

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 484**

51 Int. Cl.:

C12P 23/00 (2006.01)

C12N 15/80 (2006.01)

A23L 1/275 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.03.2006 E 11167788 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2015 EP 2371967**

54 Título: **Producción de carotenoides en levadura y hongos oleaginosos**

30 Prioridad:

18.03.2005 US 663621 P

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

24.09.2015

73 Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)
Het Overloon 1
6411 TE Heerlen, NL**

72 Inventor/es:

**BAILEY, RICHARD;
MADDEN, KEVIN T. y
TRUEHEART, JOSHUA**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 546 484 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

Producción de carotenoides en levadura y hongos oleaginosos

5 **Antecedentes de la invención**

Los carotenoides son pigmentos orgánicos que varían en su color de amarillo a rojo que se producen de forma natural por ciertos organismos, incluyendo organismos fotosintéticos (por ejemplo plantas, algas, cianobacterias), y algunos hongos. Los carotenoides son responsables del color naranja de las zanahorias, así como del rosa en los flamencos y el salmón, y del rojo en las langostas y camarones. Los animales, sin embargo, no pueden producir carotenoides y deben recibirlos a través de su dieta.

Los pigmentos de carotenoides (por ejemplo, β -caroteno y astaxantina) se usan de forma industrial como ingredientes para alimentos y piensos, tanto cumpliendo una función nutricional como potenciando la aceptación del consumidor. Por ejemplo, la astaxantina se usa ampliamente en acuicultura de salmón para proporcionar la coloración naranja característica de sus homólogos silvestres. Algunos carotenoides también son precursores de vitamina A. Además, los carotenoides tienen propiedades antioxidantes, y pueden tener diversos beneficios para la salud (véase, por ejemplo, Jyonouchi *et al.*, *Nutr. Cancer* 16: 93, 1991; Giovannucci *et al.*, *J. Natl. Cancer Inst.* 87: 1767, 1995; Miki, *Pure Appl Chem* 63: 141, 1991; Chew *et al.*, *Anticancer Res.* 19: 1849, 1999; Wang *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 2452, 2000). Algunos carotenoides tales como β caroteno, licopeno y luteína se venden actualmente como complementos nutricionales.

En general, los sistemas biológicos que producen carotenoides son inabordables industrialmente y/o producen los compuestos a niveles tan bajos que el aislamiento a escala comercial no es practicable. Por lo tanto, la mayoría de los carotenoides usados en la industria se producen por síntesis química. Existe la necesidad de sistemas biológicos mejorados que producen carotenoides. Se han realizado algunos intentos previamente para modificar por ingeniería genética ciertas bacterias u hongos para producir niveles mayores de carotenoides (véase, por ejemplo, Misawa *et al.*, *J. Biotechnol.* 59 :169, 1998; Visser *et al.*, *FEMS Yeast Research* 4: 221, 2003; Creda-Olmed *et al.*, *Progress in Lipid Research*, Vol. 33, N° 1-2, pp. 185-192, 1994; Bhosale *et al.*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 55, N° 4, pp. 423-427, 2001; Schmidt-Dannert C, *Current Opinión in Biotechnology*, Vol. 11, N° 3, pp. 255-261, 2000; Lee *et al.*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 60, N° 1-2, pp.1-11, 2002). Sin embargo, son necesarios sistemas mejorados, que permitan mayores niveles de producción y mayor facilidad de aislamiento.

35 **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona un sistema mejorado para la producción biológica de carotenoides. El sistema se define por un hongo *Yarrowia* recombinante, caracterizado por que: a) el hongo es oleaginoso por que puede acumular lípidos hasta al menos el 20 % de su peso celular seco; y b) el hongo produce al menos un carotenoide, y puede acumular el carotenoide producido hasta al menos 1 % de su peso celular seco; en el que el hongo comprende una modificación carotenogénica, la modificación confiere al hongo la capacidad para producir el al menos un carotenoide a un nivel de al menos 1 % de su peso celular seco, la modificación carotenogénica aumenta la expresión o actividad de los siguientes polipéptidos carotenogénicos: polipéptido de GGPP sintasa, polipéptido de fitoeno sintasa, polipéptido de fitoeno deshidrogenasa, polipéptido de licopeno ciclasa, y polipéptido de HMG CoA reductasa y en el que los polipéptidos carotenogénicos derivan de un grupo de microorganismos que consiste en: *Y. lipolytica*, *M. circinelloides*, *S. cerevisiae*, *N. crassa*, *N. aromaticivorans*, *P. marcusii*.

Breve descripción de los dibujos

50 La *Figura 1A-1D* representa ciertos carotenoides comunes.

La *Figura 2* representa cómo pueden acumularse niveles suficientes de acetil-CoA y NADPH en el citosol de organismos oleaginosos para permitir la producción de niveles significativos de lípidos citosólicos. Enzimas: 1, piruvato descarboxilasa; 2, malato deshidrogenasa; 3, enzima málica; 4, piruvato deshidrogenasa, 5, citrato sintasa; 55 6, ATP-citrato liasa; 7, citrato/malato translocasa.

Las *Figuras 3A y 3B* representan la ruta de biosíntesis de isoprenoide de mevalonato, que actúa típicamente en eucariotas, incluyendo hongos.

60 La *Figura 4* representa la ruta de biosíntesis de isoprenoide independiente de mevalonato, también conocida como la ruta DXP, que típicamente actúa en bacterias y en los plástidos de plantas.

La *Figura 5* representa intermedios en la ruta de biosíntesis de isoprenoides y cómo alimentan rutas biosintéticas de otras biomoléculas, incluyendo carotenoides así como compuestos no carotenoides tales como esteroides, esteroides y vitaminas, tales como vitamina E o vitamina K.

Las Figuras 6A-6D ilustran diversas rutas biosintéticas de carotenoides. La Figura 6A destaca ramas que conducen a diversas xantofilas cíclicas y acíclicas; La Figura 6B muestra ciertas rutas de *X. dendrorhous* que generan carotenoides dicíclicos y monocíclicos, incluyendo astaxantina; la Figura 6C muestra rutas interconectadas para convertir β -caroteno en cualquiera de una diversidad de otros carotenoides, incluyendo astaxantina; la Figura 6D representa posibles vías de síntesis de carotenoides cíclicos y xantofilas vegetales y de algas habituales de neurosporeno.

Las Figuras 7A-7C muestran un alineamiento de ciertos polipéptidos de HMG-CoA reductasa fúngicos representativos. Como puede verse, estos polipéptidos muestran una identidad muy alta en toda la región catalítica, y también tienen dominios transmembrana complejos. En algunas realizaciones de la invención, estos dominios transmembrana se alteran o se retiran, de modo que, por ejemplo, puede producirse una versión hiperactiva del polipéptido.

Las Figuras 8A-8D representan representaciones esquemáticas de plásmidos generados y descritos en detalle en la ejemplificación.

Definiciones

Modificación carotenogénica: la expresión “modificación carotenogénica”, como se usa en el presente documento, se refiere a una modificación de un organismo hospedador que ajusta la producción de uno o más carotenoides, como se describe en el presente documento. Por ejemplo, una modificación carotenogénica puede aumentar el nivel de producción de uno o más carotenoides y/o puede alterar los niveles de producción relativos de diferentes carotenoides. En principio, una modificación carotenogénica de la invención puede ser cualquier modificación química, fisiológica, genética u otra modificación que altere de forma apropiada la producción de uno o más carotenoides en un organismo hospedador producido por ese organismo en comparación con el nivel producido en un organismo de otro modo idéntico no sujeto a la misma modificación. En la mayoría de las realizaciones, sin embargo, la modificación carotenogénica comprenderá una modificación genética, que da como resultado típicamente una producción aumentada de uno o más carotenoides seleccionados. En algunas realizaciones, el carotenoide seleccionado es uno o más de astaxantina, β -caroteno, cantaxantina, luteína, licopeno, fitoeno, zeaxantina y/o modificaciones de zeaxantina o astaxantina (por ejemplo, glucósido, zeaxantina esterificada o astaxantina). En algunas realizaciones, el carotenoide seleccionado es una o más xantofilas y/o una modificación de las mismas (por ejemplo, glucósido, xantofilas esterificadas). En ciertas realizaciones, la xantofila seleccionada se selecciona del grupo que consiste en astaxantina, luteína, zeaxantina, licopeno y modificaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el carotenoide seleccionado es uno o más de astaxantina, β -caroteno, cantaxantina, luteína, licopeno y zeaxantina y/o modificaciones de zeaxantina o astaxantina. En algunas realizaciones, el carotenoide es β -caroteno. En algunas realizaciones, el carotenoide seleccionado es astaxantina. En algunas realizaciones, el carotenoide seleccionado es distinto de β -caroteno.

Polipéptido carotenogénico: la expresión “polipéptido carotenogénico”, como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier polipéptido que esté implicado en el proceso de producir carotenoides en una célula, y puede incluir polipéptidos que están implicados en procesos distintos de la producción de carotenoides pero cuyas actividades afectan al alcance o nivel de la producción de uno o más carotenoides, por ejemplo eliminando un sustrato o reactivo utilizado por un polipéptido carotenogénico que está implicado directamente en la producción de carotenoides. Los polipéptidos carotenogénicos incluyen polipéptidos de biosíntesis de isoprenoides, polipéptidos de biosíntesis de carotenoides y polipéptidos competidores de biosíntesis de isoprenoides, como se definen en el presente documento esos términos. El término también abarca polipéptidos que pueden afectar al alcance en el que se acumulan carotenoides en cuerpos lipídicos.

Carotenoide: se entiende en la técnica que el término “carotenoide” se refiere a una clase estructuralmente diversa de pigmentos derivados de intermedios de rutas de isoprenoides. La etapa de compromiso en la biosíntesis de carotenoides es la formación de fitoeno a partir de geranilgeranilpirofosfato. Los carotenoides pueden ser acíclicos o cíclicos, y pueden contener o no oxígeno, de modo que el término carotenoides incluye tanto carotenos como xantofilas. En general, los carotenoides son compuestos de hidrocarburo que tienen un esqueleto de carbono polieno conjugado derivado formalmente del compuesto de cinco carbonos IPP, incluyendo triterpenos (diapocarotenoides C_{30}) y tetraterpenos (carotenoides C_{40}) así como sus derivados oxigenados y otros compuestos que son, por ejemplo, de C_{35} , C_{50} , C_{60} , C_{70} , C_{80} de longitud u otras longitudes. Muchos carotenoides tienen fuertes propiedades de absorción de la luz y pueden variar en su longitud en más de C_{200} . Los diapocarotenoides C_{30} consisten típicamente en seis unidades isoprenoides unidas de tal manera que la disposición de las unidades isoprenoides está invertida en el centro de la molécula de modo que los dos grupos metilos centrales estén en una relación posicional 1,6 y los grupos metilo no terminales restantes estén en una relación posicional 1,5. Dichos carotenoides C_{30} pueden derivar formalmente de la estructura $C_{30}H_{42}$ acíclica, que tiene una cadena central larga de dobles enlaces conjugados, mediante: (i) hidrogenación, (ii) deshidrogenación, (iii) ciclación, (iv) oxidación, (v) esterificación/glucosilación, o cualquier combinación de estos procesos. Los carotenoides C_{40} típicamente consisten en ocho unidades de isoprenoides unidas de tal manera que la disposición de las unidades isoprenoides esté invertida en el centro de la molécula de modo que los dos grupos metilos centrales estén en una relación posicional

1,6 y los grupos metilo no terminales restantes estén en una relación posicional 1,5. Dichos carotenoides C₄₀ pueden derivar formalmente de la estructura C₄₀H₅₆ acíclica, que tiene una cadena central larga de dobles enlaces conjugados, mediante: (i) hidrogenación, (ii) deshidrogenación, (iii) ciclación, (iv) oxidación, (v) esterificación/glucosilación, o cualquier combinación de estos procesos. La clase de carotenoides C₄₀ también incluye ciertos compuestos que surgen de reordenaciones del esqueleto de carbono, o mediante la retirada (formal) de parte de esta estructura. Se han identificado en la naturaleza más de 600 carotenoides diferentes; ciertos carotenoides comunes se representan en la Figura 1. Los carotenoides incluyen pero sin limitación: anteraxantina, adonirubina, adonixantina, astaxantina, cantaxantina, capsorubina, β-criptoxantina, α-caroteno, β-caroteno, β, ψ-caroteno, δ-caroteno, ε-caroteno, equinenona, 3-hidroxi equinenona, 3'-hidroxiequinenona, γ-caroteno, ψ-caroteno, 4-ceto-γ-caroteno, ζ-caroteno, α-criptoxantina, desoxiflexixantina, diatoxantina, 7,8-dideshidroastaxantina, dideshidroliscopeno, fucoxantina, fucoxantanol, isorrenierateno, β-isorrenierateno, lactucaxantina, luteína, licopeno, mixobactona, neoxantina, neurosporeno, hidroxineurosporeno, peridinina, fitoeno, rodopina, glucósido de rodopina, 4-ceto-rubixantina, sifonaxantina, esferoideno, esferoidenona, espiriloxantina, toruleno, 4-ceto-toruleno, 3-hidroxi-4-ceto-toruleno, uriolida, acetato de uriolida, violaxantina, zeaxantina-β-diglucósido, zeaxantina y carotenoides C₃₀. Adicionalmente, los compuestos carotenoides incluyen derivados de estas moléculas, que pueden incluir grupos funcionales hidroxilo, metoxi, oxo, epoxi, carboxi o aldehídico. Además, los compuestos carotenoides incluidos incluyen derivados de éster (por ejemplo, éster de glucósido, éster de ácido graso) y sulfato (por ejemplo, xantofilas esterificadas).

Polipéptido de biosíntesis de carotenoides: la expresión “polipéptido de biosíntesis de carotenoides” se refiere a cualquier polipéptido que esté implicado en la síntesis de uno o más carotenoides. Para mencionar solamente algunos, estos polipéptidos de biosíntesis de carotenoides incluyen, por ejemplo, polipéptidos de fitoeno sintasa, fitoeno deshidrogenasa (o desaturasa), licopeno ciclasa, carotenoide cetolasa, carotenoide hidroxilasa, astaxantina sintasa, carotenoide épsilon hidroxilasa, licopeno ciclasa (subunidades beta y épsilon), carotenoide glucosiltransferasa y acil CoA:diacilglicerol aciltransferasa. Se presentan ejemplos representativos de secuencias polipéptidos de biosíntesis de carotenoides en las Tablas 11-19.

Gen: el término “gen”, como se usa en el presente documento, se refiere en general a un ácido nucleico que codifica un polipéptido, que incluye opcionalmente ciertos elementos reguladores que pueden afectar a la expresión de uno o más productos génicos (es decir, ARN o proteína).

Heterólogo: el término “heterólogo”, como se usa en el presente documento para hacer referencia a genes o polipéptidos, se refiere a un gen o polipéptido que no aparece de forma natural en el organismo en el que se expresa. Se entenderá que, en general, cuando se selecciona un gen heterólogo o polipéptido para introducción en y/o expresión por una célula hospedadora, el organismo fuente particular del que puede seleccionarse el gen o polipéptido heterólogo no es esencial para la práctica de la presente invención. Las consideraciones relevantes pueden incluir, por ejemplo, lo estrechamente relacionados que están la fuente potencial y los organismos hospedadores en la evolución, o lo relacionado que está el organismo fuente con otros organismos fuente de los que se han seleccionado secuencias de otros polipéptidos relevantes.

Célula hospedadora: como se usa en el presente documento, la “célula hospedadora” es una célula fúngica de *Yarrowia* que se manipula de acuerdo con la presente invención.

Aislado: el término “aislado”, como se usa en el presente documento, significa que la entidad aislada se ha separado de al menos un componente con el que estaba asociado previamente. Cuando la mayoría de los otros componentes se han retirado, la entidad aislada está “purificada”. Pueden realizarse aislamiento y/o purificación usando cualquier técnica conocida en este campo incluyendo, por ejemplo, fraccionamiento, extracción, precipitación u otra separación.

Polipéptido competidor de biosíntesis de isoprenoides: la expresión “polipéptido competidor de biosíntesis de isoprenoides”, como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido cuya expresión en una célula reduce el nivel de geranylgeranyl difosfato (GGPP) disponible para entrar en la ruta de biosíntesis de carotenoides. Por ejemplo, los polipéptidos competidores de biosíntesis de isoprenoides incluyen enzimas que actúan en intermedios de isoprenoides antes que el GGPP, de modo que se genere menos GGPP (véase, por ejemplo, Figura 5). La escualeno sintasa es solamente un polipéptido competidor de biosíntesis de isoprenoides de acuerdo con la presente invención; se presentan secuencias de escualeno sintasa representativas en la Tabla 10. Las enzimas de prenildifosfato sintasa y *para*-hidroxibenzoato (PHB) polipreniltransferasa son polipéptidos competidores de biosíntesis de isoprenoides adicionales de acuerdo con la presente invención; se presentan polipéptidos de enzimas de prenildifosfato sintasa y PHB polipreniltransferasa representativos en la Tabla 29 y 30, respectivamente.

Polipéptido de biosíntesis de isoprenoides: la expresión “polipéptido de biosíntesis de isoprenoides” se refiere a cualquier polipéptido que esté implicado en la síntesis de isoprenoides. Por ejemplo, como se analiza en el presente documento, acetoacetil-CoA tiolasa, HMG-CoA sintasa, HMG-CoA reductasa, mevalonato quinasa, fosfomevalonato quinasa, mevalonato pirofosfato descarboxilasa, IPP isomerasa, FPP sintasa y GGPP sintasa, están todas implicadas en la ruta del mevalonato para biosíntesis de isoprenoides. Cada una de estas proteínas también es un

polipéptido de biosíntesis de isoprenoides para fines de la presente invención, y se proporcionan secuencias de ejemplos representativos de estas enzimas en las Tablas 1-9.

Ruta de isoprenoides: se entiende en la técnica que la "ruta de isoprenoides" se refiere a una ruta metabólica que produce o utiliza el metabolito de cinco carbonos isopentil pirofosfato (IPP). Como se analiza en el presente documento, dos rutas diferentes pueden producir el precursor de isoprenoide común IPP, la "ruta de mevalonato" y la "ruta no de mevalonato". La expresión "ruta de isoprenoides" es suficientemente general para abarcar ambos de estos tipos de ruta. La biosíntesis de isoprenoides de IPP sucede por polimerización de varias subunidades de isopreno de cinco carbonos. Los metabolitos de isoprenoides derivados de IPP son de diverso tamaño y estructura química, incluyendo moléculas tanto cíclicas como acíclicas. Los metabolitos isoprenoides incluyen, pero sin limitación, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, esteroides y poliprenos tales como carotenoides.

Oleaginoso: el término "oleaginoso", se refiere a la capacidad de un organismo para acumular lípido hasta al menos aproximadamente el 20 % de su peso celular seco. En ciertas realizaciones de la invención, la levadura o los hongos oleaginosos acumulan lípidos hasta al menos aproximadamente el 25 % de su peso celular seco. En otras realizaciones, la levadura o los hongos oleaginosos de la invención acumulan lípidos dentro del intervalo de aproximadamente 20-45 % de su peso celular seco. En algunas realizaciones, los organismos oleaginosos pueden acumular lípidos hasta tanto como aproximadamente el 70 % de su peso celular seco. En algunas realizaciones de la invención, los organismos oleaginosos pueden acumular una fracción grande de acumulación de lípidos totales en forma de triacilglicerol. En ciertas realizaciones, la mayoría del lípido acumulado está en forma de triacilglicerol. Como alternativa o adicionalmente, el lípido puede acumularse en forma de cuerpos lipídicos intracelulares, o cuerpos oleosos. En ciertas realizaciones, la presente invención utiliza levadura u hongos que son oleaginosos de forma natural. En algunos aspectos, los organismos oleaginosos de forma natural se manipulan (por ejemplo, genéticamente, químicamente, o de otro modo) para aumentar adicionalmente el nivel de lípido acumulado en el organismo. En otras realizaciones, se manipulan levadura u hongos que no son oleaginosos de forma natural (por ejemplo de forma genética, química o de otro modo) para acumular lípidos como se describe en el presente documento.

Polipéptido: el término "polipéptido", como se usa en el presente documento, generalmente tiene su significado reconocido en la técnica de un polímero de al menos tres aminoácidos. Sin embargo, el término también se usa para hacer referencia a clases de polipéptidos funcionales específicas, tales como, por ejemplo, polipéptidos oleaginosos, polipéptidos carotenogénicos, polipéptidos de biosíntesis de isoprenoides, polipéptidos de biosíntesis de carotenoides y polipéptidos competidores de biosíntesis de isoprenoides. Para cada una de dichas clases, la presente memoria descriptiva proporciona varios ejemplos de secuencias conocidas de dichos polipéptidos. Los expertos habituales en la materia apreciarán, sin embargo, que se pretende que el término "polipéptido" sea suficientemente general para abarcar no solamente polipéptidos que tengan la secuencia completa indicada en el presente documento (o en una referencia o base de datos mencionada específicamente en el presente documento), sino que también abarca polipéptidos que representan fragmentos funcionales (es decir, fragmentos que conservan al menos una actividad) de dichos polipéptidos completos. Además, los expertos en la materia entienden que las secuencias proteicas toleran en general alguna sustitución sin destruir la actividad. Por lo tanto, cualquier polipéptido que conserve actividad y comparta al menos aproximadamente 30-40 % de la identidad de secuencia general, con frecuencia mayor de aproximadamente el 50 %, 60 %, 70 % u 80 %, y más habitualmente incluyendo al menos una región de mucha mayor identidad, con frecuencia mayor del 90 % o incluso 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % en una o más regiones altamente conservadas (por ejemplo, polipéptidos de isocitrato deshidrogenasa comparten con frecuencia un motivo de unión a AMP conservado; polipéptidos de HMG-CoA reductasa típicamente incluyen un dominio catalítico altamente conservado (véase por ejemplo, Figura 7); acetil CoA carboxilasa típicamente tiene un dominio de carboxilo transferasa; véase, por ejemplo, Downing *et al.*, *Chem. Abs.* 93: 484, 1980; Gil *et al.*, *Cell* 41: 249, 1985; Jitrapakdee *et al.* *Curr Protein Pept Sci.* 4: 217, 2003; Patente de Estados Unidos Número 5.349.126), que abarca habitualmente al menos 3-4 y con frecuencia hasta 20 o más aminoácidos, con otro polipéptido de la misma clase, está abarcado dentro del término relevante "polipéptido" como se usa en el presente documento.

Organismo fuente: la expresión "organismo fuente", como se usa en el presente documento, se refiere al organismo en el que puede encontrarse en la naturaleza una secuencia polipeptídica particular. Por lo tanto, por ejemplo, si uno o más polipéptidos heterólogos se expresan en un organismo hospedador, el organismo en el que se expresan los polipéptidos en la naturaleza (y/o del que se clonaron originalmente sus genes) se denomina el "organismo fuente". Cuando se expresan más de un polipéptido heterólogo en un organismo hospedador, pueden utilizarse uno o más organismos fuente para selección independiente de cada uno de los polipéptido heterólogos.

