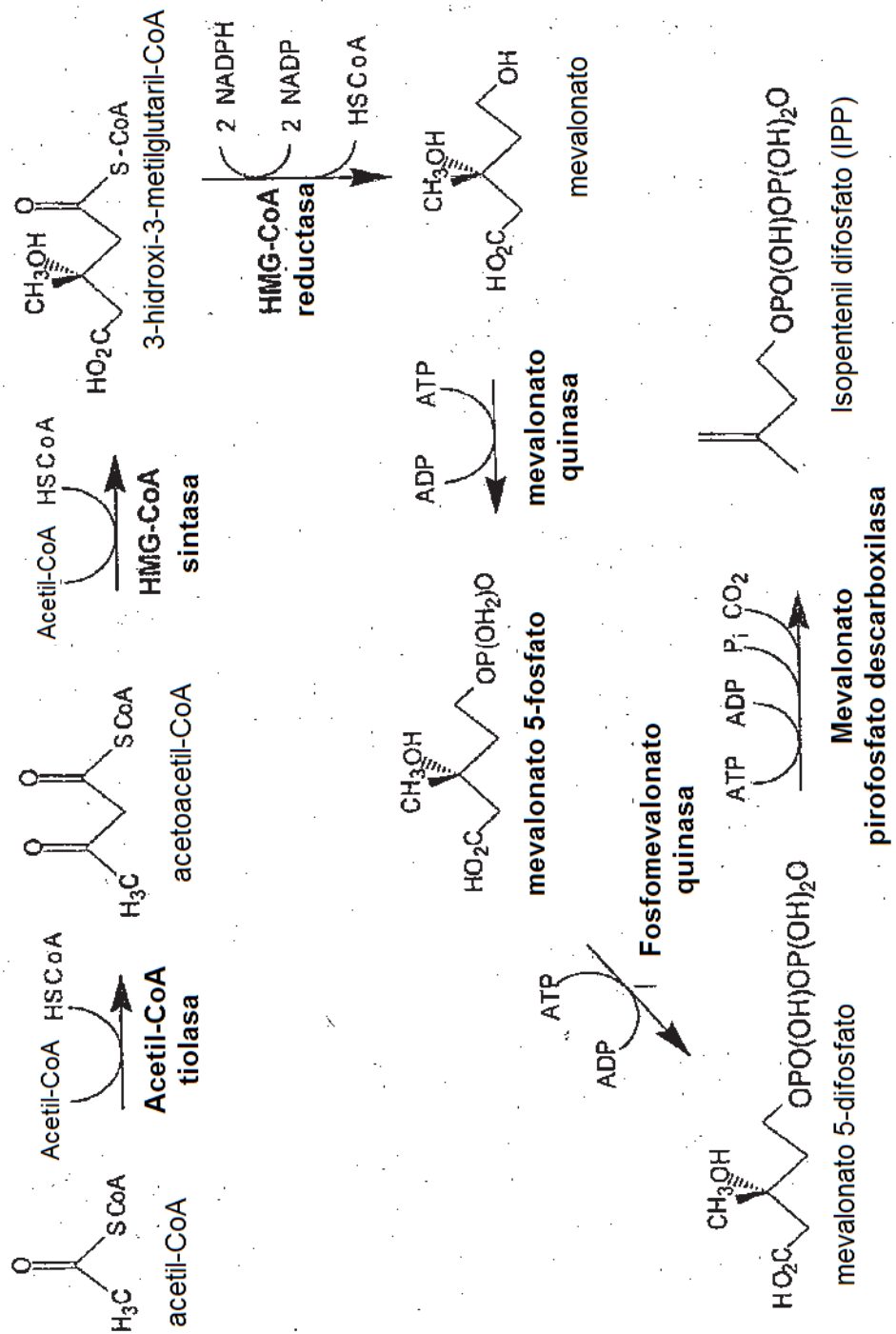


Figura 4
Ruta DXP

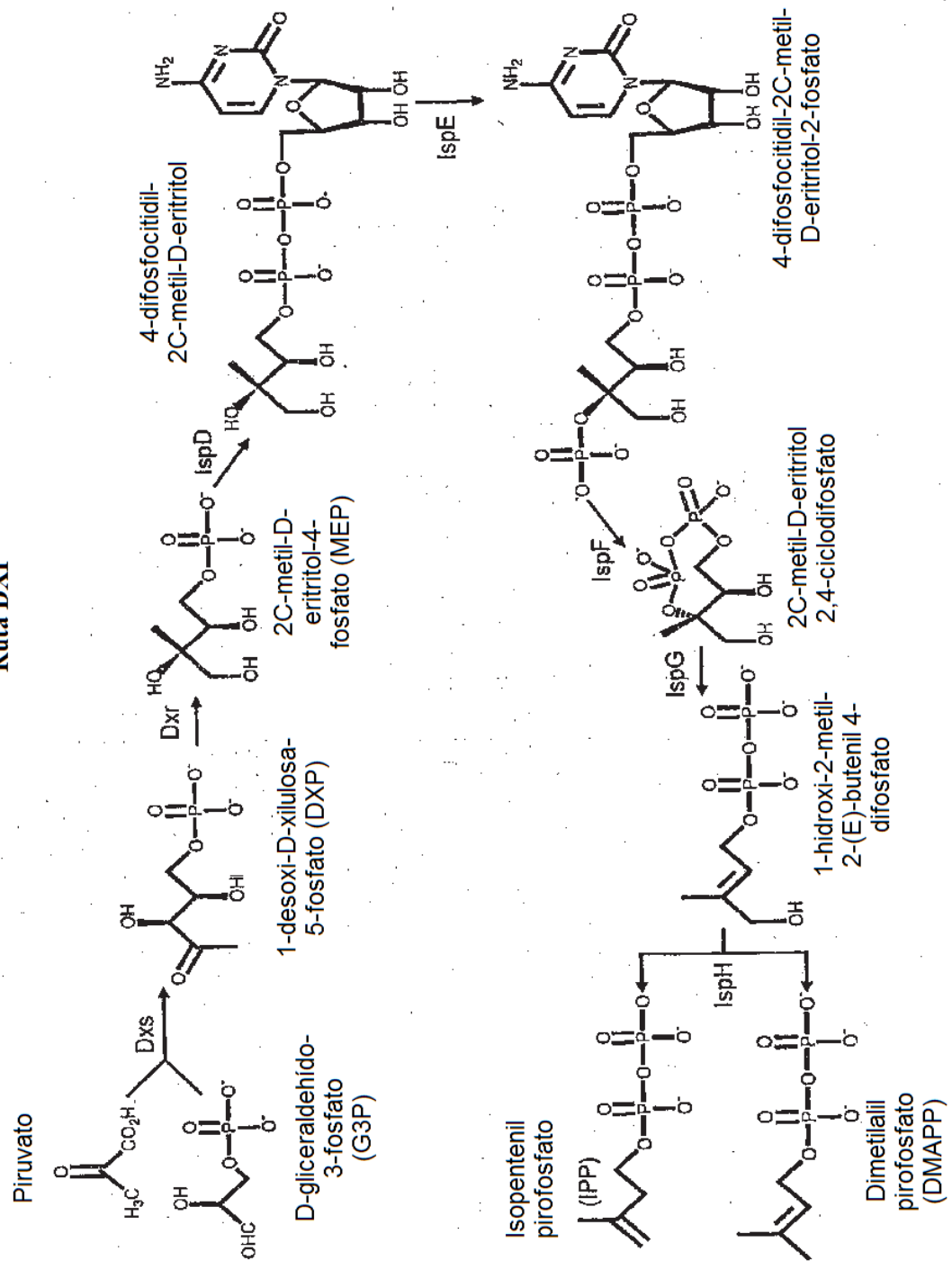


Figura 5

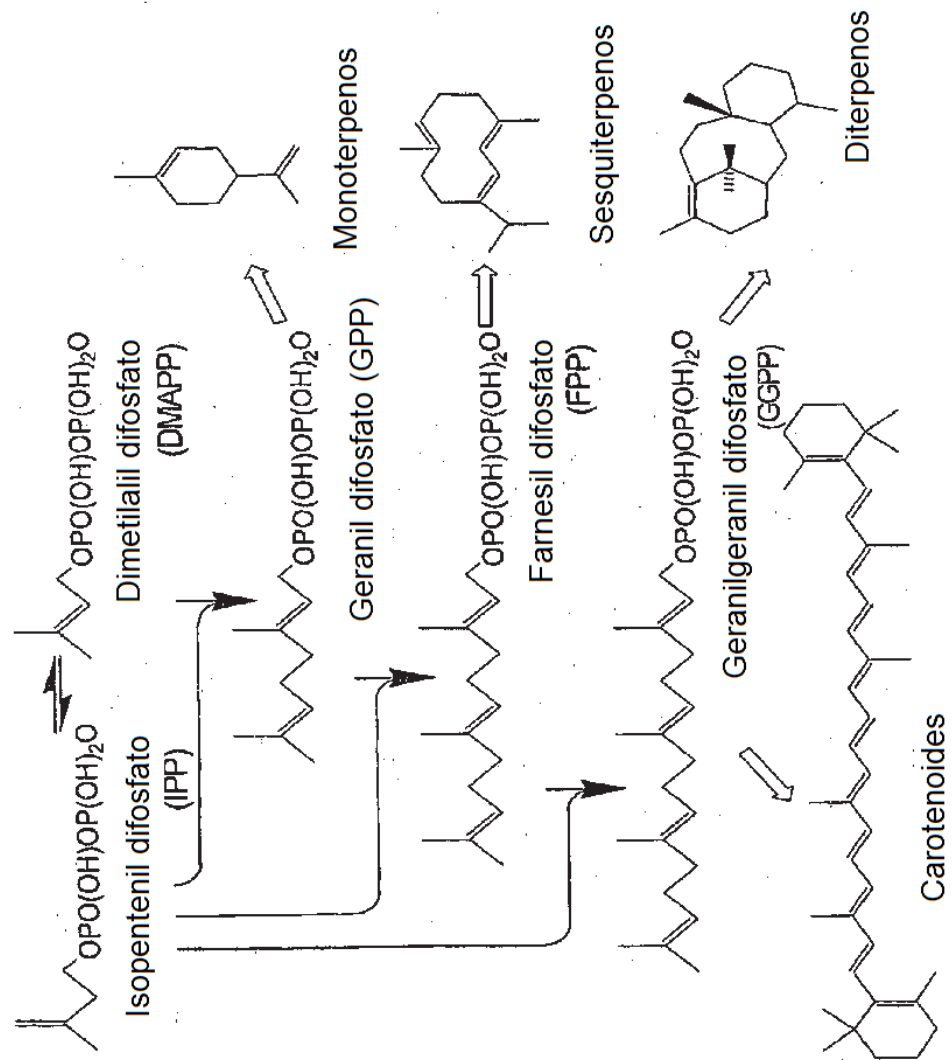


Figura 6

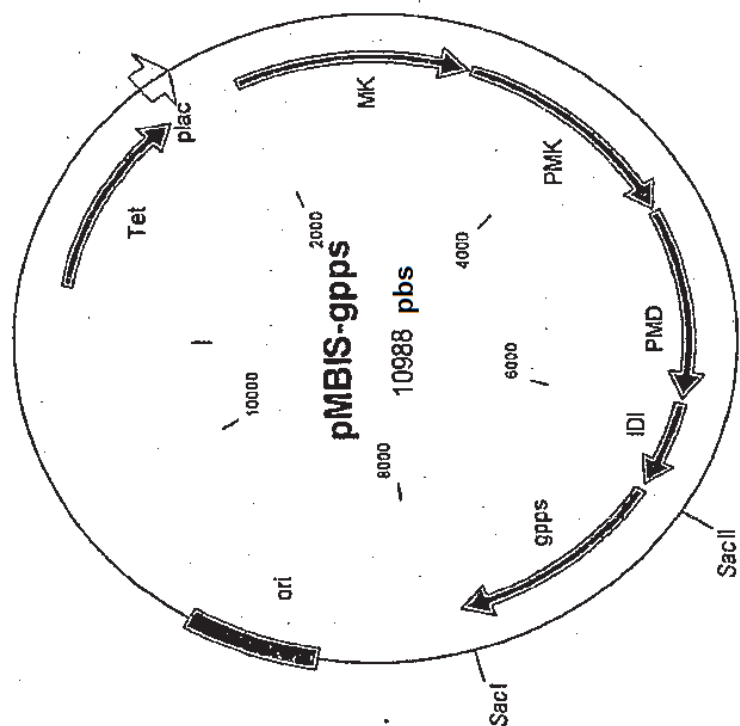


Figura 7