Descripción detallada de la invención

Modificación técnica de la producción de carotenoides

Los carotenoides se sintetizan a partir de precursores isoprenoides, algunos de los cuales también está implicados en la producción de esteroides y esteroides. La ruta de biosíntesis de isoprenoides más habitual, denominada en ocasiones la "ruta de mevalonato", se representa en general en la Figura 3. Como se muestra, acetil-CoA se convierte, mediante hidroximetilglutaril-CoA (HMG-CoA), en mevalonato. El mevalonato se fosforila después y se

convierte en el compuesto de cinco carbonos isopentenil pirofosfato (IPP). Después de la isomerización de IPP en dimetilalil pirofosfato (DMAPP), tres reacciones de condensación secuenciales con moléculas adicionales de IPP generan la molécula de diez carbonos geranil pirofosfato (GPP), seguido de la molécula de quince carbonos farnesil pirofosfato (FPP), y finalmente el compuesto de veinte carbonos geranilgeranil pirofosfato (GGPP).

Una ruta de biosíntesis de isoprenoides alternativa, que se utiliza por algunos organismos (particularmente bacterias) y se denomina en ocasiones la "ruta independiente de mevalonato", se representa en la Figura 4. Esta ruta se inicia por la síntesis de 1-desoxi-D-xiloglucosa-5-fosfato (DOXP) a partir de piruvato y gliceraldehído-3-fosfato. DOXP se convierte después, mediante una serie de reacciones mostradas en la Figura 4, en IPP, que se isomeriza en DMAPP y después se convierte, mediante GPP y FPP, en GGPP como se muestra en la Figura 3 y se ha analizado anteriormente.

Se han identificado diversas proteínas implicadas en la biosíntesis de isoprenoides y se han caracterizado en varios organismos. Además, se conservan diversos aspectos de la ruta de biosíntesis de isoprenoides a lo largo de los reinos fúngico, bacteriano, vegetal y animal. Por ejemplo, se han identificado polipéptidos correspondientes a la acetoacetil-CoA tiolasa, HMG-CoA sintasa, HMG-CoA reductasa, mevalonato quinasa, fosfomevalonato quinasa, mevalonato pirofosfato descarboxilasa, IPP isomerasa, FPP sintasa y GGPP sintasa mostradas en la Figura 3 y se han aislado de una amplia diversidad de organismos y células. Se proporcionan ejemplos representativos de una amplia diversidad de dichos polipéptidos en las Tablas 1-9. Puede utilizarse o derivarse para su uso en los métodos y composiciones de acuerdo con la presente invención uno o más de los polipéptidos seleccionados de los proporcionados en una cualquiera de las Tablas 1-9.

De acuerdo con la presente invención, la producción de carotenoides en *Yarrowia* se ajusta modificando la expresión o actividad de los polipéptidos de GGPP sintasa y/o HMG CoA reductasa implicados en la biosíntesis de isoprenoides. En algunas realizaciones, dicha modificación implica la introducción de uno o más polipéptidos de biosíntesis de isoprenoides heterólogos en la célula hospedadora; como alternativa o adicionalmente, pueden realizarse modificaciones a la expresión o actividad de uno o más polipéptidos de biosíntesis de isoprenoides endógenos o heterólogos. Dada la considerable conservación de componentes de los polipéptidos de biosíntesis de isoprenoides, se espera que los polipéptidos de biosíntesis de isoprenoides heterólogos actúen con frecuencia incluso en organismos significativamente divergentes. Además, si fuera deseable introducir más de un polipéptido de biosíntesis de isoprenoides heterólogo, en muchos casos actuarán juntos polipéptidos de diferentes organismos fuente. En algunas realizaciones de la invención, se introduce una pluralidad de diferentes polipéptidos de biosíntesis de isoprenoides heterólogos en la misma célula hospedadora. En algunas realizaciones, esta pluralidad contiene solamente polipéptidos del mismo organismo fuente (por ejemplo, dos o más secuencias de, o secuencias derivadas de, el mismo organismo fuente); en otras realizaciones la pluralidad incluye polipéptidos seleccionados de forma independiente de diferentes organismos fuente (por ejemplo, dos o más secuencias de, o secuencias derivadas de, al menos dos organismos fuente independientes).

En algunas realizaciones de la presente invención que utilizan polipéptidos de biosíntesis de isoprenoides heterólogos, los organismos fuente incluyen, pero sin limitación, hongos de los géneros *Mucor*, *Yarrowia*, *Neurospora*, *Saccharomyces*. En ciertas realizaciones, los organismos fuente son de una especie incluyendo, pero sin limitación, *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Yarrowia lipolytica*.

Como se ha indicado anteriormente, la ruta de biosíntesis de isoprenoides también está implicada en la producción de compuestos no carotenoides, tales como esteroides, esteroides y vitaminas, tales como vitamina E o vitamina K. Las proteínas que actúan en intermedios de la ruta de la biosíntesis de isoprenoides, y los desvía a la biosíntesis de compuestos no carotenoides son por lo tanto inhibidores indirectos de la biosíntesis de carotenoides (véase, por ejemplo, Figura 5, que ilustra puntos en los que se dirigen intermedios de isoprenoides a otras rutas de biosíntesis). Dichas proteínas se consideran por lo tanto polipéptidos competidores de la biosíntesis de isoprenoides.

La ruta de la biosíntesis de carotenoides se ramifica de la ruta de biosíntesis de isoprenoides en el punto en el que se forma el GGPP. La etapa de compromiso en la biosíntesis de carotenoides es la formación de fitoeno por la condensación de cabeza a cabeza de dos moléculas de GGPP, catalizada por la fitoeno sintasa (denominada con frecuencia crtB; véase Figura 6). Una serie de reacciones de deshidrogenación, cada una de las cuales aumenta el número de dobles enlaces conjugados por dos, convierte el fitoeno a licopeno mediante neurosporeno. La ruta se ramifica en diversos puntos, tanto antes como después de la producción de licopeno, de modo que puede generarse una amplia serie de carotenoides. Por ejemplo, la acción de una enzima ciclasa en licopeno genera γ -caroteno, la acción de una desaturasa en su lugar produce 3,4-dideshidrolicopeno. γ -caroteno se convierte en β -caroteno mediante la acción de una ciclasa. β -caroteno puede procesarse en cualquiera de varios productos (véase, por ejemplo, Figura 6C), incluyendo astaxantina (mediante equinona, hidroxiequinona y fenicoxantina).

De acuerdo con la presente invención, la producción de carotenoides en *Yarrowia* se ajusta modificando la expresión o actividad de las siguientes proteínas implicadas en la biosíntesis de carotenoides: polipéptido de fitoeno sintasa, polipéptido de fitoeno deshidrogenasa, polipéptido de licopeno ciclasa.

De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, será deseable introducir uno o más polipéptidos carotenogénicos heterólogos en *Yarrowia*. Como resultará evidente para los expertos en la materia, puede emplearse cualquiera de una diversidad de polipéptidos heterólogos; la selección tendrá en cuenta, por ejemplo, el carotenoide particular cuya producción va a potenciarse. La presente invención contempla no solamente la introducción de polipéptidos carotenogénicos heterólogos, sino también el ajuste de los niveles de expresión o actividad de polipéptidos carotenogénicos heterólogos o endógenos, incluyendo, por ejemplo, la alteración de patrones de expresión constitutivos o inducibles. En algunas realizaciones de la invención, los patrones de expresión se ajustan de modo que no se requiera crecimiento en condiciones de nutrientes limitantes para inducir oleaginía. Por ejemplo, pueden utilizarse modificaciones genéticas que comprenden alteración y/o adición de secuencias reguladoras (por ejemplo, elementos promotores, elementos terminadores) para conferir regulación particular de los patrones de expresión. Dichas modificaciones genéticas pueden utilizarse junto con genes endógenos (por ejemplo, para regulación de carotenogénico endógeno); como alternativa, dichas modificaciones genéticas pueden incluirse para conferir regulación de la expresión de al menos un polipéptido heterólogo (por ejemplo, polipéptido o polipéptidos carotenogénicos). Por ejemplo, pueden usarse promotores que incluyen, pero sin limitación, promotores de *Tef1*, *Gpd1* junto con genes endógenos y/o genes heterólogos para modificación de los patrones de expresión de un polipéptido o polipéptidos carotenogénicos endógenos y/o un polipéptido o polipéptidos carotenogénicos heterólogos. De forma similar, las secuencias terminadoras ejemplares incluyen, pero sin limitación, uso de secuencias terminadores de *XPR2* de *Y. lipolytica*.

Como se indica en la Figura 6 y en la bibliografía, las proteínas implicadas en la biosíntesis de carotenoides incluyen, pero sin limitación, fitoeno sintasa, fitoeno deshidrogenasa, licopeno ciclasa, carotenoide cetolasa, carotenoide hidroxilasa, astaxantina sintasa (una única enzima multifuncional hallada en algunos organismos fuente que típicamente tiene actividades tanto cetolasa como hidroxilasa), carotenoide épsilon hidroxilasa, licopeno ciclasa (subunidades beta y épsilon), carotenoide glucosiltransferasa y acil CoA:diaciglicerol aciltransferasa. Se proporcionan secuencias ejemplares representativas para estos polipéptidos de biosíntesis de carotenoides en las Tabla 11-19.

Las xantofilas pueden distinguirse de otros carotenoides por la presencia de grupos funcionales que contienen oxígeno en sus grupos finales cíclicos. Por ejemplo, la luteína y zeaxantina contienen un único grupo hidroxilo en cada una de las estructuras de anillo terminal, mientras que la astaxantina contiene tanto un grupo ceto como un hidroxilo en cada anillo terminal. Esta propiedad hace a las xantofilas más polares que los carotenos tales como beta caroteno y licopeno, y por lo tanto reduce drásticamente su solubilidad en grasas y lípidos. Se encuentran con frecuencia xantofilas de origen natural como ésteres de los grupos hidroxilo terminales, tanto mono como diésteres de ácidos grasos. También aparecen como glucósidos en ciertas especies de bacterias. La solubilidad y capacidad de dispersión de las xantofilas puede modificarse en gran medida mediante la adición de restos de éster, y se sabe que la esterificación también puede afectar a la capacidad de absorción y/o biodisponibilidad de un carotenoide dado. Es un objetivo de la presente invención maximizar la cantidad de una xantofila particular que se acumula dentro de la fracción de triacilglicérido intracelular de levaduras oleaginosas, y un mecanismo para conseguir este objetivo es aumentar la naturaleza hidrófoba del producto de xantofila que se acumula. Un modo de conseguirlo es modificar técnicamente la producción de mono y/o diésteres de acilo graso del compuesto de xantofila diana.

Una diversidad de enzimas pueden actuar para esterificar los carotenoides. Por ejemplo, se han identificado carotenoide glucosiltransferasas en varias especies bacterianas (véase, por ejemplo, Tabla 18). Además, la acil CoA:diaciglicerol aciltransferasa (DGAT) y acil CoA:monoacilglicerol aciltransferasas (MGAT), que actúan en las etapas finales de la biosíntesis de triacilglicerol, probablemente cumplan un papel adicional en la esterificación de xantofilas. Se muestran polipéptidos de DGAT representativos en la Tabla 19. Además, otras enzimas pueden modificar específicamente carotenoides y moléculas de estructura similar (por ejemplo esteroides) y estar disponibles para modificación y producción de éster.

Se apreciará que la modificación carotenogénica particular para aplicar a una célula hospedadora de acuerdo con la presente invención se verá influida por el carotenoide o los carotenoides que se deseen producir. Por ejemplo, los polipéptidos de biosíntesis de isoprenoides son relevantes para la producción de la mayoría de carotenoides. Los polipéptidos de biosíntesis de carotenoides también son relevantes en general. La cetolasa es particularmente relevante para la producción de cantaxantina, como la hidroxilasa lo es para la producción de luteína y zeaxantina, entre otras. Tanto hidrolasa como acetolasa (o astaxantina sintasa) son particularmente útiles para la producción de astaxantina.

Producción y aislamiento de carotenoides

Como se ha analizado anteriormente, la acumulación de cuerpos lipídicos en organismos oleaginosos se induce en general cultivando el organismo relevante en presencia de fuente de carbono excesiva y nitrógeno limitante. Las condiciones específicas para inducir dicha acumulación se han establecido previamente para varios organismos oleaginosos diferentes (véase, por ejemplo, Wolf (ed.) *Nonconventional yeasts in biotechnology* Vol. 1, Springer-Verlag, Berlín, Alemania, pp. 313-338; *Lipids* 18(9): 623, 1983; *Indian J. Exp. Biol.* 35(3): 313, 1997; *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30(1): 75, 2003; *Bioresour Technol.* 95(3): 287, 2004).

En general, será deseable cultivar células hospedadoras modificadas de la invención en condiciones que permitan la acumulación de al menos aproximadamente el 20 % de su peso celular seco como lípido. En otras realizaciones, las células hospedadoras modificadas de la invención se cultivan en condiciones que permiten la acumulación de al menos aproximadamente 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, o incluso 80 % o más de su peso celular seco como lípidos. En ciertas realizaciones, las células hospedadoras utilizadas son células que son de forma natural oleaginosas, y se induce que produzcan lípidos a los niveles deseados.

En ciertas realizaciones de la invención, será deseable acumular carotenoides a niveles (es decir, teniendo en cuenta la cantidad total de todos los carotenoides producidos juntos) que son mayores que al menos aproximadamente el 1 % del peso seco de las células. En algunas realizaciones, la acumulación de carotenoides total en los cuerpos lipídicos será hasta un nivel de al menos aproximadamente 2 %, al menos aproximadamente 3 %, al menos aproximadamente 4 %, al menos aproximadamente 5 %, al menos aproximadamente 6 %, al menos aproximadamente 7 %, al menos aproximadamente 8 %, al menos aproximadamente 9 %, al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 11 %, al menos aproximadamente 12 %, al menos aproximadamente 13 %, al menos aproximadamente 14 %, al menos aproximadamente 15 %, al menos aproximadamente 16 %, al menos aproximadamente 17 %, al menos aproximadamente 18 %, al menos aproximadamente 19 %, al menos aproximadamente 20 % o más del peso seco total de las células. En ciertas realizaciones de la invención, será deseable conseguir niveles totales de acumulación de carotenoides en los cuerpos lipídicos (es decir, teniendo en cuenta la cantidad total de todos los carotenoides producidos juntos) que sean mayores que al menos aproximadamente 1 % del peso seco de las células. En algunas realizaciones, la acumulación de carotenoides total en los cuerpos lipídicos será hasta un nivel de al menos aproximadamente 2 %, al menos aproximadamente 3 %, al menos aproximadamente 4 %, al menos aproximadamente 5 %, al menos aproximadamente 6 %, al menos aproximadamente 7 %, al menos aproximadamente 8 %, al menos aproximadamente 9 %, al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 11 %, al menos aproximadamente 12 %, al menos aproximadamente 13 %, al menos aproximadamente 14 %, al menos aproximadamente 15 %, al menos aproximadamente 16 %, al menos aproximadamente 17 %, al menos aproximadamente 18 %, al menos aproximadamente 19 %, al menos aproximadamente 20 % o más del peso seco total de las células.

Genes carotenogénicos bacterianos ya han demostrado que son transferibles a otros organismos, y son por lo tanto particularmente útiles de acuerdo con la presente invención (véase, por ejemplo, Miura *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1226, 1998).

En ciertas realizaciones, la fitoeno sintasa/licopeno ciclasa multifuncional de *Mucor circinelloides* y los genes de fitoeno deshidrogenasa de *Neurospora crassa* pueden expresarse en *Yarrowia lipolytica*. La sobreexpresión posterior del dominio catalítico de hidroximetilglutaril-CoA reductasa de *N. crassa* y/o el tratamiento de las cepas de *Y. lipolytica* modificadas con el inhibidor de escualeno sintasa ácido zaragócico aumenta adicionalmente la producción de carotenoides. Finalmente, se expresan genes de *Paracoccus marcusii* que codifican enzimas carotenoide hidroxilasa y carotenoide cetolasa en cepas productoras de β -caroteno de *Y. lipolytica*, y esta modificación da como resultado la acumulación de astaxantina. Podrían emplearse enfoques similares para potenciar la producción de carotenoides en otros organismos hospedadores oleaginosos o no oleaginosos, pudiendo llevarse a cabo usando polipéptidos carotenogénicos iguales, homólogos o funcionalmente similares.

Debería observarse que, para organismos de la invención que producen más de un carotenoide, será en ocasiones posible ajustar las cantidades relativas de carotenoides individuales producidos ajustando las condiciones de cultivo. Por ejemplo, se ha indicado que el control de la concentración de oxígeno disuelto en un cultivo durante el cultivo puede regular los niveles de producción relativos de ciertos carotenoides tales como β -caroteno, equinenona, β -criptoxantina, 3-hidroxi equinenona, asteroideona, cantaxantina, zeaxantina, adonirubina, adonixantina y astaxantina (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos Número 6.825.002 de Tsubokura *et al.*).

Particularmente, para realizaciones de la presente invención dirigidas a la producción de astaxantina, será con frecuencia deseable utilizar uno o más genes de un organismo productor de astaxantina natural. Cuando vayan a expresarse múltiples polipéptidos heterólogos, puede ser deseable utilizar el mismo organismo fuente para todos, o utilizar organismos fuente estrechamente relacionado.

Una ventaja proporcionada por la presente invención es que, además de permitir la producción de altos niveles de carotenoides, la presente invención permite aislar fácilmente esos compuestos producidos debido a que se acumulan en los cuerpos lipídicos dentro de organismos oleaginosos. Se han establecido métodos y sistemas para aislar cuerpos lipídicos para una amplia diversidad de organismos oleaginosos (véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos 5.164.308; 5.374.657; 5.422.247; 5.550.156; 5.583.019; 6.166.231; 6.541.049; 6.727.373; 6.750.048; y 6.812.001). Brevemente, se recuperan células típicamente de cultivo, con frecuencia por secado por pulverización, filtración o centrifugación. En algunos casos, las células se homogeneizan y después se someten a extracción de líquido supercrítico o extracción de disolvente (por ejemplo, con disolventes tales como cloroformo, hexano, cloruro de metileno, metanol, isopropanol, etil acetato, etc.), produciendo una suspensión de aceite en bruto. Esta suspensión de aceite puede refinarse opcionalmente como se conoce en la técnica. Pueden usarse

aceites refinados directamente como pienso o aditivos alimentarios. Como alternativa o adicionalmente, los carotenoides pueden aislarse del aceite usando técnicas convencionales.

Dada la sensibilidad de los carotenoides generalmente a la oxidación, muchas realizaciones de la invención emplean estabilizantes oxidativos (por ejemplo, tocoferoles, vitamina C; etoxiquina; vitamina E, BHT, BHA, TBHQ, etc., o combinaciones de los mismos) durante y/o después del aislamiento de carotenoides. Como alternativa o adicionalmente, puede emplearse microencapsulación, por ejemplo con proteínas, para añadir una barrera física a la oxidación y/o para mejorar la manipulación (véase, por ejemplo, Solicitud de Patente de Estados Unidos 2004/0191365).

Usos

Pueden utilizarse carotenoides producidos de acuerdo con la presente invención en cualquiera de una diversidad de aplicaciones, por ejemplo aprovechando sus propiedades biológicas o nutricionales (por ejemplo, antioxidantes, antiproliferativas, etc.) y/o sus propiedades de pigmento. Por ejemplo, de acuerdo con la presente invención, pueden usarse carotenoides en productos farmacéuticos (véase, por ejemplo, Bertram, *Nutr. Rev.* 57: 182, 1999; Singh *et al.*, *Oncology* 12: 1643, 1998; Rock, *Pharmacol. Ther.* 75: 185, 1997; Edge *et al.*, *J. Photochem Photobiol* 41: 189, 1997; Solicitud de Patente de Estados Unidos 2004/0116514; Solicitud de Patente de Estados Unidos 2004/0259959), complementos alimentarios (véase, por ejemplo, Koyama *et al.*, *J. Photochem Photobiol* 9: 265, 1991; Bauernfeind, *Carotenoids as colorants and vitamin A precursors*, Academic Press, NY, 1981; Solicitud de Patente de Estados Unidos 2004/0115309; Solicitud de Patente de Estados Unidos 2004/0234579), aplicaciones electroópticas, aditivos alimentarios animales (véase, por ejemplo, Krinski, *Pure Appl. Chem.* 66: 1003, 1994; Polazza *et al.*, *Meth. Enzymol.* 213: 403, 1992), cosméticos (como antioxidantes y/o como cosméticos, incluyendo fragancias; véase por ejemplo Solicitud de Patente de Estados Unidos 2004/0127554), etc. También pueden usarse carotenoides producidos de acuerdo con la presente invención como intermedios en la producción de otros compuestos (por ejemplo, esteroides, etc.).

Por ejemplo, la astaxantina y/o ésteres de la misma puede ser útil en una diversidad de aplicaciones terapéuticas y alimentos dietéticos incluyendo tratamiento de enfermedades inflamatorias, asma, dermatitis atópica, alergias, mieloma múltiple, arteriosclerosis, enfermedad cardiovascular, enfermedad hepática, enfermedad cerebrovascular, trombosis, enfermedades relacionadas con la neoangiogénesis, incluyendo cáncer, reumatismo, retinopatía diabética; degeneración macular y trastorno cerebral, hiperlipidemia, isquemia renal, diabetes, hipertensión, proliferación tumoral y metástasis; y trastornos metabólicos. Adicionalmente, los carotenoides y la astaxantina pueden ser útiles en la prevención y tratamiento de fatiga, para mejorar la función renal en nefropatía de enfermedades inflamatorias, así como prevención y tratamiento de otras enfermedades relacionadas con los hábitos de vida. Además, se ha descubierto que la astaxantina desempeña un papel como inhibidores de diversos procesos biológicos, incluyendo inhibidores de interleucina, inhibidores de fosfodiesterasa, inhibidores de fosfolipasa A2, inhibidores de ciclooxigenasa 2, inhibidores de metaloproteínasa de la matriz, inhibidores de la proliferación de células del endotelio capilar, inhibidores de la lipooxigenasa. Véase, por ejemplo, Publicación Japonesa Nº 2006022121, publicada 20060126 (Solicitud JP Nº 2005-301156 presentada 17102005); Publicación Japonesa Nº 2006016408, publicada 19012006 (Solicitud JP Nº 2005-301155 presentada 17102005); Publicación Japonesa Nº 2006016409, publicada 19012006 (Solicitud JP Nº 2005-301157 presentada 17102005); Publicación Japonesa Nº 2006016407, publicada 19012006 (Solicitud JP Nº 2005-301153 presentada 17102005); Publicación Japonesa Nº 2006008717, publicada 12012006 (Solicitud JP Nº 2005-301151 presentada 17102005); Publicación Japonesa Nº 2006008716, publicada 12012006 (Solicitud JP Nº 2005-301150 presentada 17102005); Publicación Japonesa Nº 2006008720, publicada 12012006 (Solicitud JP Nº 2005-301158 presentada 17102005); Publicación Japonesa Nº 2006008719, publicada 12012006 (Solicitud JP Nº 2005-301154 presentada 17102005); Publicación Japonesa Nº 2006008718, publicada 12012006 (Solicitud JP Nº 2005-301152 presentada 17102005); Publicación Japonesa Nº 2006008713, publicada 12012006 (Solicitud JP Nº 2005-301147 presentada 17102005); Publicación Japonesa Nº 2006008715, publicada 12012006 (Solicitud JP Nº 2005-301149 presentada 17102005); Publicación Japonesa Nº 2006008714, publicada 12012006 (Solicitud JP Nº 2005-301148 presentada 17102005); y Publicación Japonesa Nº 2006008712, publicada 12012006 (Solicitud JP Nº 2005-301146 presentada 17102005).

Se apreciará que, en algunas realizaciones de la invención, se incorporan carotenoides producidos por células hospedadoras manipuladas como se describe en el presente documento en un producto final (por ejemplo, alimento o complemento alimentario, producto farmacéutico, cosméticos, artículo que contiene colorante, etc.) en el contexto de la célula hospedadora. Por ejemplo, las células hospedadoras pueden liofilizarse, criodesecarse, congelarse o inactivarse de otro modo, y después pueden incorporarse células completas en o usarse como el producto final. La célula hospedadora también puede procesarse antes de su incorporación en el producto para aumentar la biodisponibilidad (por ejemplo, mediante lisis). Como alternativa o adicionalmente, un producto final puede incorporar solamente una parte de la célula hospedadora (por ejemplo, fraccionada por tamaño, solubilidad), separada del total. Por ejemplo, en algunas realizaciones de la invención, se aíslan gotas lipídicas de las células hospedadoras y se incorporan en o se usan como el producto final. En otras realizaciones, los carotenoides en sí mismos, o compuestos carotenoides individuales se aíslan y reformulan en el producto final.

Como se ha indicado anteriormente, los ésteres de ácidos grasos y glucósidos son los ésteres de carotenoides predominantes hallados en la naturaleza, mientras que pueden sintetizarse ésteres adicionales (por ejemplo con ácidos orgánicos o fosfato inorgánico) para generar formas de productos útiles. Para suministro, también pueden formularse ésteres de carotenoides como sales de la forma de éster. Véase, por ejemplo, Publicación de Estados Unidos N° 20050096477.

La cantidad de carotenoide incorporado en un producto dado puede variar drásticamente dependiendo del producto, y el carotenoide o los carotenoides particulares implicados. Las cantidades pueden variar, por ejemplo, de menos del 0,01 % en peso del producto, a más de 1 %, 10 %, 20 %, 30 % o más; en algunos casos el carotenoide puede comprender el 100 % del producto.

En algunas realizaciones de la invención, se incorporan uno o más carotenoides producidos en un componente de alimento o pienso (por ejemplo, un complemento alimentario). Los tipos de productos alimentarios en los que pueden incorporarse carotenoides de acuerdo con la presente invención no están particularmente limitados, e incluyen bebidas tales como té, zumos y licores; dulces tales como gelatinas y galletas; alimentos y bebidas que contienen grasas tales como productos lácteos; productos alimentarios procesados tales como arroz y arroz blando (o gachas); fórmulas infantiles, o similares. En algunas realizaciones de este aspecto de la invención, puede ser útil incorporar los carotenoides dentro de cuerpos de lípidos comestibles ya que pueden facilitar la incorporación en ciertos productos alimentarios que contienen grasas.

Los ejemplos de piensos en los que pueden incorporarse carotenoides producidos de acuerdo con la presente invención incluyen, por ejemplo, comidas para mascotas tales como comidas para gatos, comidas para perros y similares, piensos para peces de acuario, peces de criadero o crustáceos, etc., pienso para animales criados en granjas (incluyendo ganado e incluyendo además peces o crustáceos criados en acuicultura). El material de alimento o pienso en el que se incorporan el carotenoide o los carotenoides producidos de acuerdo con la presente invención es preferentemente apetitoso para el organismo que es el receptor pretendido. Este material de alimento o pienso puede tener cualquier propiedad física conocida actualmente para un material alimentario (por ejemplo, sólido, líquido, blando).

En algunas realizaciones de la invención, se incorporan uno o más carotenoides producidos en un producto cosmético. Los ejemplos de dichos cosméticos incluyen, por ejemplo, cosméticos cutáneos (por ejemplo, lociones, emulsiones, cremas y similares), lápiz de labios, cosméticos antiquemaduras solares, cosméticos de maquillaje, fragancias, productos para uso diario (por ejemplo, pastas de dientes, colutorios, agentes de prevención del mal aliento, jabones sólidos, jabones líquidos, champús, acondicionadores), etc.

En algunas realizaciones, se incorporan uno o más carotenoides producidos en un producto farmacéutico. Los ejemplos de dichos productos farmacéuticos incluyen, por ejemplo, diversos tipos de comprimidos, cápsulas, agentes bebibles, trociscos, gargarismos, etc. En algunas realizaciones, el producto farmacéutico es adecuado para aplicación tópica. Las formas de dosificación no están particularmente limitadas, e incluyen cápsulas, aceites, gránulos, gránulos pequeños, polvos, comprimidos, píldoras, trociscos, o similares. Los aceites y cápsulas rellenas de aceite pueden proporcionar ventajas adicionales tanto debido a su falta de descomposición de los ingredientes durante la fabricación como debido a que pueden incorporarse fácilmente gotas de lípidos que contienen carotenoides de la invención en formulaciones basadas en aceite.

Pueden prepararse composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención de acuerdo con técnicas establecidas en este campo incluyendo, por ejemplo, el procedimiento habitual como se describe en la Farmacopea de Estados Unidos, por ejemplo.

Los carotenoides producidos de acuerdo con la presente invención pueden incorporarse en cualquier producto que contenga pigmento incluyendo, por ejemplo, tela, pintura, etc. También pueden incorporarse en un producto que sea un indicador ambiental, o un instrumento tal como un biosensor para su uso como un agente de detección.

Ejemplificación

La Tabla 20 a continuación describe ciertas cepas de *Yarrowia lipolytica* usadas en la siguiente ejemplificación:

TABLA 20: cepas de *Yarrowia lipolytica*.

NRRLY-1095	Diploide de tipo silvestre	
ATCC76861	<i>MATB ura2-21 lyc1-5 LYS1-5B</i>	
ATCC76982	<i>MATB ade1 leu2-35 lyc1-5 xpr2</i>	
ATCC201249	<i>MATA ura3-302 leu2-270 lys8-11 PEX17-HA</i>	

NRRLY-1095	Diploide de tipo silvestre	
MF346	<i>MATA ura2-21</i>	ATCC76861 x ATCC201249
MF350	<i>MATB ura2-21 leu2-35 ade1</i>	ATCC76982 x MF346

(Los genotipos en *LYC1*, *LYS1*, *XPR2* y *PEX17* no se determinaron en cruces ni se verificaron para cepas de ATCC).

- 5 Todos los procedimientos de biología molecular básicos y manipulación de ADN descritos en el presente documento se realizan en general de acuerdo con Sambrook *et al.* o Ausubel *et al.* (Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (eds). 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Nueva York; Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (eds). 1998. *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley: Nueva York).

10 Ejemplo 1: producción de plásmidos para construcción de cepas de carotenoides.

Se generaron plásmidos para la construcción de cepas productoras de carotenoides. Las siguientes subpartes describen la producción de plásmidos que codifican polipéptidos carotenogénicos. Los plásmidos usados en estos estudios y detalles de su construcción se describen en la Tabla 21. Se encuentran detalles de la construcción de plásmidos adicionales y descripciones de su uso en el texto de la subsección relevante. Todas las amplificaciones por PCR usaron ADN genómico de NRRL Y-1095 como molde a no ser que se especifique otra cosa. El gen *URA5* descrito posteriormente es alélico con la auxotrofia *ura2-21* anterior. Los promotores de *GPD1* y *TEF1* son de *Y. lipolytica* como lo es el terminador de *XPR2*.

20 *GGs1* es el gen que codifica el gen de *Y. lipolytica* que codifica la geranilgeranilpirofosfato sintasa. La secuencia codificante de ácido nucleico y proteína codificada Ggs1 de pMB4591 y pMB4683 son las siguientes:

atggattataacagcgcggatttcaaggagatatggggcaaggccgacaccgcgctgctgggaccgtacaactac
ctcgccaacaaccggggccacaacatcagagaacacttgatcgcagcgttcggagcgggtatcaagggtgacaagagcgcgagaccattt
cgcacatcaccaagattttgcataactcgtcgtcgttgtgatgacgtggaagacaactcgcgagcgcgagcgcgagccattgtc
tgtttggagtcccccaaacatcaactccgccaactacatgtactttgtgctcgcagggaggtgctcaagctcaagcttattgatccgctctccattt
caccgaggaaatgatcaacttgcatagaggtcagggatgatctactggagagaacactcacttgcctcgggaagacgagtatctggaga
tggtggtgcacaagaccgggtggactgtttcggctggctcgtgagacttatgctgctgggtgcacgaaacaggaggaccatgaaaagatcaactttg
atctcacacacctaccgacacactgggagtcatttaccagattctggatgattacctaacctgcagtcacggaattgaccgagaacaagggatt
ctgcgaagatatcagcgaaggaaagttttcgttccgctgattcacagcatacgcaccaaccggataaccacgagatttcaacattctcaaacag
cgaacaagcgacgcttactcaaaaagtagccgtggactacatgagaacagaacaaagagtttcgactactgcctcaagaggatacaggcca
tgtcactcaaggcaagttcgtacattgatgatctagcagcagctggccacgatgtctcaagctacgagccattttgcatttttgtgtccacctctg
actgtgaggagagaaagtactttgaggatgcgcagtga

mdynsadfkeiwgkaadtallgpynylanrghnrehliaafgavikvdkdletishitkihnssllvddvedns
mlrrglpaahclfgvpqtinsanymyfvalqevlklksydavsfteeminlhrqgmdlywretltcpsedeylemvvhktgglfrlrlm
lsvaskqedhekinfdlthlttdltgviyqilddylnlqsteltenkgfcedisegkfsflihsirtnpdnheilnlkqrtsdaslkkyavdymrte
tksfdyckriqamslkassyiddlaaghdvsklrailhyfvstsdceerkyfedaq

TABLA 21: plásmidos

Plásmido	Cadena principal	Inserto	Oligos o fuente
pMB4529	PCR2.1	Producto de PCR de <i>ADE1</i> de 3,4 kb	MO4475 y MO4476
PMB4534	PCR2.1	Producto de PCR de <i>LEU2</i> de 2,1 kb	MO4477 y MO4478
pMB4535	PCR2.1	Producto de PCR de <i>URA5</i> de 1,2 kb	MO4471 y MO4472

Plásmido	Cadena principal	Inserto	Oligos o fuente
pMB4589	pMB4535 (<i>KpnI</i> + <i>SpeI</i>)	Promotor de <i>GPD1</i> de 1,2 kb (<i>KpnI</i> + <i>NotI</i>); terminador de <i>XPR2</i> de 0,14 kb (<i>NotI</i> + <i>SpeI</i>)	MO4568 y MO4591; MO4566 y MO4593
pMB4590	pMB4535 (<i>KpnI</i> + <i>SpeI</i>)	Promotor de <i>TEF1</i> de 0,4 kb (<i>KpnI</i> + <i>NotI</i>); terminador de <i>XPR2</i> de 0,14 kb (<i>NotI</i> + <i>SpeI</i>)	MO4571 y MO4592; MO4566 y MO4593
pMB4591	pMB4590 (<i>NheI</i> + <i>MluI</i>)	ORF de <i>GGI1</i> de 1,0 kb (<i>XbaI</i> + <i>MluI</i>)	MO4534 y MO4544
pMB4597	pMB4534 (<i>Acc65I</i> + <i>SpeI</i>)	Promotor de <i>GPD1</i> y terminador de <i>XPR2</i> (<i>Acc65I</i> + <i>SpeI</i>)	De pMB4589
pMB4603	pMB4597 (<i>RsrII</i> + <i>MluI</i>)	Cadena principal residual y promotor de <i>TEF1</i> (<i>RsrII</i> + <i>MluI</i>)	De pMB4590
pMB4616	pMB4529 (<i>RsrII</i> + <i>SpeI</i>)	Cadena principal residual y promotor de <i>GPD1</i> y terminador de <i>XPR2</i> (<i>RsrII</i> + <i>SpeI</i>)	De pMB4589
pMB4629	pMB4616 (<i>RsrII</i> + <i>MluI</i>)	Cadena principal residual y promotor de <i>TEF1</i> (<i>RsrII</i> + <i>MluI</i>)	De pMB4590
pMB4631	pMB4603 (<i>KpnI</i> + <i>NheI</i>)	Promotor de <i>GPD1</i> de 1,2 kb (<i>KpnI</i> + <i>NheI</i>);	MO4568 y MO4659
pMB4628	pMB4603	<i>Carp</i>	Véase 1A
pMB4637	pMB4629 (<i>NheI</i> + <i>MluI</i>)	ORF de <i>hmgI^{frunc}</i> de 1,5 kb (<i>XbaI</i> + <i>MluI</i>)	Véase 1D
pMB4638	pMB4629	<i>carB(i)</i>	Véase 1B
pMB4660	pMB4638 (+ <i>URA3</i>)	<i>carB(i)</i>	Véase 1C
pMB4662	pMB4631 (<i>SpeI</i> + <i>XhoI</i>)	Fragmento de <i>URA3</i> de 1,8 kb (<i>SpeI</i> + <i>BsaI</i>)	MO4684 y MO4685 Véase 1C
pMB4683	pMB4662 (<i>Acc65I</i> + <i>MluI</i>)	Fragmento de <i>tef1p-GGI1</i> de 1,4 kb (<i>Acc65I</i> + <i>MluI</i>)	De pMB4591
pMB4692	pMB4662 (<i>Acc65I</i> + <i>MluI</i>)	Promotor de <i>TEF1</i> de 0,4 kb (<i>Acc65I</i> + <i>NheI</i>); ORF de <i>crtZ</i> de 0,55 kb (<i>XbaI</i> + <i>MluI</i>)	Véase 1E
pMB4698	pMB4629 (<i>NheI</i> + <i>MluI</i>)	ORF de <i>crtW</i> de 0,9 kb (<i>XbaI</i> + <i>MluI</i>)	Véase 1F
pMB4599	pBluescriptSKII-(<i>EcoRV</i>)	Gen <i>carRP</i> de 1,9 kb	MO4525yMO4541
pMB4606	pBluescriptSKII-(<i>EcoRV</i>)	Gen <i>carB</i> de 1,9 kb	MO4530 y MO4542
PMB4613	pMB4599 (<i>Acc65I</i> + <i>PpuMI</i>)	<i>carRP(i)</i>	Véase texto
pMB4619	pBluescriptSKII-(<i>BamHI</i> + <i>Acc65I</i>))	<i>carB(i)</i>	Véase texto

Ciertos oligonucleótidos indicados en la Tabla 21 anterior son los siguientes:

MO4471 5'-CTGGGTGACCTGGAAGCCTT
MO4472 5'-AAGATCAATCCGTAGAAGTTCAG
MO4475 5'-AAGCGATTACAATCTTCCTTTGG
MO4476 5'-CCAGTCCATCAACTCAGTCTCA
MO4477 5'-GCATTGCTTATTACGAAGACTAC
MO4478 5'-CCACTGTCCTCCACTACAAACAC
MO4534 5'-CACAAACGCGTTCACTGCGCATCCTCAAAGT
MO4544 5'-CACAATCTAGACACAAATGGA1TATAACAGCGCGGAT
MO4566 5'-CACAAACTAGTTTGCCACCTACAAGCCAGAT
MO4568 5'-CACAAGGTACCAATGTGAAAGTGCGCGTGAT
MO4571 5'-CACAAGGTACCAGAGACCGGGTTGGCGG
MO4591 5'-CACAAGCGCGCGCTAGCATGGGGATCGATCTCTTATAT
MO4592 5'-CACAAGCGCGCGCTAGCGAATGATTCTTATACTCAGAAG
MO4593 5'-CACAAGCGCGCGCACGCGTGCAATTAACAGATAGTTTGCC
MO4659 5'-CACAAGCTAGCTGGGGATGCGATCTCTTATATC

- 5 1 A: producción de pMB4628 (*tef1p-carRP LEU2*) que codifica fitoeno sintasa/licopeno ciclasa: se amplificó *carRP* que contenía intrones a partir de ADN genómico de *M. circinelloides* (ATCC 90680) usando MO4525 y MO4541:

MO4525 5'-CACAAACGCGTTTAAATGGTAT1TAGATTTCTCATT
MO4541 5'-CACAATCTAGACACAAATGCTGCTCACCTACATGGA

5 de pMB4599 se insertó en pMB4603 escindido por *NheI* y *MluI*, produciendo pMB4628. La secuencia codificante de ácido nucleico que contenía intrones, y proteína CarRP codificada de pMB4628 son las siguientes:

atgctgctcacctacatggaagtccacctctactacacgctgcctgtgctggcgctcctgtcctggctgtcgcgccgttac
tacacagccaccgatgcgctcaaattcaaatttctgacactggttgccctcacgaccgcctccgcctgggacaactacattgtctaccacaaggcgt
ggctcctactgccccacctgcgctaccgctgtcattggctacgtgcccttgaggaggtacatgttcttcacatcatgactctgttgaccgtggcattca
ccaatctggtgatgcgctggcacctgcacagcttcttatcaggcctgaaacggcggtcatgcagtcctgctggctcctgtcttgcataacagc
cttattaatcactgcatacaaggcttgggtaagcaacaacaaatgatgigccgcatcgcattttaataattaaccattgcatacacagcatttggcgg
tccctggaaaggccactgttctacggatcatgcattttgtgtacgcctgtccgggtttggccttattgtggttgggtgctggcgagtacatgatgctgc
tccgtggcggtgctcgtctcattgcgtgcccacgctgtttctctgctgggtcgaatgctgcctatttggcgccggcacatgggacatttcgtgc
gccacaagcaccggcaagttcgtcgtgccccacctgcccgtggaggaattcatgttcttgcgctaattaataaccgttttggatttgggtacgtgtgc
gatcgatgcacgatggcgatcctccacctgttcaaaaacaagagtccctatcagcgccataccagcacagcaagtcgttccctccaccagatcct
cgagatgacctgggccttctgtttacccgaccaagtgtgcattcagacacattccacgacctgtccgtcagctgggacatcctgcgcaaggcctc
caagtccttttacacggcctctgctgtcttccggcgacgtgcgccaagagctcgggtgtgctatagcccttttcagagccacggacgatctctgc
gacaacgagcaggtccctgtgcagacgcgaaaggagcagctgatactgacacatcagttcgtcagcgatctgtttggccaaaagacaagcgcg
ccgactgccattgactgggactttacaacgaccaactgcctgcctcgtgcacatctgccttcagtcgttcacccgtttgcgcatgtgtcgtgaagc
tggagccatcaaggaaactgctcgacgggtacaagtgggatttggagcgctgcctcatcagggatcaggaggtatctcagatattactcagcttgtgt
cgccagcagtggttggtgaaatgtgcactcgcatactggtccacgcccagacaagcccgcctcccgcagcaaacacagtggatcattcagcgt
gcgctgtgaaatgggtctggtactccaatatacaaacattgcaagagacattgtaccgacagcgaggaactgggcagatgctacctgcctcagg
attggcttaccgagaaggaggtggcgctgattcaaggcgccctgcccagaaaattggcgaggagcgattgtctctactgtcgcacgcctcatc
taccaggcagacgagctcatgttggttggttccaacaaggcgcatcgacaagctgccagccattgtcaaggcggtgctgcgtgcggcctgcacgtc
tatgcttccattggcaccagctcaagcttacaagcaccactatcccagcagagcacatgtcggcaattcgaaacgagtggaattgctctcttag
cgtatacaacctttacacccgcgccaattgcgactagtagtaccacacattgcagacagggaataatgagaaatctaataaccatttaa

mlltymevhlyytlpvlglvslwsrpyyatdalkfkftlvafttasawdnyivyhkawsyscptcvtagivyvplee
ymffiiimtlltvaftnlvmrwhlshffirpetpvmqsvlrvlpitalitaykawhlavpgkplfygscilwyacpvlallwfgageymmr
plavlsialptlflcwvdvvaigagtwdislatstgkfvvphlpveefmffalintvlvfgtcaidrtmailhlfnkspyqrpyqhsksflhqil
emtwaflcpdqvlhsdtfhdlsvswdilrkasksfytasavfpgdvrqelgvlyafcratddldcneqvpvqtrkeqilithqfvsdlfgqktsa
ptaidwdfyndqlpascisafksftrlrhvlaegaikelldgykwdlerrisrdqedlryrsacvassvgemctriilahadkpasrqqtqwiiq
raremgvlqytniardivtdseelgrcylpqdwltekevaliqgglaireigeerllslshrliyqadelmvvankgidklpshcqqgvraacnv
yasigtklskykhhypsravhgnskrveiallsvynlytapiatsstthcrqgkmrnlnti

10 Como alternativa, también se usó pMB4599 como un molde para amplificación por PCR usando MO4318, MO4643, MO4644 y MO4639 y

MO4318 5'-GTA AACGACG GCCAGT
MO4643 5'-CACACGGTCTCATGCCAAGCCTTGATGCAGTGATTAA
MO4639 5'-CCACTGTGTTTGCTGGCGG
MO4644 5'-CACACGGTCTCTGGCATTTGGCGGTCCCTGGAAA

produciendo fragmentos de 0,5 y 0,95 kb, que se escindieron posteriormente con *Acc65I* y *BsaI*, y *BsaI* y *PpuMI*, respectivamente. Estos fragmentos se ligaron con pMB4599 que se había digerido con *Acc65I* y *PpuMI*, produciendo pMB4613, que alberga *carRP* sin intrones. El fragmento *XbaI-MluI* de 1,85 kb de pMB4613 puede insertarse en pMB4603 escindido con *NheI* y *MluI* para producir pCarRPdell.