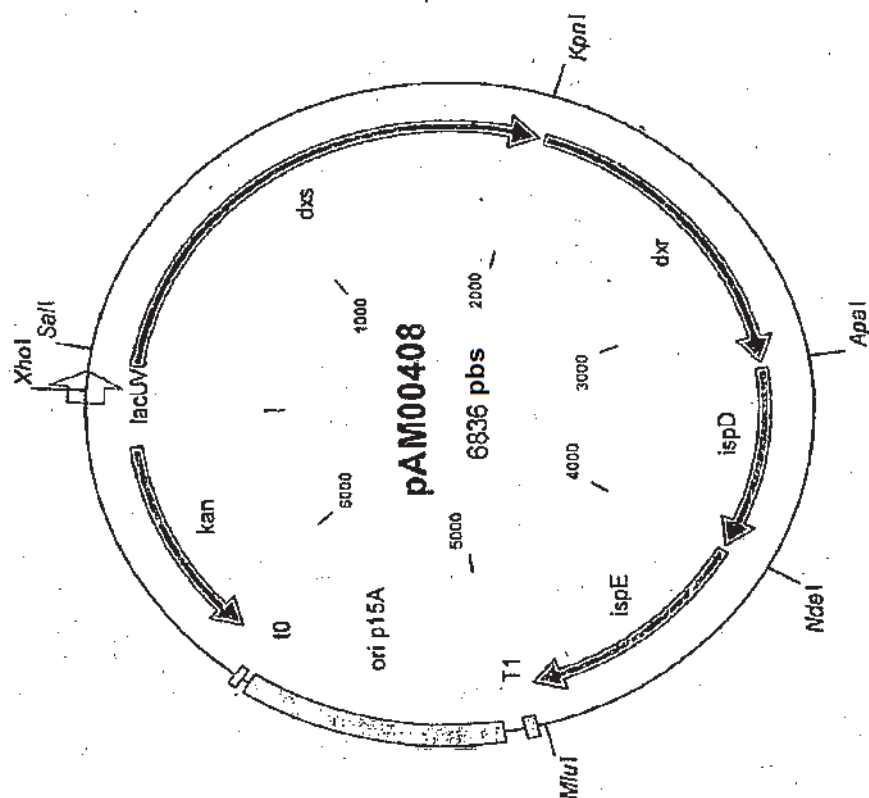


Figura 8

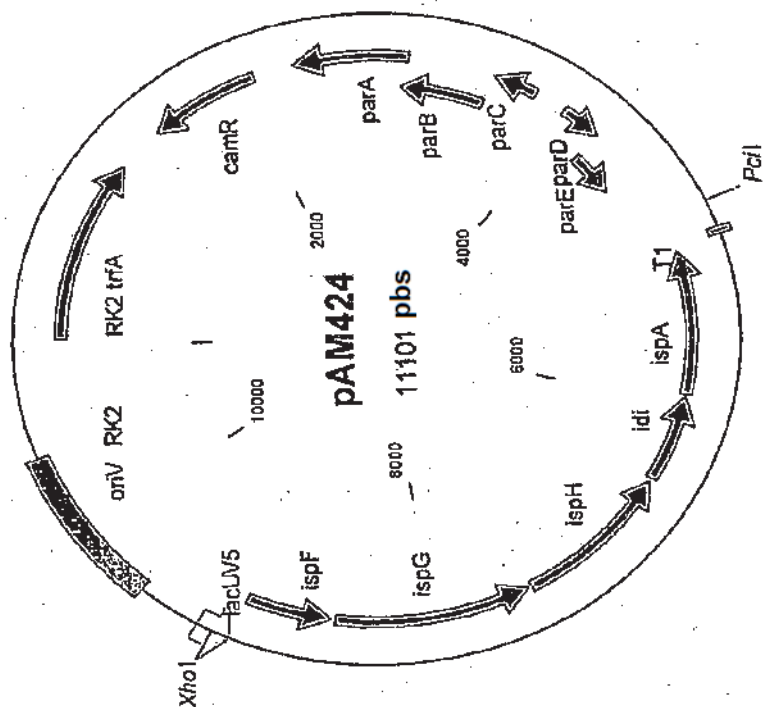
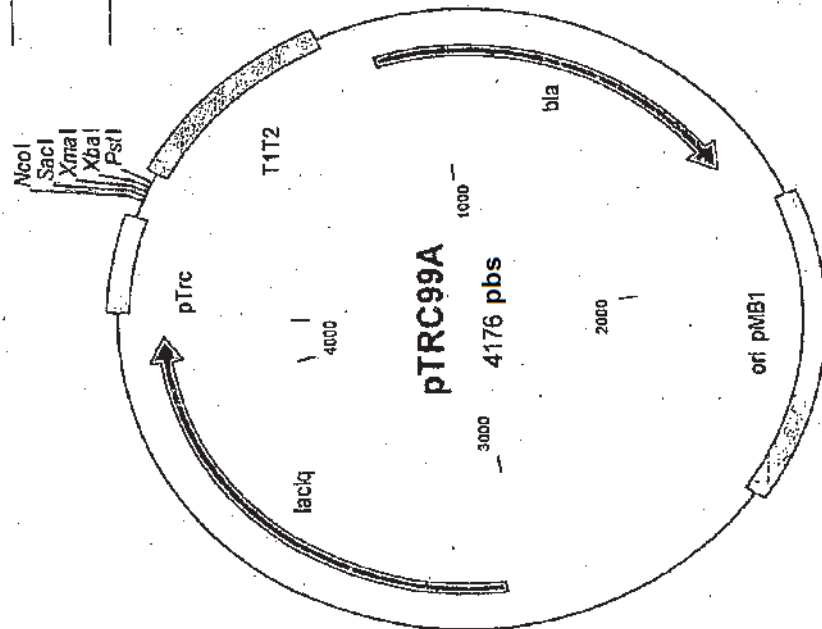


Figura 9



pTrc99A-ADS: inserto de ADS de ~1,6 kb en el sitio *NcoI XmaI*
 pTrc99A-FSA: inserto de FSA de ~1,7 kb en el sitio *NcoI SacI*
 pTrc99A-GTS: inserto de GTS de ~1,8 kb GTS en el sitio *XmaI XbaI*
 pTrc99A-APS: inserto de APS de ~1,9 kb en el sitio *XmaI XbaI*
 pTrc99A-TS: inserto de TS de ~1,9 kb en el sitio *XmaI XbaI*
 pTrc99A-BPS: inserto de BPS de ~1,7 kb en el sitio *XmaI XbaI*
 pTrc99A-PHS: inserto de PHS de ~1,9 kb en el sitio *XmaI XbaI*
 pTrc99A-SS: inserto de SS de ~1,8 kb en el sitio *XmaI XbaI*
 pTrc99A-LLS: inserto de LLS de ~1,7 kb en el sitio *NcoI XmaI*
 pTrc99A-CS: inserto de CS de ~1,8 kb en el sitio *NcoI XmaI*
 pTrc99A-LMS: inserto de LMS de ~1,9 kb en el sitio *XbaI PstI*
 pAM373: inserto de FSA de ~1,7 kb en el sitio *NcoI SacI*

Figura 10