5 1B: producción de pMB4638 (*tef1p-carB ADE1*), que codifica fitoeno deshidrogenasa: se amplificó *carB* que contenía intrones a partir de ADN genómico de *M. circinelloides* (ATCC 90680) usando MO4530 y MO4542:

MO4530 5'-CACAAACGCGTTTAAATGACATTAGAGTTATGAAC
MO4542 5'-CACAATCTAGACACAAATGTCCAAGAAACACATTGTC

10 y el fragmento de 1,9 kb resultante se fosforiló con polinucleótido quinasa T4 y se ligó con extremos romos en pBS-SKII escindido con *EcoRV*, produciendo pMB4606. pMB4606 se usó después como un molde para amplificación por PCR usando MO4318 y MO4648, y MO4646 y MO4647, y MO4343 y MO4645:

MO4318 5'-GTAAAACGACGGCCAGT
MO4648 5'-CACAAAGGTCTCAAGCACGCATCCCGGAAGT
MO4646 5'-CACACGGTCTCAGGCATGTCGCCCTACGATGC
MO4647 5'-CACACGGTCTCATGCTTGACCCACAAAGAATAGG
MO4343 5'-CAGGAAACAGCTATGAC
MO4645 5'-CACACGGTCTCTTGCCCATATACATGGTCTGAAACG

15 produciendo fragmentos de 0,4 y 0,85 y 0,7 kb, que se escindieron posteriormente con *Acc65I* y *BsaI*, y *BsaI*, y *BsaI* y *BamHI*, respectivamente. Estos fragmentos se ligaron con pBS-SKII, que se había cortado con *Acc65I* y *BamHI*, produciendo pMB4619, que albergaba *carB* sin intrones. El fragmento *XbaI-MluI* de 1,75 kb de pMB4619 se insertó en pMB4629 escindido con *NheI* y *MluI*, produciendo pMB4638. La secuencia codificante de ácido nucleico resultante y proteína CarB codificada de pMB4638 son las siguientes:

20
atgtccaagaacacattgtcattatcggtgctggcgtgggtggcacggctacagctgctcgtttggcccggaaggcttc
aaggctcactgtggtggagaaaaacgactttggtggcgccgctgctccttgatccatcaccagggccatcgctttgatcagggcccgctcgtctac
ctgatgcccgaagtactttgaggacgcctttgccgatctggacgagcgcaattcaagaccacctggagctgctgcatgacgacaactacaaggt
gcactttgacgacgggtgagtcgatccagctgtcgtctgacttgacacgcatgaaggctgaattggaccgctggaggggccccccttggtttggcc
gattcctggatttcagaaagagacacacatccactacgaaagcggcaccctgattgcgctcaagaagaatttcgaatccatctgggacctgattcg
catcaagtacgctccagagatctttcgttgacctgtttggcaagatctacgaccgcttccaagtactcaagaccaagaagatgcgcatggca
ttcacgtttcagaccatgtatatgggcatgtcgcctacgatgcgctgctgtctacagcctgttgagtacaccgagttcgctgaaggcatctgta
tccccgtggcggttcaacatgggtgttcagaagctagaggcgattgcaaagcaaaagtacgatgccgagtttatcataatgcgcctgttgccaa
gattaacaccgatgatgccaccaaaacagtgacaggtgtaaccttgaaaatggccacatcatcgatgccgatgcggttggtgtgaacgcagatct
ggcttatgcttaccatctgttgcctccctgccgatggacgcaaaacacactggcttccaagaaattgacgtcttctccatttcttacttggtcc
atgtccaccaaggtgcctcaattggacgtgcacaacatcttttgccgaggcttatcaggagagctttgacgaaatttcaaggactttggcctgcc
ttctgaagcctccttctacgtcaatgtgccctctcgcacgatccttctgctgctccgacggcaaggactctgtcatgtcttgggtcctattggtcata
tgaagagcaagacggcgatgctccaccgagaactacccggccatggtggacaaggcacgcaagatgggtgctggctgtgattgagcgtcgtc
tgggcatgtcgaaattcgccgacttgattgagcatgagcaagtcaatgatccgctgtatggcagagcaagttcaatctgtggagaggctcaattct
gggtttgtctcatgatgtgcttcaggtgctgtggttcctccagcacaaggatttaccggctgttatgataacctattcttgggtgcaagcac
gcatcccggaactgggtgttccattgtccttgacggaagcaagctcacctctgaccaagttgtcaagagctttggaagacgcccagccaagaa
agatcgagatggagaacacgcaagcaccttggaggagcctgatgtgaatcgacaftccctgtgtggttctggttgcgcgtccttttgggtcat
gtttatgttcttacttcttccctcaatccaatggccaacgcccgcacatctttatcaataattgttacctgaagtattccgcttcataactctaattgcat
ttaa

mskkhivii gagvggtataar laregfkvtvvekn dfgggcrslhhqghrfdqgpslylmpkyfedafadlderiqd
 hllellrcdnnykv hddgesiq lssdltrmkael drveglpfgfrfldfinkethihyesgtli alkknfesiwdlirikyapeifrlhlf gkiydra
 skyfktkkmrmaftfqtmymgm spydapavysllqytefaegiwyprggf nmvvqkleaiakqkydaefiynapvakintddatqvt
 gvtlenghiidadavvcnadlvyayhnlppcrwtqntlaskkl tsssisfywsmstkv pqlvhniflaeayqesfdeifkdfglpseasfyv
 nvpsridpsaapdgkdvivlvpighmksktg dasteny pambvdkarkmvlavie rlgmsnfadlieheqvndpavwqskfnlwrgsi
 lgshdvlqvlwfrpstkdstgrydnlfv gasthpgtgvpivlag skltsdqvvksfgktpkprkiementqapleepdaestfpvfwlraa
 fwvmfmffyyffpqsnqtpasfinnllpevfrvhsnsvi

1C. Producción de pMB4660 (*tef1p-carB URA3*), que codifica fitoeno deshidrogenasa: el fragmento *XhoI-NotI* de 4,3 kb y el fragmento *NotI-SpeI* de 1,8 kb de pMB4638 se ligaron con el gen *URA3* escindido por *BsaI* y *SpeI* de 1,9 kb generado por amplificación por PCR de ADN genómico de *Y. lipolytica* usando MO4684 y MO4685 para crear pMB4660:

MO4684 5'-CATTCACTAGTGGTGTGTTCTGTGGAGCATTC
 MO4685 5'-CACACGGTCTCATCGAGGTGTAGTGGTAGTGACAGTG

La secuencia codificante de ácido nucleico resultante y proteína CarB(i) codificada de pMB4660 son las siguientes:

atgtccaagaacacattgtcattatcggtgctggcggtggcgacggctacagctgctctgttggccgcgaaggcttc
 aaggctactgtgtggagaaaaacgactttggtggcgccgctgctccttgatccatcaccagggccatcgctttgatcaggggccgctcgtctac
 ctgatgcccagtgactttgaggacgcctttgccgatctggacgagcgcattcaagaccctggagctgctgcgatgcgacaactacaaggt
 gcactttgacgacgggtgagtcgatccagctgctgctgacttgacacgcgatgaaggctgaattggaccgctggaggggcccttggtttggcc
 gattcctggattcatgaagagacacatccactacgaaagcggcacctgattgcgctcaagaagaatttcgaatccatctgggacctgattcg
 catcaagtacgctccagagatcttctgctgcacctgtttggcaagatctacgaccgcttccaagtactcaagaccaagaagatgcgcatggca
 ttcacgtttcagaccatgtatatggcatgtcgccctacgatgcgcctgctgctacagcctgttcagtacaccgagttcgtgaaggcatctgta
 tccccgtggcggttcaacatggtgttcagaagctagaggcgattgcaagcaaaagctacgatgccgagtttatcacaatgcgcctgttgccaa
 gattaacaccgatgatgccaccaacaagtacaggtgtaacctggaaaatggccacatcatcgatgccgatgcggttggtgtgaacgcagatct
 ggtctatgcttatcacaatctgttgccctccgcatggacgcaaaacacactggcttccaagaattgacgtcttcttccatttcttactggtcc
 atgtccaccaaggtgcctcaattggacgtgcacaacatcttttggccgaggttatcaggagagctttgacgaaatctcaaggactttggcctgcc
 ttctgaagcctcttctacgtcaatgtgccctctcgcacgacgtctctccgacggcaaggactctgctattgtttggtgctattggtcata
 tgaagagcaagacggcgatgcttccaccgagaactaccggccatggtggacaaggcacgcaagatggtgctggtgtgattgagcgtcgtc
 tgggcatgtcgaatttcgcccacttgattgagcatgagcaagtcaatgatcccgctgtatggcagagcaagttaactgttgagaggctcaattct
 gggtttgtctcatgatgtgcttcagggtgctgtggttccgtccagcacaaaggattctaccggtctgtatgataacctattcttgggtgcaagcac
 gcatcccgaactggtgttccattgtccttgagggaagcaagctcaccttgaccaagttgtcaagagctttgaaagacgcccagccaagaa
 agatcgagatggagaacacgcaagcacctttggaggagcctgatgctgaatcgacattccctgtgtggttctggtgcgctgccttttgggtcat
 gtttatgttctttacttctccctcaatccaatggccaaacgcccgcacatctttatcaataattgttacctgaagtattccgcgttcataactctaatgtcat
 ttaa

mskkhivii gagvggtataar laregfkvtvvekn dfgggcrslhhqghrfdqgpslylmpkyfedafadlderiqd
 hllellrcdnnykv hddgesiq lssdltrmkael drveglpfgfrfldfinkethihyesgtli alkknfesiwdlirikyapeifrlhlf gkiydra
 skyfktkkmrmaftfqtmymgm spydapavysllqytefaegiwyprggf nmvvqkleaiakqkydaefiynapvakintddatqvt

gvltenghiidadavvcnadlvayhnlppcrwtqntlaskkltsssisfywsmstkvpqldvhniflaeayqesfdeifkdfglpseasfyv
nvpsridpsaapdgkdsivlvpighmksktgdastenympamvdkarkmvlavierrlgmsnfadlieheqvndpavwqskfnlwrsgsi
lglsdhvqlvlfprstkdstgrydnlfvvgasthpgtgvpivlagskltsdqvksfgktpkprkiementqaplecpdaestfpvwfwlraa
fwvmfmffyyffpqsnqtpasfinllpevfvrhnsnvi

1D. Producción de pMB4637 y pTef-HMG que codifica un HMG1 truncado. Para la producción de una variante truncada del gen de HMG-CoA reductasa, que también codifica una secuencia líder de 77 aminoácidos derivada de *S. cerevisiae*, se sintetizan los siguientes oligonucleótidos:

CEBADOR O 5'-TTCTAGACACAAAAATGGCTGCAGACCAATTGGTGA
CEBADOR P 5'-CATTAATTCTTCTAAAGGACGTATTTTCTTATC
CEBADOR Q 5'-GTTCTCTGGACGACCTAGAGG
MO4658 5'-CACACACGCGTACACCTATGACCGTATGCAAT

Los cebadores O y P se usan para amplificar un fragmento de 0,23 kb que codifica Met-Ala seguido de los restos 530 a 604 de la proteína Hmg1 de *S. cerevisiae*, usando ADN genómico como molde. Los cebadores Q y MO4658 se usan para amplificar un fragmento de 1,4 kb que codifica los 448 restos C terminales de la proteína Hmg1 de *Y. lipolytica*, usando ADN genómico como un molde. Estos fragmentos se ligan con el vector de clonación apropiado, y los plásmidos resultantes, designados pOP y pQMO4658, se verifican por secuenciación. El fragmento OP se libera con *Xba*I y *As*eI y en el fragmento QMO4658 se libera con *Mae*I y *Mlu*I. Estos fragmentos se ligan después con el vector de expresión de *ADE1 TEF1p* pMB4629 cortado con *Xba*I y *Mlu*I para producir pTefHMG.

Como alternativa, el gen *HMG1* nativo de *Y. lipolytica* puede modificarse sin secuencias de *S. cerevisiae* como se ha descrito en la tabla anterior usando los cebadores MO4658 (descrito anteriormente) y MO4657, para crear pMB4637:

MO4657 5'-CACACTCTAGACACAAAAATGACCCAGTCTGTGAAGGTGG

La secuencia codificante de ácido nucleico resultante y proteína Hmg1^{trunc} codificada de pMB4637 son las siguientes:

atgacccagctctgtgaaggtggttgagaagcacgttctatcgctcattgagaagcccagcgagaaggaggaggacacct
cttctgaagactccattgagctgactgtcggaaagcagcccaagcccgtgaccgagacccgttctctggacgacctagaggctatcatgaaggca
ggtaagaccaagcttctggaggaccacgaggtgtcaagctctctctcgagggaagcttcttctgtatgctcttgagaagcagcttggtgacaac
acccgagctgttgcatccgacgatctatcatctccagcagctataaccaagactttagagacctcaagcttcttacctgcactacgactacga
ccgtgttttgagcctgttgagaaacgttattggttacatgcctctccccgttggtgttgctggcccatgaacattgatggcaagaactaccacat
tctatggccaccactgagggtgttctgttgctcaaccatgcgaggttgcaaggccatcaacgcccgtggcggtgttaccactgtgcttactcag
gacggtatgacacgaggtcttctgttcttctccctctctcaagcgggctggagccgctaagatctggcttgattccgaggagggtctcaagtcca
tgcaaaaggcctcaactccacctctcgattgctctctccagctcttctactctaccctgtgtgtaacctgctgtttattcgattccgaaccaccaat
ggtgatgccatgggcatgaacatgatctccaaggcgctgaacactctctggccgtcatggtcaaggagtacggcttccctgatatggacattgtg
tctgtctcgggtaactactgcactgacaagaagcccgcagcgatcaactggatcgaaggccgaggcaagagtgtgttgccgaagccaccatcc
ctgctcacattgtcaagctgttctcaaaagtgaggttgacgctctgttgagctcaacatcagcaagaatctgatcggtagtgcctggctggctctg

tgaggaggttcaatgcacacgcccgaacctggtagccgcatctacctgccactggccaggatcctgctcagaatgtcgagtcctccaactgca
 tcacgctgatgagcaacgctgacggaacctgctcatctccgtttccatgccttctatcgaggctcggtaccattggaggaggtactattttggagccc
 cagggggctatgctggagatgcttggcgtgcgaggtcctcacatcgagacccccggtgccaacgcccacagcttgctgcacattgcttctgg
 agttcttcgagcggagcttctgctgtgttctgctcttgcggccatctgtgcaagtcataatgacccacaaccgggtccaggctcctactccgg
 ccaagcagtcctcaggccgatctgcagcgtctacaaaacggttcgaatattgcatacgggtcatag

mtqsvkvvekhvpiviekpsekeedtsedsietvgkqpkpvtetrslddleaimkagktklledhevvlkslegkl
 plyalekqlgdntavgrirrsiisqqsnktltsklpylhydydrvfgaccenvigymplpvgvagpmnidgknyhipmattegcivastm
 rgckainagggvttvltqdgmtgrgpcvsfslkragaaikiwdseeglksmrkafnstsrfarlqslhstlagnlffirfittgdamgmmnisk
 gvehslavmvkeygfpdmdivsvsgnyctdkkpaainwiegrgksvvaetipahivksvlksevdalvelnisknligsamagsvggfn
 ahaanlvtaiyatgqdpagqvessncitlmsnvdgnllisvsmpsienvgtigggtilepqqamlemlgvrghietpganaaqlariaasgvl
 aaelslcsalaaghlvqshlmthnrsqaptakqsqadlrlqngsmicirs

Ejemplo 2: cuantificación técnica de *Yarrowia lipolytica* para producción de carotenoides aumentada.

5 2A. Producción de *Y. lipolytica* que expresa geranilgeranilpirofosfato sintasa y fitoeno deshidrogenasa: se transformó MF350 (*MATB ura2-21 leu2-35 ade1*) con pMB4591 (*tef1p-GGS1*) que se había escindido cadena arriba de *URA5* con *SspI*; un transformante *Ura*⁺ que porta el plásmido en el locus *ura2* se identificó y se nombró MF364. Se transformó posteriormente con pMB4638 (*tef1p-carB*) que se había escindido en *ADE1* con *SspI* y se seleccionó un transformante prototrófico que albergaba el plásmido en el locus *ade1*. Esta cepa se denominó MF502.

10 2B. Producción de *Y. lipolytica* que expresa geranilgeranilpirofosfato sintasa, fitoeno deshidrogenasa y fitoeno sintasa/licopeno ciclasa. Se transformó MF502 con pMB4628 (*tef1p-carRP*) que se había tratado con *SspI*. Se seleccionaron nueve colonias prototróficas que estaban descoloridas, eran naranjas o muy naranjas en la placa de transformación (agar YNB con glucosa 1 % y glutamato 0,1 % [YNBglut]) después de dos a tres días de cultivo. Dos, MF597 y MF600 (las muy naranjas), produjeron más de 4 mg de caroteno por g de peso celular seco (DCW) después de cuatro días de cultivo en YPD a 30 °C. El análisis de Southern revela una única banda *KpnI-HindIII* diferente en ADN genómico de MF597 y MF600, ninguna de las cuales sugiere que se produjo integración homóloga en *leu2-270*.

20 2C. Producción de *Y. lipolytica* que expresa fitoeno sintasa/licopeno ciclasa y fitoeno deshidrogenasa: ATCC201249 (*MATA ura3-302 leu2-270 lys8-11*) se transformó con pMB4628 escindido con *SspI*. Se agruparon cientos de colonias *Leu*⁺, se volvieron a cultivar, y se transformaron con pMB4660 (*tef1p-carB*) que se había escindido cadena arriba de *URA3* con *SalI*. Se seleccionó una colonia que era notablemente amarilla después de 5 días a 30 °C con YNBglut más lisina 0,6 mM, denominada MF447, y se descubrió que producía 0,2 mg de caroteno por gramo de peso celular seco después de 4 días de cultivo en YPD.

30 Se expuso MF447 a ácido 5-fluoroorótico 1 g/l y se seleccionaron segregantes *Ura*⁻. Sorprendentemente, se descubrió que todos conservaban la apariencia amarilla idéntica de su precursor, lo que implica que la pérdida de un gen *URA3* funcional no coincidía con la pérdida de una enzima *CarB* funcional. El análisis de Southern demuestra que dos fragmentos de una digestión con *KpnI-HindIII* de ADN de MF447 contienen secuencias que hibridan con *URA3p*, solo una de las cuales se hibrida también con *carB*. La otra está ausente en MF578, el segmento *Ura3*⁻ seleccionado para manipulación adicional. El rescate de plásmidos y análisis de la secuencia de ADN que abarca el intrón *carRP* en las cepas MF447, MF597 (ejemplo 2c) y MF600 (ejemplo 2c) reveló que los exones 1 y 2 estaban contiguos y estaban cada uno separados por una secuencia intrónica que carecía del sitio *SspI* interno original (presente en pMB4628).

40 2D. Producción de *Y. lipolytica* que expresa fitoeno sintasa/licopeno ciclasa, fitoeno deshidrogenasa y geranilgeranilpirofosfato sintasa: se transformó MF578 con pMB4683 (*tef1p-GGS1*) que se había escindido con *SalI* (cadena arriba de *URA3*) o con *StuI* (dentro de la ORF de *GGS1*). Las colonias *Ura*⁺ *Leu*⁺ en ambos casos tenían una apariencia naranja brillante en YNBglut+Lys y en YPD, y varias produjeron más de 4 mg de caroteno por gramo de peso celular seco cuando se cultivaron como antes. Una, MF633, contenía una única copia del plásmido en el locus de *GGS1*, como se infiere a partir del análisis de Southern. Las otras surgieron por integraciones no homólogas o más complejas.

45 2E. Producción de *Y. lipolytica* que expresa fitoeno sintasa/licopeno ciclasa, fitoeno deshidrogenasa y geranilgeranilpirofosfato sintasa: MF364 se cruza con MF578, y se siembran esporas del diploide resultante en placas con YPD durante dos a tres días a 30 °C. Se exploran colonias *Leu*⁺ *Ade*⁻ *Ura*⁻ naranjas con respecto a la

presencia de *tefp-carB*, *tefp-carRP* y *tefp-GGS1* por PCR, y con respecto a alta producción de carotenoides (>4 mg/g de peso celular seco) después de cultivo en medio líquido YPD. Las colonias que cumplen estos criterios, así como que presentan resistencia a ácido 5-fluoroorótico, un indicio de que albergan el alelo *ura3-302*, se eligen para estudios posteriores y se denominan en lo sucesivo en el presente documento cepas GBRPua. Dicha cepa se selecciona para análisis y modificación posterior.

Ejemplo 3: extracción de carotenoides de células de *Yarrowia lipolytica*

Se realizaron ensayos de matraz de agitación de cepas generadas usando medio YPD (extracto de levadura 1 %, peptona 2 %, glucosa 2 %). Se dejaron crecer cultivos de 20 ml en matraces de 125 ml a 30 °C. Se recogieron células de *Y. lipolytica* de cultivos de 72-96 horas, y se realizaron extracciones para determinar la forma y cantidad de los carotenoides. Se colocaron 1,8 ml de cultivo en un tubo Eppendorf. Las células se sedimentaron y se lavaron dos veces con 1 ml de H₂O. Después del segundo lavado, las células resuspendidas se transfirieron a un tubo de tapón con cierre de resorte previamente pesado con un agujero realizado en la parte superior, y las células se liofilizaron durante una noche. Después de secar hasta su compleción, el tubo se pesó para calcular el peso celular seco. Se colocaron 0,25 ml del mismo cultivo de matraz de agitación en un tubo con tapón de rosca de 2 ml para extracción de carotenoides. Las células se sedimentaron y el sobrenadante se aspiró. Las células pigmentadas pueden congelarse a -80 °C y almacenarse. Se añadió un volumen igual de perlas de circona cúbica a los sedimentos celulares, junto con 1 ml de disolvente de extracción helado (una mezcla 50/50 v/v de hexano y etil acetato que contiene butilhidroxitolueno 0,01 % (BHT)). La mezcla se agitó después (Mini-BeadBeater-8, BioSpec Products, Inc.) a velocidad máxima durante 5 minutos a 4 °C. La mezcla se centrifugó después a máxima velocidad durante 1 minuto, y el sobrenadante se recogió y se depositó en un frasco de vidrio de 16 ml frío. Los residuos celulares restantes se volvieron a extraer al menos tres veces, sin la adición de perlas de circona; todos los sobrenadantes se agruparon en el frasco de vidrio de 16 ml. Después de la extracción, el frasco de vidrio se centrifugó durante 5 minutos a 2000 rpm a 4 °C en una centrífuga de sobremesa Sorvall, y el sobrenadante se transfirió a un nuevo frasco de vidrio de 16 ml frío. Se usó un Speed Vac para concentrar el sobrenadante (temperatura ambiente en oscuridad), y las muestras se almacenaron a -20 °C o -80 °C hasta inmediatamente antes del análisis de HPLC. Antes del análisis de HPLC, las muestras se resuspendieron en 1 ml de disolvente helado y después se transfirieron a un frasco de ámbar frío. Durante todo el protocolo, se tuvo cuidado para evitar el contacto con el oxígeno, la luz, el calor y los ácidos.

Ejemplo 4: cuantificación de la producción de carotenoides por HPLC

Para análisis de carotenoides, las muestras se resuspendieron en disolvente de extracción helado (una mezcla 50/50 v/v de hexano y etil acetato que contenía butilhidroxitolueno (BHT) 0,01 %). Se usó una HPLC Alliance 2795 (Waters) equipada con una columna Waters XBridge C18 (3,5 µm, 2,1 x 50 mm) y una precolumna Thermo Basic 8 (2,1 x 10 mm) para resolver el carotenoide a 25 °C; se usaron muestras de carotenoides auténticos como patrones. Las fases móviles y los caudales se muestran a continuación (Disolvente A = Etil Acetato; Disolvente B = Agua; Disolvente C = Metanol; Disolvente D = Acetonitrilo). El volumen de inyección fue de 10 µl. El detector es un detector en serie de fotodiodo Waters 996. Los tiempos de retención para moléculas lipófilas incluyen astaxantina (1,159 min), zeaxantina (1,335), β-apo-8'-carotenal (2,86 min), ergosterol (3,11 min), licopeno (3,69 min), β-Caroteno (4,02 min) y fitoeno (4,13 min). Se detectan astaxantina, zeaxantina, β-apo-8'-carotenal, licopeno y β-Caroteno a 475 nm, mientras que se detectaron ergosterol y fitoeno a 286 nm.

TABLA 22 Tiempos de retención para moléculas lipófilas

Tiempo (min)	Caudal (ml/min)	%A	%B	%C	%D	Curva
	0,50	0,0	20,0	0,0	80,0	
3,00	1,00	20,0	0,0	0,0	80,0	6
4,50	1,00	80,0	0,0	20,0	0,0	6
5,50	1,00	0,0	0,0	60,0	40,0	6
6,50	1,00	0,0	0,0	80,0	20,0	6
7,50	1,00	0,0	0,0	100,0	0,0	6
8,50	1,00	0,0	0,0	100,0	0,0	6
9,50	1,00	0,0	20,0	0,0	80,0	6
10,50	0,50	0,0	20,0	0,0	80,0	6

Ejemplo 5: la expresión de una forma truncada de HMG-CoA reductasa da como resultado aumento de la producción de carotenoides

Para aumentar la producción de carotenoides, se potencia el flujo de carbono a través de la ruta de isoprenoides introduciendo una variante truncada del gen de HMG-CoA reductasa.

En un enfoque, una variante truncada del gen de HMG-CoA reductasa que también codifica una secuencia líder de 77 aminoácidos derivada de Hmg1 de *S. cerevisiae* se introduce en una cepa GRPBua (descrita en el Ejemplo 2E anterior). El plásmido pTefHMG puede escindirse con *Sna*BI, *Bbv*CI o *Bsu*36I para dirigir la integración en el locus *ade1* o con *Bam*HI para dirigir la integración en el locus *HMG1*, o con *Eco*RV para promover la integración aleatoria, en las cepas GRPBua, restaurándolas en prototrofia de adenina. Los transformantes de Ade⁺ resultantes se exploran con respecto a producción de carotenoides aumentada.

Como alternativa, el gen *HMG1* nativo de *Y. lipolytica* puede modificarse sin secuencias de *S. cerevisiae* como se ha descrito en el Ejemplo 1D anterior, para crear pMB4637. Este plásmido puede digerirse como se ha descrito para pTefHMG y transformarse en cepas GRPBua, y los transformantes resultantes pueden explorarse como se ha descrito para producción de carotenoides aumentada.

En otro enfoque más, puede utilizarse una variante truncada del gen de la HMG-CoA reductasa de *N. crassa* e introducirse en cepas de *Y. lipolytica*. Para generar un plásmido adecuado para expresión de la HMG-CoA reductasa heteróloga, se modifica p641P (Yeast 2001; 18 (2001): 97-113) reemplazando el promotor de *ICL1* con el promotor de *GPD*, y mediante la adición de secuencias que confieren resistencia a fleomicina. El ADN genómico de *Y. lipolytica* se amplifica con dos cebadores.

GPDdist: 5' CACACGGTAcctgttaggttggttggtg

GPDprox: 5' CACACGGATCCgtttaattcaagaatgaatatagagaagagaag,

y el fragmento resultante (0,7 kb) se escinde con *Bam*HI y *Kpn*I, y se liga con p641P escindido con *Bam*HI y *Kpn*I, creando el plásmido “**p641Pgpd**”. El gen *ble* bajo el control del promotor de *GPD* de *A. nidulans* se escinde después de pBCphleo (Silar, Fungal Genetics Newsletter 42: 73) como un fragmento *Bcl*-*Bam*HI de 3,2 kb y se inserta en el sitio de *Bam*HI único de “p641Pgpd”, en la orientación que conserve el sitio *Bam*HI próximo al promotor de *GPD*, para crear “**p641Pgpdble**”,

Se amplifica ADN genómico de *N. crassa* con dos cebadores:

Neuhmg dir: 5' CACACGGATCCACATCAACAatggcatctgccacccttcccc

Neuhmg inv: 5' CACACGGATCCaagtgtgacgcggaacttg,

y el fragmento resultante se escinde con *Bam*HI y se inserta en “**p641Pgpdble**” digerido con *Bam*HI en la orientación correcta. El plásmido resultante, “**pZg**”, contiene secuencias que codifican un dominio catalítico citosólico truncado de hidroximetilglutaril-CoA reductasa de *N. crassa* (referencia de Genbank: XP_324892) bajo el control del promotor de *GPD* constitutivo. Este plásmido puede introducirse en la cepa de *Y. lipolytica* creada en el Ejemplo 2E anterior, y los transformantes se seleccionan por su resistencia a fleomicina (100 µg/ml). Los transformantes resultantes se ensayan con respecto a producción de β-caroteno, como se ha descrito anteriormente.

Se hace referencia a las siguientes tablas a lo largo de la descripción:

Tabla 1. Ejemplos de polipéptidos de acetoacetyl-CoA tiolasa

Fila	REFERENCIA de Genbank	GI de Genbank
1	P10551	135758
2	Q04677	418002
3	Q12598	34925109
4	T10247	7433657
5	T42741	11257345
6	AAL18924	16417944
7	AAM67058	21618008
8	AAO51605	28829030
9	AAU95618	53854350
10	AAU95619	53854352
11	BAA97003	8777413
12	CAE76429	38567134
13	EAK90852	46431255
14	EAL32264	54643520
15	NP_015297	6325229
16	NP_568694	30695411
17	NP_572414	24640423
18	NP_596686	19113478
19	NP_851154	30695409
20	NP_908411	34894172
21	NP_974900	42573608
22	NP_974901	42573610
23	NP_984262	45188039
24	XP_389497	46134945
25	XP_401186	49074048
26	XP_405546	49087148
27	XP_449306	50293789
28	XP_449306	50293789
29	XP_450298	50899020
30	XP_453599	50307241
31	XP_460741	50424309
32	XP_500646	50546253

Tabla 2. Ejemplos de polipéptidos de HMG-CoA sintasa

Fila	REFERENCIA de Genbank	GI de Genbank
1	B55729	1083370
2	P54869	1708235
3	S13887	86312
4	S27197	284048
5	AAA37076	387072
6	AAF89580	9621905
7	AAH00297	33991031
8	AAH31363	21618633
9	AAH42929	27552834
10	AAH79694	50925193
11	AAH83543	54035469
12	AAO52569	28830079
13	AAP35966	30583443
14	BAB23657	12836439
15	BAC04559	21754758
16	BAC05233	21758044
17	CAA52032	1772495
18	CAC18553	11602786
19	CAG33131	48145817
20	CAH92111	55730782
21	CAI22408	56205097
22	EAK97451	46438115
23	EAL25034	54635631
24	NP_002121	54020720
25	NP_013580	6323509
26	NP_032282	31560689
27	NP_058964	8393538
28	NP_593859	19114771
29	NP_666054	31981842
30	NP_725570	24654139
31	NP_775117	27465521
32	NP_957379	41055180
33	NP_983739	45187516
34	NP_990742	45382279
35	NP_999545	47523816
36	XP_315872	58387870
37	XP_323241	32405256
38	XP_368218	39973655
39	XP_389442	46134253
40	XP_397202	48141273
41	XP_402977	49078452
42	XP_409060	49095198
43	XP_446972	50289085
44	XP_453529	50307101

Fila	REFERENCIA de Genbank	GI de Genbank
45	XP_456470	50405663
46	XP_506052	50557288
47	XP_513693	55587844
48	XP_536483	57085299
49	XP_569805	58265298
50	XP_571930	58269548

Tabla 3. Ejemplos de polipéptidos de HMG-CoA reductasa

Fila	REFERENCIA de Genbank	GI de Genbank
1	A23586	90238
2	O74164	11132850
3	P51639	1708252
4	P54960	1708251
5	Q12649	18276268
6	Q29512	2495262
7	Q9Y7D2	11133211
8	S30338	422383
9	S72194	7450066
10	AAA36989	387052
11	AAA37077	305355
12	AAA49740	214237
13	AAD20975	9817458
14	AAH74197	49257596
15	AAL09351	15824453
16	AAO85434	29468180
17	AAP72015	32165622
18	AAR02862	45272118
19	AAT92819	51013051
20	BAC20567	23574646
21	CAA63970	4376229
22	CAE47850	41581201
23	CAF92135	47213283
24	CAH92577	55731745
25	EAK94577	46435190
26	EAL20195	50257490
27	AAF80374	8886086
28	NP_013555	6323483
29	NP_013636	6323565
30	NP_032281	56119096
31	NP_037266	40538852
32	NP_588235	19075735
33	NP_985010	45190756
34	NP_989816	45383193
35	NP_999724	47551099
36	XP_324892	32408825
37	XP_364130	39955070
38	XP_389373	46134115
39	XP_400629	49072680
40	XP_405730	49087632
41	XP_407954	49092986
42	XP_449268	50293713
43	XP_451740	50303597
44	XP_458872	50420671

Fila	REFERENCIA de Genbank	GI de Genbank
45	XP_503558	50552167
46	XP_536323	57084803
47	XP_571450	58268588

Tabla 4. Ejemplos de polipéptidos de mevalonato quinasa

Fila	REFERENCIA de Genbank	GI de Genbank
1	XP_386088	46123069
2	XP_408006	49093090
3	XP_370449	39978123
4	EAL04797	46445529
5	XP_322935	32404644
6	NP_001007	55925207
7	XP_460851	50424525
8	XP_567851	58260882
9	XP_567850	58260880
10	AAQ02416	33303805
11	CAA53059	450346
12	AAH16140	16359371
13	AAH05606	13542811
14	XP_403111	49078786
15	XP_452532	50305147
16	CAG08527	47226511
17	XP_446138	50287417
18	AAO51522	28828936
19	NP_985191	45190937
20	XP_500956	50546973
21	NP_013935	6323864
22	AAD45421	5578718
23	NP_920723	37532842
24	NP_851084	30690651
25	AAL18925	16417946
26	NP_788338	28573850
27	AAU20834	51988124
28	AAU87813	52839819
29	AAU20835	51988125
30	YP_183887	57641409
31	NP_143478	14591399
32	BAA24409	2804172
33	NP_126232	14520757
34	XP_522574	55639331
35	NP_071114	11499870
36	XP_423949	50797461
37	NP_633786	21227864
38	ZP_002971	48840229
39	EAH50787	44170778
40	NP_615566	20089491
41	IVISA	40890012
42	EAK03559	44549994
43	NP_248080	15669275
44	IKKHA	20150886

Fila	REFERENCIA de Genbank	GI de Genbank
45	Q50559	2497518
46	CAF88123	47200914
47	NP_275189	15678075
48	EAI88745	44383877
49	ZP_002040	46141948
50	XP_543435	57105916
51	EAI38920	44313360
52	NP_148611	14602065
53	EAD08953	43286228
54	EAD45697	43361720
55	YP_134862	55377012
56	NP_720650	24378695
57	NP_614276	20094429
58	E84270	25409931
59	NP_691146	23097680
60	ZP_003233	48870579
61	AAG02440	9937386
62	EAD12278	43292898
63	NP_498328	17555862
64	EAB31483	42928976
65	ZP_003319	50590618
66	NP_814642	29375488
67	AC1434	25514495
68	ZP_003577	53796847
69	EAD82048	43454743
70	CAE73618	39586491
71	YP_012624	46906235
72	NP_988455	45358898
73	ZP_002348	47097293
74	ZP_002862	48824993
75	ZP_002307	47093020
76	NP_597102	19173299
77	CAD24422	20429111
78	NP_785308	28378416
79	EAA39098	29247539
80	NP_819638	29653946
81	EAH49746	44168765
82	EAH49745	44168764
83	NP_378182	15922513
84	ZP_000459	23002259
85	H90181	25393827
86	YP_054120	50405028
87	BAB07790	9695270
88	AAG02435	9937379

Fila	REFERENCIA de Genbank	GI de Genbank
89	NP_560495	18313828
90	YP_187834	57866187
91	EAK40782	44602942
92	CAC51370	15212070
93	AAG02424	9937364
94	YP_185521	57651465
95	YP_040044	49482820
96	YP_194037	58337452
97	D86675	25400965
98	NP_763916	27467279
99	CAF89434	47197810
100	EAF38333	43767792
101	EAK46841	44611394
102	H89827	25507776
103	ZP_003149	48861061
104	EAK17824	44570143
105	EAH86276	44235719
106	YP_118418	54024176
107	ZP_003196	48865749
108	AAG02430	9937372
109	NP_269075	15674901
110	NP_802520	28896170
111	AAL97579	19748102
112	ZP_003666	56808907
113	NP_965060	42519130
114	NP_819639	29653947
115	EAD97024	43484567
116	BAD86800	57753870

Tabla 5. Ejemplos de polipéptidos de fosfomevalonato quinasa.

Fila	REFERENCIA de Genbank	GI de Genbank
1	AAA34596	171479
2	XP_452514	50305111
3	NP_985210	45190956
4	XP_446144	50287429
5	XP_462340	50427455
6	EAL04096	46444824
7	EAL03941	46444668
8	XP_503619	50552418
9	XP_389940	46136497
10	XP_329795	32418634
11	XP_369652	39976529
12	XP_406448	49089559
13	NP_593421	19114333
14	XP_568385	58261950
15	EAL17628	50254887
16	AAL18926	16417948
17	BAD43274	51969164
18	BAD44652	51971975
19	XP_398375	49068172
20	BAD44486	51971643
21	F90479	25393214
22	YP_194039	58337454

Tabla 6. Ejemplos de polipéptidos de mevalonato pirofosfato descarboxilasa

Fila	REFERENCIA de Genbank	GI de Genbank	Fila	REFERENCIA de Genbank	GI de Genbank
1	AAT93171	51013755	45	NP_496967	17537203
2	IFI4A	13786942	46	NP_691147	23097681
3	XP_455548	50311049	47	EAL29282	54640164
4	XP_445335	50285813	48	AD1434	25515042
5	XP_456912	50409853	49	ZP_002308	47093021
6	NP_986435	45200865	50	YP_012625	46906236
7	AAF19399	6625790	51	ZP_002348	47097294
8	XP_328845	32416734	52	NP_819637	29653945
9	XP_505041	50555265	53	NP_376888	15921219
10	NP_594027	19114939	54	ZP_003319	50590617
11	XP_364905	39963452	55	NP_585805	19074299
12	XP_390600	46137817	56	YP_187835	57866188
13	XP_408551	49094180	57	CAD24423	20429112
14	AAA34506	7544604	58	AAG02431	9937373
15	EAL18927	50256200	59	NP_763917	27467280
16	XP_568247	58261674	60	AAG02446	9937394
17	XP_402794	49077992	61	ZP_002863	48824994
18	AAH81784	51980639	62	AAG02441	9937387
19	EAL00166	46440864	63	YP_185522	57651466
20	NP_619597	20149736	64	A89828	25505863
21	NP_112324	13592005	65	NP_814641	29375487
22	BAC40852	26354448	66	YP_040045	49482821
23	XP_546783	57087071	67	NP_785307	28378415
24	Q99JF5	23814095	68	ZP_003196	48865750
25	AAH63907	39645379	69	ZP_003233	48870580
26	CAF99534	47230341	70	E86675	25400967
27	AAP35576	30582699	71	EAE31110	43552684
28	AAP36301	30584105	72	BAB07791	9695271
29	AAL18927	16417950	73	CAC51371	15212071
30	AAV32433	54292590	74	ZP_000459	23002258
31	AAP68208	31711704	75	NP_965061	42519131
32	AAM64988	21593039	76	BAD86801	57753871
33	NP_566995	18410026	77	YP_194038	58337453
34	XP_423130	50771155	78	YP_118419	54024177
35	AAM65192	21593243	79	EAK18820	44571499
36	NP_001007	55925435	80	EAI85935	44379784
37	NP_573068	28571205	81	NP_721336	24379381
38	BAD27942	50252009	82	D95044	25388338
39	T47584	11281655	83	AAG02456	9937408
40	XP_307373	31196851	84	C97914	25511486
41	CAE73245	39591192	85	EAK47683	44612560
42	NP_496966	17537201	86	EAB86425	43039778
43	XP_393230	48121058	87	YP_140971	55822530
44	G90479	25393662	88	YP_139081	55820639

Fila	REFERENCIA de Genbank	GI de Genbank
89	BAD07376	40882372
90	NP_968512	42523132
91	EAI06705	44265427
92	YP_060018	50914046
93	AAG02451	9937401
94	NP_269076	15674902
95	ZP_003666	56808906
96	NP_688323	22537472
97	NP_735832	25011437
98	EAC40267	43149093
99	AAL97580	19748103
100	EAI76915	44367119
101	EAD35042	43339207
102	YP_073129	51598941
103	EAI90092	44385501
104	BAB07818	9711347
105	EAD72850	43433025
106	NP_212820	15595031
107	YP_124337	54297968
108	YP_096056	52842257
109	EAA39903	29248368
110	EAH06252	44088237
111	YP_127354	54294939
112	EAD45753	43361830
113	NP_802519	28896169

Tabla 7. Ejemplos de polipéptidos de IPP isomerasa

Fila	REFERENCIA de Genbank	GI de Genbank
1	NP_015208	6325140
2	XP_448008	50291151
3	NP_983828	45187605
4	XP_455121	50310203
5	XP_462358	50427491
6	EAL01685	46442395
7	XP_504974	50555131
8	XP_328425	32415894
9	XP_367200	39971619
10	XP_389898	46136413
11	XP_404716	49085144
12	CAD37150	21627818
13	NP_595164	19111956
14	XP_566641	58258457
15	XP_402453	49077100
16	O35586	6225528
17	AAP36609	30584713
18	AAF37873	7188790
19	NP_445991	16758306
20	O42641	6225529
21	BAA33979	3790386
22	Q13907	6225527
23	AAH22418	48257241
24	AAH19227	48257312
25	AAH57827	35505325
26	NP_004499	40018633
27	AAH89786	58477715
28	CAH91844	55730243
29	XP_418561	50732281
30	AAH06999	48257093
31	CAF98782	47225155
32	NP_808875	29366820
33	XP_507622	55633353
34	AAH82648	52139082
35	NP_001011	58332496
36	AAF29976	6856556
37	AAG10423	9971806
38	O48964	6225525
39	AAF29973	6856550
40	AAF29977	6856558
41	AAQ84167	35186998
42	AAF29974	6856552
43	Q39472	6225526
44	S49588	1085973

Fila	REFERENCIA de Genbank	GI de Genbank
45	AAL91980	19568939
46	BAB40973	13603406
47	AAF29975	6856554
48	T52027	25493162
49	AAL91979	19568937
50	T46812	11362218
51	T51248	11362217
52	BAB40974	13603408
53	O48965	6225532
54	XP_225509	34877710
55	XP_506401	51963472
56	AAF29978	6856560
57	AAH76541	50369278
58	AAT94033	51038230
59	XP_225502	34876517
60	Q39471	6225533
61	AAB67743	1213450
62	NP_197148	22326844
63	BAB09611	9759126
64	AAD41766	5305669
65	AAB67741	1213442
66	XP_395125	48101420
67	AAN28784	23505849
68	AAF36996	7110585
69	BAB16690	15289752
70	AAQ14869	33340598
71	BAC65421	28971819
72	S71369	2129625
73	AAF29979	6856562
74	AAF29980	6856564
75	AAP21674	30267831
76	Q39664	6225534
77	NP_650962	24648688
78	AAM50284	21429130
79	XP_321388	58395620
80	Q9BXS1	20978506
81	T07979	7484383
82	XP_225508	34876527
83	AAT92102	51011386
84	XP_225507	34876555
85	XP_344623	34876537
86	S44843	630677
87	XP_225498	27687955
88	AAT08468	47013849

Fila	REFERENCIA de Genbank	GI de Genbank
89	EAI79636	44370808
90	CAE75055	39587401
91	EAL04047	46444775
92	XP 225528	34876543
93	XP 544282	57040602
94	XP 225511	27688013
95	P26173	114853
96	EAJ04069	44405322
97	EAH27496	44127513
98	AAF91499	9653280
99	AAM48661	21328655
100	EAK17826	44570145
101	EAD59515	43391069
102	YP 128702	54307682
103	EAK66656	44639203
104	YP 118189	54023947
105	T50740	11282665
106	ZP 002077	46193541
107	EAK16470	44568229
108	YP 165403	56695056
109	EAD08775	43285885
110	YP 195623	58616494
111	EAI38918	44313358
112	NP 930583	37527239
113	YP 160254	56478665
114	EAH69842	44206571
115	EAK26254	44582307
116	AAR24381	38569721
117	AAM48607	21328600
118	EAD82049	43454744
119	ZP 001924	45914126
120	YP 056780	50843553
121	YP 050880	50121713
122	EAJ29235	43749645
123	NP 630823	21225044
124	Q82MJ7	34582349
125	ZP 003374	52010110
126	AAS75819	45737905
127	Q8KP37	30913023
128	XP 507621	55633351
129	XP 344621	34876521
130	XP 346322	34880719
131	YP 152060	56414985
132	AAT42442	48429280
133	Q9KK75	13878536
134	NP 806649	29143307

Fila	REFERENCIA de Genbank	GI de Genbank
135	YP 063124	50955836
136	Q8FND7	46395593
137	CAF20647	41326485
138	Q8NN99	23821718
139	Q7X5H2	46395586
140	NP 336246	15841209
141	Q83MJ9	46395588
142	P60923	46395576
143	Q8FE75	31563050
144	IR67A	38493022
145	Q9KWD1	13878537
146	Q7VEU0	46395585
147	B84333	25410326
148	NP 417365	16130791
149	E85944	25355426
150	IHZTA	15826050
151	IPVFB	50513321
152	EAD63579	43403471
153	II9AB	13786886
154	YP 012992	46906603
155	ZP 002293	47091503
156	EAI37194	44310821
157	YP 137864	55380014
158	CAD92056	42516867
159	IOW2B	42543244

Tabla 8. Ejemplos de polipéptidos de FPP sintasa.

Fila	REFERENCIA de Genbank	GI de Genbank
1	Q92250	2497455
2	XP_363065	39948036
3	XP_386960	46124813
4	Q92235	3122099
5	XP_412149	49116518
6	XP_503599	50552378
7	NP_593299	19114211
8	CAD42869	21955860
9	XP_448787	50292709
10	NP_012368	6322294
11	T42081	7433997
12	EAK93751	46434339
13	XP_451300	50302727
14	XP_571137	58267962
15	XP_460720	50424267
16	NP_984739	45190485
17	BAD15361	46367743
18	S71433	7433991
19	CAA65643	1523990
20	XP_399061	49069544
21	S71432	7433990
22	AAH68912	46249832
23	1FPS	1065289
24	P08836	3915686
25	AAH83515	53733369
26	IUBX	1942050
27	IUBY	1942051
28	AAF37872	7188788
29	NP_803463	29135293
30	AAK63847	14488053
31	AAV58896	55710092
32	T06272	7433988
33	JC4846	2117737
34	P05369	120478
35	O24241	25452945
36	O24242	25452946
37	AAH59125	37590777
38	AAH48497	28913418
39	AAP74720	32329199
40	CAG11850	47225367
41	AAM51429	21436457
42	AAP74719	32329197
43	AAM08927	20135548
44	XP_537252	57089113

Fila	REFERENCIA de Genbank	GI de Genbank
45	AAQ56011	34013692
46	AAQ14872	33340604
47	AAQ14871	33340602
48	AAD17204	4324960
49	AAH87886	56789674
50	AAK68152	14573639
51	AAA52423	182399
52	S66470	2129849
53	CAA29064	4725
54	CAI12715	55957735
55	BAA03523	40788949
56	P14324	1346031
57	S66471	2129850
58	AAA35820	182405
59	CAA59170	1491641
60	BAB16687	15289750
61	CAA72793	1922251
62	CAH91070	55728661
63	AAK58594	14279425
64	AAB07264	1146159
65	Q09152	21431776
66	O64905	6016044
67	BAB60822	14422406
68	S52009	1076319
69	NP_917118	34911542
70	AAD32648	4894899
71	AAA40960	203582
72	AAR27053	38684029
73	AAU43998	52353430
74	AAL82595	18958450
75	NP_917069	34911444
76	XP_228802	34879769
77	BAD81810	56785155
78	AAN62522	24796660
79	NP_595334	19112126
80	T52066	25458583
81	AAL49067	17946048
82	CAA08919	3395483
83	XP_547662	57089869
84	EAL26135	54636732
85	BAB60821	14422404
86	AAP74721	32329201
87	XP_496902	51466663
88	XP_474182	50929309

Fila	REFERENCIA de Genbank	GI de Genbank
89	CAA87327	1160178
90	BAD20729	47776234
91	BAC53873	30984142
92	BAB69490	15991313
93	NP_974565	42572937
94	CAA08918	5678609
95	AAP86267	32527731
96	AAO17735	30522953
97	AAK71861	14647139
98	AAL73357	18478919
99	AAO63552	29124957
100	CAI00471	56498227
101	NP_701155	23508486
102	XP_474180	50929305
103	AAL73358	18478922
104	EAH48995	44167328
105	NP_493027	17508563
106	CAE71711	39580204
107	XP_487220	51766977

Tabla 9. Ejemplos de polipéptidos de GGPP sintasa.

Fila	REFERENCIA de Genbank	GI de Genbank
1	AAT92871	51013155
2	XP_447025	50289191
3	NP_984623	45190369
4	XP_390273	46137163
5	XP_404791	49085320
6	XP_368486	39974191
7	Q92236	6831550
8	AAO85432	29468176
9	XP_572774	58271236
10	XP_502923	50550901
11	AAK11525	13021716
12	XP_326920	32412880
13	CAF32032	42820719
14	BAD29965	50355599
15	XP_384767	46117498
16	BAD29970	50355631
17	CAB89115	7649674
18	CAG09545	47229030
19	CAI13753	55960163
20	AAH69913	47124116
21	AAH67768	45709211
22	XP_455003	50309979
23	P56966	9296978
24	NP_001007	56090562
25	AAT65717	49409613
26	NP_956329	41053321
27	BAA90525	6899844
28	XP_405729	49087630
29	AAK11531	13021724
30	XP_412280	49119197
31	AAC05273	2944400
32	NP_523958	24660002
33	XP_402074	49076128
34	EAL30191	54641441
35	XP_536340	57084951
36	XP_424685	50811194
37	AAH06798	13905030
38	AAP06018	29841005
39	XP_460338	50423511
40	AAC05595	2957271
41	EAK92197	46432727
42	XP_535573	57108760
43	AAH83212	53734594
44	XP_486466	51827552

Fila	REFERENCIA de Genbank	GI de Genbank
45	CAH18006	51469024
46	CAA75568	3549881
47	XP_397455	48143654
48	XP_410947	49101294
49	XP_381914	46109712
50	XP_364478	39959279
51	XP_360889	39942704
52	XP_369218	39975655
53	XP_406544	49089926
54	XP_367595	39972409
55	XP_363775	39952117
56	XP_368486	39974191
57	XP_390273	46137163
58	Q92236	6831550
59	AAK11525	13021716
60	CAF32032	42820719
61	XP_404791	49085320
62	AAO85432	29468176
63	BAD29965	50355599
64	BAD29970	50355631
65	BAA90525	6899844
66	AAT65717	49409613
67	XP_384767	46117498
68	CAB89115	7649674
69	XP_572774	58271236
70	AAK11531	13021724
71	XP_502923	50550901
72	CAI13753	55960163
73	CAG09545	47229030
74	XP_412280	49119197
75	P56966	9296978
76	NP_001007	56090562
77	AAH69913	47124116
78	AAH67768	45709211
79	NP_956329	41053321
80	EAL30191	54641441
81	XP_424685	50811194
82	XP_536340	57084951
83	NP_523958	24660002
84	AAC05273	2944400
85	XP_405729	49087630
86	AAC05595	2957271
87	XP_402074	49076128
88	AAP06018	29841005

Fila	REFERENCIA de Genbank	GI de Genbank
89	AAH06798	13905030
90	XP_535573	57108760
91	AAH83212	53734594
92	AAP21085	30097620
93	NP_984623	45190369
94	XP_447025	50289191
95	AAT92871	51013155
96	XP_486466	51827552
97	XP_410947	49101294
98	XP_397455	48143654
99	XP_455003	50309979
100	EAK92197	46432727
101	XP_381914	46109712
102	XP_460338	50423511
103	CAH18006	51469024
104	XP_360889	39942704
105	XP_406544	49089926
106	XP_364478	39959279
107	XP_363775	39952117
108	XP_367595	39972409
109	XP_369218	39975655
110	C39273	483124
111	BAB79600	18143445
112	BAA14124	216682
113	AAN85596	27228290
114	AAA32797	413730
115	Q08291	585326
116	S52584	1073293
117	S53722	1076576
118	AAC44848	1842242
119	BAA19583	1944371
120	S71230	2129674
121	BAA23157	2578822
122	AAC77874	3885426
123	CAB38744	4490594
124	BAA78047	4958920
125	BAA82613	5631295
126	CAB56064	5912297
127	BAA86284	6277254
128	T11021	7447356
129	AAF78199	8650415
130	AAG10424	9971808
131	CAC10561	10637876
132	T50879	11279298
133	BAB01343	11994221
134	Q42698	13431546

Fila	REFERENCIA de Genbank	GI de Genbank
135	Q43133	13431547
136	P54976	13878921
137	BAB50600	14023995
138	BAB60678	14325238
139	BAB60820	14422402
140	NP_189589	15228704
141	NP_188651	15231055
142	NP_188069	15231869
143	NP_188073	15231881
144	AAL01997	15553715
145	AAL01998	15553717
146	NP_252732	15599238
147	NP_245470	15602398
148	NP_390308	16079484
149	NP_440010	16329282
150	NP_440010	16329282
151	AAL17614	17352451
152	NP_520343	17546941
153	AAL76349	18645048
154	AAM21638	20386366
155	AAM21639	20386368
156	NP_622916	20807745
157	AAM48650	21328644
158	NP_659794	21492720
159	AAM64496	21592547
160	AAM65107	21593158
161	NP_680811	22297564
162	ZP_000474	23003800
163	ZP_001252	23469933
164	NP_698760	23502633
165	E84566	25313373
166	F85434	25313385
167	AC1245	25313389
168	E83997	25313393
169	G84566	25313395
170	AH2910	25315863
171	D87505	25398795
172	A89932	25505949
173	F97685	25520741
174	AI3285	25527013
175	BAC42571	26450928
176	NP_785195	28378303
177	NP_790546	28867927
178	AAO63392	28950937
179	AAO93113	29893480
180	NP_833891	30022260

Fila	REFERENCIA de Genbank	GI de Genbank
181	AAP59037	31621279
182	ZP_001374	32039216
183	NP_864766	32471772
184	NP_875521	33240579
185	NP_881399	33593755
186	NP_884694	33597051
187	NP_888456	33600896
188	NP_893187	33861626
189	NP_894940	33863380
190	NP_896835	33865276
191	NP_896835	33865276
192	AAQ65086	34365549
193	NP_945877	39933601
194	NP_946867	39934591
195	NP_952815	39996864
196	AAR37805	40062934
197	AAR37858	40062988
198	AAR98495	41018904
199	AAR99082	41059107
200	NP_965349	42519419
201	NP_980544	42783297
202	EAA96348	42858148
203	EAB36506	42939031
204	EAB36642	42939300
205	EAC39208	43146996
206	EAD26007	43320598
207	EAE43084	43576643
208	EAE70061	43630884
209	EAF70308	43832107
210	EAG88494	44055952
211	EAH52060	44173220
212	EAH78354	44221788
213	EAH84117	44231960
214	EAI11762	44272832
215	EAI49391	44328289
216	EAI54846	44336042
217	EAI68356	44355138
218	EAI68713	44355672
219	EAI69401	44356609
220	EAI73873	44362658
221	EAI73634	44506168
222	EAI77351	44511694
223	EAK70639	44644254
224	ZP_001751	45523854
225	AAS76253	45752710
226	ZP_001957	45916757

Fila	REFERENCIA de Genbank	GI de Genbank
227	IRTRB	46015556
228	ZP_001863	46105954
229	ZP_002002	46107045
230	ZP_001711	46132567
231	ZP_002073	46192680
232	ZP_002074	46192861
233	AAS82860	46241274
234	ZP_002108	46308696
235	YP_010568	46579760
236	BAD18313	47076770
237	ZP_002315	47093750
238	ZP_002335	47095946
239	AAT35222	47531118
240	ZP_002401	47569437
241	ZP_002435	47573473
242	ZP_002626	48728941
243	ZP_002702	48765678
244	ZP_002705	48766028
245	ZP_002732	48768894
246	ZP_002914	48834438
247	ZP_003024	48848203
248	ZP_003129	48858958
249	ZP_003177	48863841
250	ZP_003225	48869790
251	AAT51323	49086036
252	ZP_003301	49236117
253	YP_034222	49476181
254	YP_040995	49483771
255	YP_043579	49486358
256	AAT71982	50253560
257	AAT90315	50952782
258	YP_066435	51246551
259	YP_075673	51892982
260	YP_085511	52141318
261	YP_092166	52786337
262	ZP_001298	53691368
263	YP_105136	53716444
264	YP_111769	53722784
265	ZP_003630	54030933
266	YP_129021	54308001
267	AAV74395	56122554
268	AAV74396	56122556
269	YP_148246	56420928
270	YP_156518	56461237
271	YP_162590	56551751
272	YP_171470	56750769

Fila	REFERENCIA de Genbank	GI de Genbank
273	YP 175959	56964228
274	YP 186407	57650478
275	YP 190690	58038726
276	AAW66658	58201026
277	YP 194187	58337602
278	YP 197469	58579257
279	YP 201938	58582922
280	YP 196510	58617311

Tabla 10. Ejemplos de polipéptidos de escualeno sintasa

Fila	REFERENCIA de Genbank	GI de Genbank
1	AAA34597	171481
2	CAA42583	3686
3	Q9HGZ6	51704336
4	BAB12207	9955387
5	XP_453457	50306959
6	Q752X9	51701405
7	O74165	51701378
8	XP_458579	50420093
9	EAK95451	46436082
10	P78589	2499979
11	Q9Y753	51701459
12	XP_407513	49092104
13	XP_364394	39958237
14	Q7S4Z6	51701416
15	CAD60581	27764301
16	XP_389557	46135731
17	NP_595363	19112155
18	B48057	477750
19	NP_034321	34328173
20	CAH92517	55731622
21	AAF00038	6002565
22	P53798	1706773
23	NP_004453	31542632
24	AAP36671	30584837
25	1EZFC	11514497
26	AAH09251	14328083
27	AAH84016	54035372
28	I52090	2136196
29	XP_420043	50745256
30	AAH81810	51858605
31	CAE48363	50841455
32	XP_569783	58265254
33	XP_569782	58265252
34	XP_534557	57105080
35	XP_401989	49075920

Tabla 11. Ejemplos de polipéptidos de fitoeno deshidrogenasa.

Fila	REFERENCIA de Genbank
1	1613414B
2	1613414F
3	1904206A
4	2121278A
5	A86203
6	A96612
7	A99470
8	AAA24820
9	AAA34001
10	AAA50313
11	AAA64981
12	AAA91161
13	AAA99519
14	AAC44798
15	AAC44850
16	AAC48983
17	AAF78201
18	AAG10426
19	AAG14399
20	AAG28700
21	AAG50743
22	AAH85048
23	AAK51545
24	AAK51557
25	AAK64299
26	AAL02000
27	AAL15300
28	AAL38046
29	AAL73986
30	AAL80005
31	AAL91366
32	AAM45380
33	AAM48646
34	AAM63349
35	AAM94364
36	AAN75037
37	AAN85599
38	AAO24235
39	AAO46892
40	AAO46894
41	AAO53257
42	AAO53258
43	AAO64750
44	AAO93135

Fila	REFERENCIA de Genbank
45	AAP59036
46	AAP79175
47	AAQ04224
48	AAQ04225
49	AAQ65246
50	AAQ65246
51	AAQ88931
52	AAR37797
53	AAR37802
54	AAR37850
55	AAR37855
56	AAR86105
57	AAR98491
58	AAR98494
59	AAR98733
60	AAS17750
61	AAT01639
62	AAT35222
63	AAT74579
64	AAT74580
65	AAT76050
66	AAT76434
67	AAT90316
68	AAU34019
69	AAW23161
70	AB2035
71	AB2064
72	AC2446
73	AF1557
74	AF2029
75	AG2103
76	AG2509
77	AH1199
78	AI2185
79	AI2273
80	B55548
81	B84327
82	B90061
83	BAA14127
84	BAA20276
85	BAA76534
86	BAB10768
87	BAB50520
88	BAB51896

Fila	REFERENCIA de Genbank
89	BAB68552
90	BAB79603
91	BAB82461
92	BAB82462
93	BAB98016
94	BAC75676
95	BAC77668
96	BAC77671
97	BAD07279
98	BAD07280
99	BAD07287
100	BAD07288
101	CAA52098
102	CAA60479
103	CAA66626
104	CAB38739
105	CAB38743
106	CAB40843
107	CAB56041
108	CAB56062
109	CAB59726
110	CAB65434
111	CAB94794
112	CAC85667
113	CAD19989
114	CAD27442
115	CAD55814
116	CAE00192
117	CAE83576
118	CAF19330
119	CAF21094
120	CAF21337
121	CAH91165
122	E90061
123	EAA90383
124	EAA98598
125	EAB09790
126	EAB14136
127	EAB18725
128	EAB29729
129	EAB30992
130	EAB41377
131	EAB54727
132	EAB76679
133	EAB87028
134	EAB92587

Fila	REFERENCIA de Genbank
135	EAB94459
136	EAB96864
137	EAC01884
138	EAC38895
139	EAC60360
140	EAD05874
141	EAD05999
142	EAD20520
143	EAE06978
144	EAE70773
145	EAF04985
146	EAF51354
147	EAF62819
148	EAF75453
149	EAG09111
150	EAG19412
151	EAG23070
152	EAG25053
153	EAG25054
154	EAG29279
155	EAG39845
156	EAG56100
157	EAG63013
158	EAG68633
159	EAG71574
160	EAG89835
161	EAH04928
162	EAH04936
163	EAH08586
164	EAH22597
165	EAH22853
166	EAH31648
167	EAH55579
168	EAH68071
169	EAH73302
170	EAH79041
171	EAH86965
172	EAH97108
173	EAH99977
174	EAI01660
175	EAI03576
176	EAI06784
177	EAI11087
178	EAI15261
179	EAI15547
180	EAI17521

Fila	REFERENCIA de Genbank
181	EAI21398
182	EAI29728
183	EAI38468
184	EAI43591
185	EAI51589
186	EAI58453
187	EAI72974
188	EAI77885
189	EAI78272
190	EAI80262
191	EAI83937
192	EAI86664
193	EAI00517
194	EAI05570
195	EAI08238
196	EAI15524
197	EAI18144
198	EAI20649
199	EAI21683
200	EAI24413
201	EAI28774
202	EAI30522
203	EAI35157
204	EAI37407
205	EAI39929
206	EAI54356
207	EAI54959
208	EAI56207
209	EAI58447
210	EAI59958
211	EAI63347
212	EAI66054
213	EAI67637
214	EAI69812
215	EAI74441
216	EAI76472
217	EAI76473
218	EAI80355
219	EAI80839
220	EAI81408
221	EAI86174
222	EAI87600
223	EAI88203
224	EAI88682
225	EAI92341
226	EAI94774

Fila	REFERENCIA de Genbank
227	EAI97555
228	EAI97958
229	EAK07654
230	EAK08513
231	EAK08529
232	EAK10609
233	EAK10614
234	EAK12902
235	EAK13034
236	EAK15092
237	EAK22483
238	EAK23222
239	EAK24187
240	EAK24674
241	EAK28785
242	EAK34731
243	EAK34742
244	EAK36883
245	EAK37522
246	EAK42705
247	EAK43213
248	EAK52580
249	EAK53452
250	EAK58759
251	EAK62665
252	EAK63558
253	F84187
254	F90272
255	G87635
256	G90413
257	H83880
258	H84320
259	JC7723
260	NP_060220
261	NP_080435
262	NP_193157
263	NP_214383
264	NP_276913
265	NP_293819
266	NP_294534
267	NP_294585
268	NP_295972
269	NP_338490
270	NP_376437
271	NP_377056
272	NP_388895

Fila	REFERENCIA de Genbank
273	NP_441167
274	NP_441254
275	NP_442491
276	NP_442727
277	NP_562475
278	NP_568712
279	NP_601630
280	NP_601630
281	NP_616426
282	NP_624522
283	NP_626360
284	NP_630834
285	NP_643053
286	NP_647302
287	NP_659552
288	NP_661086
289	NP_661546
290	NP_661701
291	NP_662300
292	NP_681023
293	NP_681127
294	NP_682351
295	NP_693380
296	NP_693382
297	NP_737250
298	NP_763380
299	NP_786524
300	NP_822198
301	NP_822828
302	NP_827278
303	NP_851528
304	NP_857496
305	NP_868798
306	NP_869339
307	NP_870237
308	NP_874530
309	NP_874561
310	NP_874977
311	NP_892236
312	NP_892265
313	NP_892458
314	NP_893232
315	NP_894882
316	NP_895385
317	NP_895793
318	NP_895829

Fila	REFERENCIA de Genbank
319	NP_896854
320	NP_896994
321	NP_898304
322	NP_898346
323	NP_902647
324	NP_923340
325	NP_923639
326	NP_923813
327	NP_925079
328	NP_931515
329	NP_936379
330	NP_940208
331	NP_945754
332	NP_946860
333	NP_946866
334	NP_948851
335	NP_962004
336	NP_968600
337	NP_974222
338	NP_974545
339	O49901
340	P17059
341	P54971
342	P54978
343	P54979
344	P54981
345	P54982
346	P74306
347	Q01671
348	Q02861
349	Q38893
350	Q40406
351	Q9FV46
352	Q9SE20
353	Q9SMJ3
354	Q9ZTN9
355	Q9ZTP4
356	S29314
357	S32171
358	S49624
359	S52586
360	S65060
361	T10701
362	T31463
363	T46822
364	T48646

Fila	REFERENCIA de Genbank
365	T50745
366	T50749
367	T50893
368	T50910
369	T51119
370	T51123
371	XP 324732
372	XP 383241
373	XP 401825
374	XP 470568
375	XP 473486
376	XP 477063
377	XP 525801
378	XP 540198
379	YP 006049
380	YP 013621
381	YP 024310
382	YP 041986
383	YP 041988
384	YP 044561
385	YP 044564
386	YP 062471
387	YP 117947
388	YP 120612
389	YP 135077
390	YP 136483
391	YP 145331
392	YP 145348
393	YP 171014
394	YP 172823
395	YP 173078
396	YP 173207
397	YP 184572
398	YP 187368
399	YP 187371
400	YP 187371
401	YP 187371
402	ZP 000490
403	ZP 000509
404	ZP 000518
405	ZP 000566
406	ZP 000627
407	ZP 000627
408	ZP 001073
409	ZP 001081
410	ZP 001091

Fila	REFERENCIA de Genbank
411	ZP 001116
412	ZP 001117
413	ZP 001119
414	ZP 001124
415	ZP 001510
416	ZP 001591
417	ZP 001593
418	ZP 001602
419	ZP 001614
420	ZP 001645
421	ZP 001650
422	ZP 001722
423	ZP 001746
424	ZP 001752
425	ZP 001770
426	ZP 001777
427	ZP 001787
428	ZP 001837
429	ZP 001867
430	ZP 002073
431	ZP 002077
432	ZP 002339
433	ZP 002680
434	ZP 002705
435	ZP 002771
436	ZP 002892
437	ZP 002916
438	ZP 002963
439	ZP 003022
440	ZP 003036
441	ZP 003107
442	ZP 003202
443	ZP 003258
444	ZP 003268
445	ZP 003269
446	ZP 003276
447	ZP 003283
448	ZP 003557
449	ZP 003559
450	ZP 003565
451	ZP 003577
452	ZP 003593
453	ZP 003595
441	ZP 003685

Tabla 12. Ejemplos de polipéptidos de fitoeno sintasa y licopeno ciclasa.

Fila	REFERENCIA de Genbank	GI de Genbank	Fila	REFERENCIA de Genbank	GI de Genbank
1	1613414C	227040	45	AAP79176	32307542
2	A49558	1076590	46	AAQ91837	37499616
3	AAA19428	506623	47	AAR08445	38037628
4	AAA32836	413732	48	AAR31885	39842609
5	AAA64982	148413	49	AAR37803	40062932
6	AAB87738	29893495	50	AAR37856	40062986
7	AAC44849	1842243	51	AAR86104	40456029
8	AAD38051	13542332	52	AAR87868	40557193
9	AAF78202	8650418	53	AAR98492	41018901
10	AAF82616	9081847	54	AAS02284	41394357
11	AAG10427	9971814	55	AAS17009	42491736
12	AAG28701	11066678	56	AAS18307	42521626
13	AAK07734	18476085	57	AAT28184	47498515
14	AAK07735	18476089	58	AAT35222	47531118
15	AAK15621	13195243	59	AAT38473	47779181
16	AAL02001	15553721	60	AAT46069	48686711
17	AAL76346	18645045	61	AAT74581	50313418
18	AAL82578	21326700	62	AAT90319	50952786
19	AAM45379	21360353	63	AAV74394	56122551
20	AAM48647	21328641	64	AAW23162	56698928
21	AAM62787	21553694	65	AC2035	25366683
22	AAM94363	22296799	66	AC2035	25366683
23	AAN85600	27228294	67	BAB18514	11344507
24	AAO24767	27903500	68	BAB79604	18143449
25	AAO39835	28403302	69	BAD07278	40809739
26	AAO46895	37729028	70	BAD07286	40809755
27	AAO47570	33465823	71	BAD62106	54291340
28	AAO73816	33465821	72	BAD62107	54291341
29	AAP22038	30349414	73	C90061	25506636
30	AAP55451	32350232	74	CAA47625	19347
31	AAP55453	32350236	75	CAA68575	19341
32	AAP55461	32350252	76	CAB07958	1934837
33	AAP55471	32350272	77	CAB38740	4490590
34	AAP55484	32350298	78	CAB51949	5690074
35	AAP55486	32350302	79	CAB56063	5912296
36	AAP56083	32349564	80	CAB86388	7453011
37	AAP56124	32349646	81	CAB93661	8250520
38	AAP56127	32349652	82	CAB94795	8574392
39	AAP56136	32349670	83	CAC19567	11990226
40	AAP56148	32349694	84	CAC27383	12584564
41	AAP56155	32349708	85	CAD19988	18307500
42	AAP56156	32349710	86	CAD29284	57282088
43	AAP56157	32349712	87	CAE76609	38567321
44	AAP56158	32349714	88	E37802	95606

Fila	REFERENCIA de Genbank	GI de Genbank
89	E84320	25410251
90	EAA98758	42863045
91	EAB01965	42869439
92	EAB04170	42873822
93	EAB07138	42879858
94	EAB09791	42885235
95	EAB19826	42905452
96	EAB35029	42936011
97	EAB41375	42948740
98	EAB78706	43024004
99	EAB92586	43052355
100	EAC06949	43081493
101	EAC18360	43104624
102	EAC25793	43119723
103	EAC29883	43128092
104	EAC32813	43133973
105	EAC33105	43134560
106	EAC38486	43145552
107	EAC52233	43173313
108	EAC60029	43189028
109	EAC68026	43204953
110	EAC96197	43261031
111	EAD08701	43285745
112	EAD20866	43310220
113	EAD32755	43334458
114	EAD38008	43345761
115	EAD50152	43370658
116	EAD50402	43371147
117	EAD81123	43452903
118	EAD93882	43478303
119	EAE12860	43516265
120	EAE16121	43522884
121	EAE31084	43552634
122	EAE35665	43561764
123	EAE44717	43579862
124	EAE46627	43583580
125	EAE47846	43586023
126	EAE72264	43635190
127	EAE76009	43642573
128	EAE86335	43662748
129	EAE89581	43669163
130	EAF18881	43728007
131	EAF64277	43819669
132	EAF67931	43827263
133	EAF84745	43861327
134	EAF94004	43880040

Fila	REFERENCIA de Genbank	GI de Genbank
135	EAG06083	43903395
136	EAG21950	43933540
137	EAG43625	43973477
138	EAG50171	43985555
139	EAG57517	43999205
140	EAG62787	44009110
141	EAG65580	44014171
142	EAG68110	44018715
143	EAG72283	44026322
144	EAG78750	44037938
145	EAG80445	44041116
146	EAG93220	44064453
147	EAH04927	44085694
148	EAH08972	44093217
149	EAH10377	44095788
150	EAH22151	44117864
151	EAH31461	44134654
152	EAH50033	44169323
153	EAH64480	44196848
154	EAH79040	44223009
155	EAH99976	44255671
156	EAI02786	44259828
157	EAI02787	44259829
158	EAI03575	44260943
159	EAI05900	44264266
160	EAI61004	44344824
161	EAI70669	44358327
162	EAI83938	44377067
163	EAJ05110	44406802
164	EAJ05569	44407471
165	EAJ08876	44412338
166	EAJ35156	44449986
167	EAJ38900	44455130
168	EAJ49645	44470504
169	EAJ54357	44477026
170	EAJ60475	44485647
171	EAJ64125	44492007
172	EAJ67499	44497025
173	EAJ76471	44510405
174	EAJ76950	44511114
175	EAJ78637	44513596
176	EAJ78787	44513824
177	EAJ79616	44515082
178	EAJ80356	44516200
179	EAJ81914	44518489
180	EAJ87417	44526623

Fila	REFERENCIA de Genbank	GI de Genbank
181	EAK08514	44557109
182	EAK08523	44557119
183	EAK12901	44563097
184	EAK22180	44576315
185	EAK24859	44580262
186	EAK28345	44585276
187	EAK34732	44594324
188	EAK34736	44594329
189	EAK37296	44597942
190	EAK37521	44598256
191	EAK56335	44624430
192	G84363	25410528
193	NP 274195	15677043
194	NP 284085	15794263
195	NP 294586	15805888
196	NP 388961	16078144
197	NP 441168	16330440
198	NP 443763	16519643
199	NP 624523	21218744
200	NP 630832	21225053
201	NP 662273	21674208
202	NP 682350	22299103
203	NP 693381	23099915
204	NP 786525	28379633
205	NP 822199	29827565
206	NP 822829	29828195
207	NP 851527	30795077
208	NP 868799	32475805
209	NP 874560	33239618
210	NP 879992	33592348
211	NP 884101	33596458
212	NP 889809	33602249
213	NP 892264	33860703
214	NP 895828	33864268
215	NP 898345	33866786
216	NP 902648	34498433
217	NP 902649	34498434
218	NP 924690	37521313
219	NP 931516	37528171
220	NP 946861	39934585
221	NP 949079	39936803
222	NP 962005	41409169
223	NP 968601	42523221
224	O07333	3913360
225	P08196	585746
226	P21683	30923192

Fila	REFERENCIA de Genbank	GI de Genbank
227	P37269	585009
228	P37271	27735222
229	P37272	585749
230	P53797	1709885
231	P54975	1706137
232	P54977	1706139
233	P65860	54041032
234	Q9SSU8	8928282
235	Q9UUQ6	34922667
236	S22474	7489041
237	S32170	321671
238	S52587	1073300
239	S56668	2129505
240	S68307	2130144
241	T10702	7484346
242	T46594	11291807
243	T50746	11356347
244	T50895	11291816
245	XP 324765	32408567
246	XP 383242	46114448
247	XP 403902	49080862
248	YP 006040	46255128
249	YP 103126	53723680
250	YP 112342	53723357
251	YP 117945	54023703
252	YP 120611	54026369
253	YP 136628	55378778
254	YP 136629	55378779
255	YP 145340	55978284
256	YP 145343	55978287
257	YP 160917	56479328
258	YP 160918	56479329
259	YP 162605	56551766
260	YP 172822	56752121
261	YP 187369	57652299
262	YP 192648	58040684
263	ZP 000044	22956752
264	ZP 001091	53688068
265	ZP 001591	53763709
266	ZP 001657	45514234
267	ZP 001690	46132223
268	ZP 001746	45523280
269	ZP 001837	53771530
270	ZP 001867	45546711
271	ZP 002096	46204978
272	ZP 002248	46324513

Fila	REFERENCIA de Genbank	GI de Genbank
273	ZP_002450	47575031
274	ZP_002680	48763469
275	ZP_002710	48766450
276	ZP_002791	48782680
277	ZP_002892	48832182
278	ZP_002916	48834623
279	ZP_003036	48849426
280	ZP_003269	48893702
281	ZP_003351	52007802
282	ZP_003487	53730362
283	ZP_003501	53759405
284	ZP_003591	53798896
285	ZP_003628	54030691

Tabla 13. Ejemplos de polipéptidos de carotenoide cetolasa.

Fila	Número de referencia	Número de GI	Fila	Número de referencia	Número de GI
1	AAA99932	609575	45	EAI53009	44333409
2	AAB48668	1870215	46	EAI54054	44334878
3	AAC25611	2541936	47	EAI67818	44354362
4	AAF78203	8650419	48	EAI68153	44354875
5	AAH16427	16741158	49	EAI89684	44384943
6	AAN03484	22597194	50	EAI27674	44439188
7	AAN85497	26541510	51	EAI45589	44464684
8	AAN86030	33439708	52	EAI45589	44464684
9	AAO64399	28976134	53	EAI67118	44496466
10	AAQ23139	33621091	54	EAI74221	44507022
11	AAT35222	47531118	55	EAI74653	44507662
12	AAT35555	47558911	56	EAI88396	44528064
13	AAV41372	55139370	57	EAI88887	44528792
14	AB2307	25530134	58	EAK06069	44553531
15	AF2204	25533132	59	EAK11467	44561166
16	BAB54999	14028447	60	EAK16824	44568733
17	BAB58879	14270087	61	EAK28828	44585942
18	BAC98366	37360914	62	EAK28828	44585942
19	CAA60478	2654318	63	EAK31112	44589271
20	CAB56059	5912292	64	EAK42591	44605441
21	D87673	25398945	65	NP_045063	11465545
22	EAA79304	42823978	66	NP_081575	27754029
23	EAA80363	42826055	67	NP_338204	15843167
24	EAA81403	42828115	68	NP_440788	16330060
25	EAA84711	42834481	69	NP_441220	16330492
26	EAB82380	43031476	70	NP_682690	22299443
27	EAB86624	43040184	71	NP_770721	27379192
28	EAC05755	43079085	72	NP_848964	30468077
29	EAD12219	43292778	73	NP_857223	31794730
30	EAD71182	43427899	74	NP_881760	33594116
31	EAD94927	43480380	75	NP_882469	33594826
32	EAF11582	43712986	76	NP_886657	33599097
33	EAF98072	43888329	77	NP_895643	33864083
34	EAG19345	43928738	78	NP_896386	33864827
35	EAG38273	43963688	79	NP_897461	33865902
36	EAG79800	44039853	80	NP_924674	37521297
37	EAG96474	44070318	81	NP_927525	37524181
38	EAH00349	44077315	82	NP_947075	39934799
39	EAH36448	44143633	83	P54972	1706150
40	EAH40683	44151265	84	Q39982	2498257
41	EAH53180	44175316	85	Q44261	2498256
42	EAH96648	44250729	86	T31123	11361063
43	EAI05260	44263397	87	XP_330780	32420673
44	EAI17468	44281329	88	XP_368852	39974923

Fila	Número de referencia	Número de GI
89	XP 380194	46102628
90	XP 383758	46115480
91	XP 405100	49086048
92	XP 409222	49095522
93	YP 102417	53725671
94	YP 108945	53719959
95	YP 132414	54302421
96	YP 154670	56459389
97	YP 166682	56696325
98	YP 168846	56698471
99	YP 172377	56751676
100	ZP 001068	23124870
101	ZP 001112	53688676
102	ZP 001607	53764743
103	ZP 001757	46118877
104	ZP 001787	53736018
105	ZP 002218	46321435
106	ZP 002456	47575608
107	ZP 003028	48848557
108	ZP 003107	48856640
109	ZP 003264	48893204
110	ZP 003458	53688805
111	ZP 003513	53763576

Tabla 14. Ejemplos de polipéptidos de carotenoide hidroxilasa.

Fila	REFERENCIA de Genbank	GI de Genbank	Fila	REFERENCIA de Genbank	GI de Genbank
1	AAC44852	1842246	44	EAI00766	44256844
2	AAC49443	1575296	45	EAI29017	44298625
3	AAD54243	5852870	46	EAJ30844	44443849
4	AAG10430	9971820	47	EAJ72524	44504516
5	AAG10793	9988836	48	EAK10611	44559981
6	AAG33636	11245486	49	EAK53455	44620561
7	AAL80006	19071768	50	EAK63955	44635271
8	AAM44971	21280903	51	H90469	25394049
9	AAM51300	21436107	52	NP 745389	26989964
10	AAM77007	21734857	53	NP 922503	37536402
11	AAN85601	27228295	54	P54973	1706152
12	AAO53295	28911949	55	Q44262	2498258
13	AAS48097	44887642	56	S52982	1073291
14	AAS55552	45184599	57	XP 473611	50928167
15	AAS88426	46326968	58	YP 024309	48478603
16	AAT48741	49036137	59	ZP 003055	48851297
17	AAT84408	50844570	60	ZP 003107	48856620
18	AAV85452	56267980			
19	AAV85453	56267982			
20	BAA14129	216687			
21	BAB79605	18143450			
22	BAC77670	31790567			
23	BAD07283	40809749			
24	BAD07291	40809765			
25	CAA70427	2956671			
26	CAA70888	2956717			
27	CAB55625	5870598			
28	CAB55626	5870600			
29	CAB56060	5912293			
30	CAC06712	9968545			
31	CAC95130	33145986			
32	EAB30128	42926157			
33	EAC49462	43167766			
34	EAC86129	43241003			
35	EAD61089	43395962			
36	EAD76156	43443111			
37	EAD88640	43467793			
38	EAE27903	43546376			
39	EAE28203	43546980			
40	EAE78743	43647896			
41	EAF12173	43714211			
42	EAH29370	44130906			
43	EAH44202	44158360			

Tabla 15. Ejemplos de polipéptidos de astaxantina sintasa y polipéptidos de astaxantina sintasa potenciales.

Fila	REFERENCIA de Genbank	GI de Genbank
1	AAM56288	21501451
2	XP_571276	58268240
3	EAL20013	50257304
4	XP_401804	49075484
5	XP_397817	49067054
6	XP_399595	49070612
7	XP_403279	49079218
8	XP_382294	46110473
9	XP_406021	49088382
10	XP_381224	46108332
11	XP_391479	46139577
12	XP_569261	58264210
13	EAL22841	50260180
14	XP_359866	39940658

Tabla 16. Ejemplos de polipéptidos de carotenoide épsilon hidroxilasa.

REFERENCIA	GI	DESCRIPCIÓN DE LA PROTEÍNA
ABB52076	79155148	Caroteno de anillo épsilon hidrolasa potencial [<i>Daucus carota</i> subsp. <i>sativus</i>]
BAD94136	62319017	Proteína de tipo citocromo P450 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
ABD28565	87162770	P450 de clase E, grupo I [<i>Medicago truncatula</i>]
AAT28222	47498772	Citocromo P450 de tipo 97B2 potencial [<i>Ginkgo biloba</i>]
ABC68396	85001685	Citocromo P450 monooxigenasa CYP97A [<i>Glycine max</i>]
ABC59110	84514203	Citocromo P450 monooxigenasa CYP97B [<i>Medicago truncatula</i>]
NP_190881	42565881	LUT1 (DEFICIENTE EN LUTEINA 1); unión a oxígeno [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
ABB47954	78708979	citocromo P450 monooxigenasa, potencial [<i>Oryza sativa</i> (grupo de cultivar japónica)]
NP_922604	37536604	citocromo P450 monooxigenasa potencial [<i>Oryza sativa</i> (grupo de cultivar japónica)]

5

Tabla 17. Ejemplos de polipéptidos de licopeno ciclasa, subunidades beta y épsilon.

REFERENCIA	GI	DESCRIPCIÓN DE LA PROTEÍNA
AAK07431	12746307	licopeno épsilon-ciclasa [<i>Adonis palaestina</i>]
ABB52073	79154988	licopeno épsilon ciclasa potencial [<i>Daucus carota</i> subsp. <i>sativus</i>]
Q38932	27735211	Licopeno épsilon ciclasa, precursor de cloroplastos
AAB53336	1399181	licopeno épsilon ciclasa
AAG10428	9971816	épsilon ciclasa [<i>Tagetes erecta</i>]
AAK07434	12746313	licopeno épsilon-ciclasa [<i>Lactuca sativa</i>]
AAM45382	21360359	épsilon ciclasa [<i>Tagetes erecta</i>]
O65837	11132841	Licopeno épsilon ciclasa, precursor de cloroplastos
AAL69394	18419661	licopeno épsilon-ciclasa [<i>Spinacia oleracea</i>]
BAE79549	87299433	licopeno épsilon-ciclasa [<i>Chrysanthemum x morifolium</i>]
XP_463351	50901836	licopeno épsilon-ciclasa potencial [<i>Oryza sativa</i> (grupo de cultivar japónica)]
AAS48096	44887640	épsilon licopeno ciclasa [<i>Citrus sinensis</i>]
AAX92679	62638188	licopeno épsilon ciclasa [<i>Citrus maxima</i>]
AAL92114	19569601	licopeno épsilon-ciclasa [<i>Citrus x paradisi</i>]
AAK07433	12746311	licopeno épsilon-ciclasa [<i>Solanum tuberosum</i>]
AAL47019	17864021	licopeno épsilon-ciclasa [<i>Citrus sinensis</i>]

REFERENCIA	GI	DESCRIPCIÓN DE LA PROTEÍNA
AAT46065	48686703	precursor de licopeno épsilon-ciclase de cloroplastos [<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>]
BAD07293	40809769	licopeno épsilon-ciclase [<i>Citrus limon</i>]
BAD07285	40809753	licopeno épsilon-ciclase [<i>Citrus sinensis</i>]
BAD07277	40809737	licopeno épsilon-ciclase [<i>Citrus unshiu</i>]
EAJ62839	44489138	desconocida [secuencia ambiental]
BAE43547	73993068	licopeno beta ciclase potencial [<i>Taxodium distichum</i> var. <i>distichum</i>]
BAE43550	73993074	licopeno beta ciclase potencial [<i>Taxodium distichum</i> var. <i>distichum</i>]
BAE43557	73993088	licopeno beta ciclase potencial [<i>Taxodium distichum</i> var. <i>imbricarium</i>]
BAE43558	73993090	licopeno beta ciclase potencial [<i>Taxodium distichum</i> var. <i>imbricarium</i>]
BAE43553	73993080	licopeno beta ciclase potencial [<i>Taxodium distichum</i> var. <i>imbricarium</i>]
BAE43545	73993064	licopeno beta ciclase potencial [<i>Taxodium distichum</i> var. <i>distichum</i>]
BAE43556	73993086	licopeno beta ciclase potencial [<i>Taxodium distichum</i> var. <i>imbricarium</i>]
BAE43552	73993078	licopeno beta ciclase potencial [<i>Taxodium distichum</i> var. <i>distichum</i>]
BAE43560	73993094	licopeno beta ciclase potencial [<i>Taxodium distichum</i> var. <i>imbricarium</i>]
BAE43554	73993082	licopeno beta ciclase potencial [<i>Taxodium distichum</i> var. <i>imbricarium</i>]
BAE43551	73993076	licopeno beta ciclase potencial [<i>Taxodium distichum</i> var. <i>distichum</i>]
BAE43519	73993012	licopeno beta ciclase potencial [<i>Cryptomeria japonica</i>]
BAE43535	73993044	licopeno beta ciclase potencial [<i>Cryptomeria japonica</i>]
BAE43541	73993056	licopeno beta ciclase potencial [<i>Cryptomeria japonica</i>]
BAE43542	73993058	licopeno beta ciclase potencial [<i>Cryptomeria japonica</i>]
BAE43517	73993008	licopeno beta ciclase potencial [<i>Cryptomeria japonica</i>]
BAE43534	73993042	licopeno beta ciclase potencial [<i>Cryptomeria japonica</i>]
BAE43537	73993048	licopeno beta ciclase potencial [<i>Cryptomeria japonica</i>]
BAE43533	73993040	licopeno beta ciclase potencial [<i>Cryptomeria japonica</i>]
BAD02774	38603277	licopeno beta ciclase potencial [<i>Cryptomeria japonica</i>]
BAD02766	38603261	licopeno beta ciclase potencial [<i>Cryptomeria japonica</i>]
BAE43540	73993054	licopeno beta ciclase potencial [<i>Cryptomeria japonica</i>]
BAE43514	73993002	licopeno beta ciclase potencial [<i>Cryptomeria japonica</i>]
BAE43544	73993062	licopeno beta ciclase potencial [<i>Cryptomeria japonica</i>]
BAE43538	73993050	licopeno beta ciclase potencial [<i>Cryptomeria japonica</i>]
BAE43528	73993030	licopeno beta ciclase potencial [<i>Cryptomeria japonica</i>]
BAE43546	73993066	licopeno beta ciclase potencial [<i>Taxodium distichum</i> var. <i>distichum</i>]
BAE43526	73993026	licopeno beta ciclase potencial [<i>Cryptomeria japonica</i>]
BAE43543	73993060	licopeno beta ciclase potencial [<i>Cryptomeria japonica</i>]
BAD02742	38603213	licopeno beta ciclase potencial [<i>Cryptomeria japonica</i>]
BAD02770	38603269	licopeno beta ciclase potencial [<i>Cryptomeria japonica</i>]
BAE43522	73993018	licopeno beta ciclase potencial [<i>Cryptomeria japonica</i>]
BAE43559	73993092	licopeno beta ciclase potencial [<i>Taxodium distichum</i> var. <i>imbricarium</i>]
BAE43527	73993028	licopeno beta ciclase potencial [<i>Cryptomeria japonica</i>]
BAE43548	73993070	licopeno beta ciclase potencial [<i>Taxodium distichum</i> var. <i>distichum</i>]
AAF44700	14550425	licopeno beta-ciclase [<i>Citrus sinensis</i>]
BAE43555	73993084	licopeno beta ciclase potencial [<i>Taxodium distichum</i> var. <i>imbricarium</i>]
BAE43549	73993072	licopeno beta ciclase potencial [<i>Taxodium distichum</i> var. <i>distichum</i>]
AAU14144	51922063	licopeno beta-ciclase [<i>Citrus sinensis</i>]
AAN86060	27261727	licopeno ciclase [<i>Citrus unshiu</i>]
AAR89632	40756518	licopeno-beta-ciclase [<i>Citrus máxima</i>]
AAM21152	20530862	licopeno beta-ciclase [<i>Citrus sinensis</i>]
AAD38049	13959731	licopeno ciclase [<i>Citrus x paradisi</i>]

REFERENCIA	GI	DESCRIPCIÓN DE LA PROTEÍNA
AAU05146	51511939	licopeno beta-ciclasa [<i>Citrus sinensis</i>]
AAU05145	51511937	licopeno beta-ciclasa [<i>Citrus sinensis</i>]
AAK07430	12746305	licopeno beta-ciclasa [<i>Adonis palaestina</i>]
ABB72443	82394885	licopeno beta-ciclasa [<i>Citrus sinensis</i>]
BAE79544	87299423	licopeno beta-ciclasa [<i>Chrysanthemum x morifolium</i>]
BAE78471	85717882	licopeno beta ciclasa [<i>Taraxacum officinale</i>]
Q43415	11133019	Licopeno beta ciclasa, precursor de cloroplastos
AAF23013	6665782	licopeno épsilon-ciclasa [<i>Daucus carota</i>]
ABB52071	79154899	licopeno beta ciclasa potencial [<i>Daucus carota</i> subsp. <i>sativus</i>]
AAW88382	59665024	licopeno beta-ciclasa [<i>Lycium barbarum</i>]
AAG10429	9971818	beta ciclasa [<i>Tagetes erecta</i>]
AAM45381	21360357	beta ciclasa [<i>Tagetes erecta</i>]
AAM14335	20259239	licopeno beta ciclasa potencial [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
AAO18661	27728515	licopeno beta-ciclasa [<i>Zea mays</i>]
AAA81880	735882	licopeno ciclasa
Q43503	11133022	Licopeno beta ciclasa, precursor de cloroplastos
S66350	2129931	licopeno beta-ciclasa (EC 5.5.1.-) - tomate
XP_464409	50905841	licopeno beta-ciclasa potencial [<i>Oryza sativa</i> (grupo de cultivar japónica)]
CAD70565	45237491	licopeno ciclasa [<i>Bixa orellana</i>]
Q43578	11133025	Licopeno beta ciclasa, precursor de cloroplastos
AAL92175	19569782	beta-licopeno ciclasa [<i>Sandersonia aurantiaca</i>]
AAX54906	61742130	precursor de licopeno beta ciclasa de cloroplastos potencial [<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>]
S66349	2129954	licopeno beta-ciclasa (EC 5.5.1.-) - tabaco común
AAG21133	10644119	licopeno beta-ciclasa específico de cloroplastos [<i>Lycopersicon esculentum</i>]
CAB92977	8247354	neoxantina sintasa [<i>Solanum tuberosum</i>]
CAB93342	8249885	neoxantina sintasa [<i>Lycopersicon esculentum</i>]
Q9SEA0	11131528	Capsantina/capsorrubina sintasa, precursor de cloroplastos
Q42435	12643508	Capsantina/capsorrubina sintasa, precursor de cloroplastos
AA064977	37730608	licopeno beta ciclasa [<i>Haematococcus pluvialis</i>]
Q40424	11133011	Licopeno beta ciclasa, precursor de cloroplastos
ABB52072	79154940	capsantina-capsorrubina sintasa potencial [<i>Daucus carota</i> subsp. <i>sativus</i>]
AAQ02668	33304511	licopeno ciclasa [<i>Setaria italica</i>]
CAA54961	840729	Óxido-reductasa cromoplástica potencial [<i>Capsicum annum</i>]
EAJ62838	44489136	desconocida [secuencia ambiental]
YP_401079	81300871	Licopeno ciclasa, beta y épsilon [<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 7942]
YP_172741	56752040	licopeno ciclasa [<i>Synechococcus elongatus</i> PCC 6301]
ZP_011...	88808972	licopeno beta ciclasa [<i>Synechococcus</i> sp. WH 7805]
EAK50052	44615956	desconocida [secuencia ambiental]
NP_892751	33861190	licopeno épsilon ciclasa potencial [<i>Prochlorococcus marinus</i> subsp. <i>pastoris</i> cepa CCMP1986]
NP_875182	33240240	Licopeno épsilon ciclasa [<i>Prochlorococcus marinus</i> subsp. <i>marinus</i> cepa CCMP1375]
YP_382237	78213458	Licopeno ciclasa, beta y épsilon [<i>Synechococcus</i> sp. CC9605]
YP_397130	78779018	Licopeno ciclasa, beta y épsilon [<i>Prochlorococcus marinus</i> cepa MIT 9312]
NP_896821	33865262	licopeno beta ciclasa [<i>Synechococcus</i> sp. WH 8102]
YP_397570	78779458	Licopeno ciclasa, beta y épsilon [<i>Prochlorococcus marinus</i> cepa MIT

REFERENCIA	GI	DESCRIPCIÓN DE LA PROTEÍNA
		9312]
ZP_010...	87302144	licopeno ciclasa [<i>Synechococcus</i> sp. WH 5701]
EAK17149	44569190	desconocida [secuencia ambiental]
YP_291882	72382527	licopeno ciclasa, beta y épsilon [<i>Prochlorococcus marinus</i> cepa NATL2A]
NP_875528	33240586	deshidrogenasa relacionada con licopeno beta ciclasa [<i>Prochlorococcus marinus</i> subsp. <i>marinus</i> cepa CCMP1375]
NP_893181	33861620	licopeno beta ciclasa potencial [<i>Prochlorococcus marinus</i> subsp. <i>pastoris</i> cepa CCMP1986]
NP_895600	33864040	licopeno épsilon ciclasa potencial [<i>Prochlorococcus marinus</i> cepa MIT 9313]
EAI47456	44325573	desconocida [secuencia ambiental]
YP_291268	72381913	licopeno ciclasa, beta y épsilon [<i>Prochlorococcus marinus</i> cepa NATL2]
ZP_010...	84517806	deshidrogenasa relacionada con licopeno beta ciclasa [<i>Prochlorococcus marinus</i> cepa MIT 9211]
AAF34191	6970079	licopeno épsilon ciclasa [<i>Daucus carota</i>]
ZP_010...	84518202	Licopeno épsilon ciclasa [<i>Prochlorococcus marinus</i> cepa MIT 9211]
YP_376736	78184301	Licopeno ciclasa, beta y épsilon [<i>Synechococcus</i> sp. CC9902]
ZP_003...	66796756	Licopeno ciclasa, beta y épsilon [<i>Deinococcus geothermalis</i> DSM 11300]
NP_894954	33863394	licopeno beta ciclasa potencial [<i>Prochlorococcus marinus</i> cepa MIT 9313]
AAT76051	50365502	licopeno ciclasa [<i>Citrus clementina</i>]
EAK22047	44576122	desconocida [secuencia ambiental]
NP_294525	15805827	licopeno ciclasa [<i>Deinococcus radiodurans</i> R1]

Tabla 18. Ejemplos de polipéptidos de carotenoide glucosiltransferasa.

REFERENCIA	GI	DESCRIPCIÓN DE LA PROTEÍNA
AAA21261	148395	CrtX [<i>Pantoea agglomerans</i>]
AAN85597	27228291	Zeaxantina Glucosil Transferasa [<i>Pantoea stewartii</i>]
BAB79601	18143446	crtX [<i>Pantoea agglomerans</i> pv. <i>milletiae</i>]
AAZ73147	72536082	zeaxantina glucosil transferasa [<i>Enterobacteriaceae bacterium</i> DC413]
AAZ73128	72536060	zeaxantina glucosil transferasa [<i>Enterobacteriaceae bacterium</i> DC260]
AAZ73140	72536074	zeaxantina glucosil transferasa [<i>Enterobacteriaceae bacterium</i> DC416]
Q01330	231911	Zeaxantina glucosil transferasa
ZP_006...	71674312	UDP-glucosiltransferasa, MGT [<i>Trichodesmium erythraeum</i> IMS101]
NP_439972	16329244	zeaxantina glucosil transferasa [<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803]
EAH29368	44130903	desconocida [secuencia ambiental]
ZP_005...	67926135	zeaxantina glucosil transferasa, proteína hipotética [<i>Crocospaera watsonii</i> WH 8501]
YP_378763	78188425	proteína hipotética Cag_0447 [<i>Chlorobium chlorochromatii</i> CaD3]
ZP_005...	68549418	Glucosil transferasa, grupo 1 [<i>Pelodictyon phaeoclathratiforme</i> BU-1]
ZP_010...	85713606	glucosil transferasa, grupo 1 [<i>Nitrobacter</i> sp. Nb-311A]
YP_317171	75674750	glucosil transferasa, grupo 1 [<i>Nitrobacter winogradskyi</i> Nb-255]
ZP_006...	69929171	Glucosil transferasa, grupo 1 [<i>Nitrobacter hamburgensis</i> XI4]
ZP_009...	84500589	proteína hipotética OB2597_11541 [<i>Oceanicola batsensis</i> HTCC2597]
ZP_009...	83953176	proteína hipotética NAS141_12746 [<i>Sulfitobacter</i> sp. NAS-14.1]
ZP_009...	83942121	proteína hipotética EE36_07793 [<i>Sulfitobacter</i> sp. EE-36]
YP_508020	89052569	glucosil transferasa, grupo 1 [<i>Jannaschia</i> sp. CCS1]
ZP_010...	85704103	proteína hipotética ROS217_13931 [<i>Roseovarius</i> sp. 217]
ZP_009...	83370850	glucosiltransferasa probable [<i>Rhodobacter sphaeroides</i> ATCC 17025]

REFERENCIA	GI	DESCRIPCIÓN DE LA PROTEÍNA
ZP_006...	69934465	Glucosil transferasa, grupo 1 [<i>Paracoccus denitrificans</i> PD1222]
ZP_009...	83949880	glucosiltransferasa probable [<i>Roseovarius nubinhibens</i> ISM]
YP_376237	78183803	glucosiltransferasa potencial [<i>Synechococcus</i> sp. CC9902]
YP_376129	78183695	glucosiltransferasa probable [<i>Synechococcus</i> sp. CC9902]
YP_374296	78186253	proteína hipotética Plut_0365 [<i>Pelodictyon luteolum</i> DSM 273]
ZP_010...	87301651	Glucosiltransferasa potencial [<i>Synechococcus</i> sp. WH 5701]
ZP_011...	88809938	Glucosiltransferasa potencial [<i>Synechococcus</i> sp. WH 7805]
BAE47471	78483937	carotenoide glucosiltransferasa [<i>Paracoccus</i> sp. N81106]
ZP_010...	87303273	glucosiltransferasa probable [<i>Synechococcus</i> sp. WH 5701]
YP_376127	78183693	glucosiltransferasa probable [<i>Synechococcus</i> sp. CC9902]
YP_501334	88196509	proteína hipotética SAOUHSC_02880 [<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> NCTC 8325]
YP_187370	57652300	glucosil transferasa, proteína de la familia del grupo 2 [<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> COL]
CAA66627	1340131u	producto proteico no nombrado [<i>Staphylococcus aureus</i>]
YP_041987	49484763	glucosil transferasa potencial [<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> MRSA252]
YP_417885	82752144	proteína hipotética SAB2436c [<i>Staphylococcus aureus</i> RF122]
YP_252404	70725490	proteína hipotética SH0489 [<i>Staphylococcus haemolyticus</i> JCSC1435]
NP_693379	23099913	proteína hipotética OB2458 [<i>Oceanobacillus iheyensis</i> HTE831]
ZP_008...	82501285	proteína hipotética conservada [<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> DSM 8903]
ZP_010...	87303565	proteína hipotética WH5701_09900 [<i>Synechococcus</i> sp. WH 5701]

Tabla 19. Ejemplos de polipéptidos de acil CoA:diacilglicerol aciltransferasa (DGAT).

REFERENCIA	GI	DESCRIPCIÓN DE LA PROTEÍNA
XP_957022	85082953	proteína hipotética [<i>Neurospora crassa</i> NI50]
XP_386864	46124621	proteína hipotética FG06688.1 [<i>Gibberella zeae</i> PH-1]
XP_755172	71000982	diacilglicerol O-aciltransferasa DGAT [<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293]
XP_663763	67539978	proteína hipotética AN6159.2 [<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4]
BAE65302	83775179	producto proteico no nombrado [<i>Aspergillus oryzae</i>]
XP_502557	50550169	proteína hipotética [<i>Yarrowia lipolytica</i>]
AAS78662	56199782	diacilglicerol aciltransferasa [<i>Glycine max</i>]
ABB84383	82582915	diacilglicerol aciltransferasa [<i>Jatropha curcas</i>]
AAV31083	54145459	1,2-diacil-sn-glicerol:acil-CoA aciltransferasa [<i>Euonymus alatus</i>]
AAG23696	10803053	diacilglicerol aciltransferasa [<i>Perilla frutescens</i>]
AAF64065	7576941	diacilglicerol aciltransferasa potencial [<i>Brassica napus</i>]
AAS01606	41387497	acil-CoA:diacilglicerol aciltransferasa 1 [<i>Olea europaea</i>]
AAT73629	50299542	acil CoA:diacilglicerol aciltransferasa [<i>Glycine max</i>]
AAM03340	67043496	diacilglicerol aciltransferasa potencial [<i>Tropaeolum majus</i>]
XP_645633	66824557	proteína hipotética DDB0202877 [<i>Dictyostelium discoideum</i>]
AAF19345	6625653	diacilglicerol acilCoA aciltransferasa [<i>Nicotiana tabacum</i>]
AAV40785	63376239	diacilglicerol aciltransferasa DGAT2 [<i>Brassica juncea</i>]
AAW47581	57231736	diacilglicerol aciltransferasa [<i>Oryza sativa</i> (grupo de cultivar japónica)]
AAR11479	38146080	diacilglicerol aciltransferasa [<i>Ricinus communis</i>]
AAV40784	63376226	diacilglicerol aciltransferasa DGAT1 [<i>Brassica juncea</i>]
AAP68322	31711932	At2g19450 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]
AAW51456	57545061	diacilglicerol aciltransferasa [<i>Lotus corniculatus</i> var. <i>japonicus</i>]
AAD45536	5579408	diacilglicerol aciltransferasa potencial [<i>Brassica napus</i>]

REFERENCIA	GI	DESCRIPCIÓN DE LA PROTEÍNA
BAD53762	53791817	acil-CoA:diacilglicerol aciltransferasa potencial [<i>Oryza sativa</i> (grupo de cultivar japónica)]
NP_956024	41054343	proteína hipotética LOC325875 [<i>Danio rerio</i>]
AAL49962	18642598	diacilglicerol aciltransferasa 1 [<i>Bos taurus</i>]
XP_930884	89028385	similar a Diacilglicerol O-aciltransferasa 1 (Diglicérido aciltransferasa) (gen relacionado con ACAT) [<i>Homo sapiens</i>]
NP_777118	27819636	diacilglicerol O-aciltransferasa 1 [<i>Bos taurus</i>]
Q9GMF1	18202926	Diacilglicerol O-aciltransferasa 1 (Diglicérido aciltransferasa)
NP_036211	6912332	diacilglicerol O-aciltransferasa 1 [<i>Homo sapiens</i>]
AAH06263	34782946	proteína DGAT1 [<i>Homo sapiens</i>]
XP_780515	72006039	similar a Diacilglicerol O-aciltransferasa 1 [<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>]
AAD40881	5225382	diacilglicerol aciltransferasa potencial [<i>Brassica napus</i>]
XP_539214	73974769	similar a la isoforma 1 de Diacilglicerol O-aciltransferasa 1 (producto génico 1 relacionado con ACAT) [<i>Canis familiaris</i>]
AAZ22403	71063860	diacilglicerol O-aciltransferasa 1 [<i>Bubalus bubalis</i>]
NP_999216	47522918	diacilglicerol aciltransferasa [<i>Sus scrofa</i>]
NP_001...	50539976	proteína hipotética LOC436731 [<i>Danio rerio</i>]
XP_849176	73974767	similar a la isoforma 2 de Diacilglicerol O-aciltransferasa 1 (producto génico 1 relacionado con ACAT) [<i>Canis familiaris</i>]
NP_505828	71997360	H19N07.4 [<i>Caenorhabditis elegans</i>]
AAF82410	9049538	diacilglicerol aciltransferasa [<i>Caenorhabditis elegans</i>]
CAE75170	39591950	Proteína hipotética CBG23107 [<i>Caenorhabditis briggsae</i>]
XP_626337	66358318	diacilglicerol aciltransferasa 1 [<i>Cryptosporidium parvum Iowa II</i>]
XP_668402	67624239	enzima relaciona con acil-CoA:diacilglicerol aciltransferasa 1 [<i>Cryptosporidium hominis</i> TU502]
AAP94208	33113253	enzima relaciona con acil-CoA:diacilglicerol aciltransferasa 1 [<i>Toxoplasma gondii</i>]
AAP94209	33113255	enzima relaciona con acil-CoA:diacilglicerol aciltransferasa 1 [<i>Toxoplasma gondii</i>]
XP_579557	62652535	PREDICHA: diacilglicerol O-aciltransferasa 1 [<i>Rattus norvegicus</i>]
BAC66171	29170489	diacilglicerol aciltransferasa [<i>Mus musculus</i>]
Q9ERM3	18202872	Diacilglicerol O-aciltransferasa 1 (Diglicérido aciltransferasa)
AAL78366	18698659	acil coenzima A: diacilglicerol aciltransferasa [<i>Drosophila melanogaster</i>]
NP_995724	45552403	CG31991-PD, isoforma D [<i>Drosophila melanogaster</i>]
NP_724017	24584734	CG31991-PC, isoforma C [<i>Drosophila melanogaster</i>]
XP_858062	73974765	similar a la isoforma 3 de Diacilglicerol O-aciltransferasa 1 (producto génico 1 relacionado con ACAT) [<i>Canis familiaris</i>]
XP_728984	82915156	proteína hipotética PY01256 [<i>Plasmodium yoelii yoelii</i> cepa 17XNL]
CAG11944	47225461	producto proteico no nombrado [<i>Tetraodon nigroviridis</i>]
BAD27526	50199438	acil-CoA:diacilglicerol aciltransferasa [construcción sintética eucariota]
XP_317656	31226099	ENSANGP00000002281 [<i>Anopheles gambiae</i> cepa PEST]
AAV59457	55733950	diacilglicerol aciltransferasa potencial [<i>Oryza sativa</i> (grupo de cultivar japónica)]
EAL33593	54644853	GA16599-PA [<i>Drosophila pseudoobscura</i>]
XP_678753	68073677	diacilglicerol O-aciltransferasa [<i>Plasmodium berghei</i> cepa ANKA]
XP_520014	55631434	PREDICHA: similar a Diacilglicerol O-aciltransferasa 1 (Diglicérido aciltransferasa) [<i>Pan troglodytes</i>]

REFERENCIA	GI	DESCRIPCIÓN DE LA PROTEÍNA
CAG10815	47219451	producto proteico no nombrado [<i>Tetraodon nigroviridis</i>]
XP_624754	66522700	PREDICHA: similar a ENSANGP00000002281 [<i>Apis mellifera</i>]
CAC69884	15620769	diacilglicerol aciltransferasa I [<i>Rattus norvegicus</i>]
XP_686181	68363630	PREDICHA: similar a Diacilglicerol O-aciltransferasa 1 (Diglicérido aciltransferasa) [<i>Danio rerio</i>]
XP_734008	70921323	diacilglicerol O-aciltransferasa [<i>Plasmodium chabaudi chabaudi</i>]
XP_673128	68062248	proteína hipotética PB300300.00.0 [<i>Plasmodium berghei</i> cepa ANKA]
AAS72376	45642963	acil-CoA:colesterol aciltransferasa beta [<i>Toxoplasma gondii</i>]
AAS72375	45642961	acil-CoA:colesterol aciltransferasa alfa [<i>Toxoplasma gondii</i>]
NP_586145	19074639	ESTEROL O-ACILTRANSFERASA [<i>Encephalitozoon cuniculi</i> GB-M1]
XP_640280	66812202	proteína hipotética DDB0205259 [<i>Dictyostelium discoideum</i>]
AA40783	63376221	diacilglicerol aciltransferasa [<i>Brassica juncea</i>]
XP_765774	71032265	diacilglicerol O-aciltransferasa [<i>Theileria parva</i> cepa Muguga]
Q876L2	34582301	Esterol O-aciltransferasa 2 (Esterol-éster sintasa 2)
XP_571260	58268208	esterol O-aciltransferasa [<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> JEC21]
EAL20032	50257323	proteína hipotética CNBF3580 [<i>Cryptococcus neoformans</i> var. <i>neoformans</i> B-3501A]
XP_954478	84999514	acil transferasa [<i>Theileria annulata</i> cepa Ankara]
XP_505086	50555355	proteína hipotética [<i>Yarrowia lipolytica</i>]
NP_588558	19076058	proteína hipotética SPCP1E11.05c [<i>Schizosaccharomyces pombe</i> 972h-]
AAC49441	1389739	acil-CoA:esterol aciltransferasa
NP_014416	6324346	Acil-CoA:esterol aciltransferasa, isozima de Are1p; Are2p [<i>Saccharomyces cerevisiae</i>]
XP_750354	70991010	esterol o-aciltransferasa APE2 [<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293]
XP_382192	46110268	proteína hipotética FG02016.1 [<i>Gibberella zeae</i> PH-1]
BAE54934	83764790	producto proteico no nombrado [<i>Aspergillus oryzae</i>]
XP_885914	76617939	similar a la isoforma 2 de Esterol O-aciltransferasa 2 (Colesterol aciltransferasa 2) (ACAT-2) [<i>Bos taurus</i>]
XP_591251	76617937	similar a la isoforma 1 de Esterol O-aciltransferasa 2 (Colesterol aciltransferasa 2) (ACAT-2) [<i>Bos Taurus</i>]
BAC00846	21392392	AcilCoA:Colesterol Aciltransferasa 2 [<i>Rattus norvegicus</i>]
NP_649816	28571583	CG8112-PA [<i>Drosophila melanogaster</i>]
NP_666176	22122547	esterol O-aciltransferasa 2 [<i>Mus musculus</i>]
O88908	18202245	Esterol O-aciltransferasa 2 (Colesterol aciltransferasa 2) (ACAT-2)
XP_761502	71022545	proteína hipotética UM05355.1 [<i>Ustilago maydis</i> 521]
NP_714950	40254723	esterol O-aciltransferasa 2 [<i>Rattus norvegicus</i>]
EAQ86094	88178626	proteína hipotética CHGG_07347 [<i>Chaetomium globosum</i> CBS 148.51]
XP_461395	50425599	proteína hipotética DEHA0F25652g [<i>Debaryomyces hansenii</i> CBS767]
XP_661812	67527926	proteína hipotética AN4208.2 [<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4]
AAH96091	64654094	Esterol O-aciltransferasa 2 [<i>Homo sapiens</i>]
O75908	18202149	Esterol O-aciltransferasa 2 (Colesterol aciltransferasa 2) (ACAT-2)
AAH96090	64652990	Esterol O-aciltransferasa 2 [<i>Homo sapiens</i>]
AAK48829	13898623	acil coenzima A: colesterol aciltransferasa-2 [<i>Homo sapiens</i>]
XP_543637	73996435	PREDICHA: similar a esterol O-aciltransferasa 2 [<i>Canis familiaris</i>]

REFERENCIA	GI	DESCRIPCIÓN DE LA PROTEÍNA
O77759	18202176	Esterol O-aciltransferasa 2 (Colesterol aciltransferasa 2) (ACAT-2)
AA032474	28564191	ARE2 [<i>Saccharomyces castellii</i>]
XP_323485	32405744	proteína hipotética [<i>Neurospora crassa</i>]
NP_982606	45184888	AAR065Cp [<i>Eremothecium gossypii</i>]
NP_593708	19114620	proteína hipotética SPAC13G7.06 [<i>Schizosaccharomyces pombe</i> 972h-]
AA032554	28564940	ARE2 [<i>Saccharomyces kluyveri</i>]
EAL28962	54639560	GA20833-PA [<i>Drosophila pseudoobscura</i>]
XP_449806	50294790	proteína hipotética CAGL0M10571g [<i>Candida glabrata</i> CBS 138]
NP_033256	84619697	esterol O-aciltransferasa 1 [<i>Mus musculus</i>]
061263	18202591	Esterol O-aciltransferasa 1 (Colesterol aciltransferasa 1) (ACAT-1)
BAC34925	26342537	producto proteico no nombrado [<i>Mus musculus</i>]
XP_452607	50305295	producto proteico no nombrado [<i>Kluyveromyces lactis</i>]
NP_001...	77735363	proteína hipotética LOC504287 [<i>Bos taurus</i>]
Q60457	18202585	Esterol O-aciltransferasa 1 (Colesterol aciltransferasa 1) (ACAT-1)
XP_320321	58393811	ENSANGP00000016512 [<i>Anopheles gambiae</i> cepa PEST]
XP_320320	58393809	ENSANGP00000016486 [<i>Anopheles gambiae</i> cepa PEST]
O70536	18202126	Esterol O-aciltransferasa 1 (Colesterol aciltransferasa 1) (ACAT-1)
XP_714776	68482533	acil-CoA colesterol aciltransferasa [<i>Candida albicans</i> SC5314]
P84285	56404462	Esterol O-aciltransferasa 2 (Esterol-éster sintasa) (ASAT)
AAH77916	50416229	proteína Soat1-prov [<i>Xenopus laevis</i>]
XP_692855	68364838	PREDICHA: similar a proteína Soat1-prov [<i>Danio rerio</i>]
CAI13574	55960156	esterol O-aciltransferasa (acil-Coenzima A: colesterol aciltransferasa) 1 [<i>Homo sapiens</i>]
AAL56227	18028942	colesterol aciltransferasa 1 [<i>Gorilla gorilla</i>]
AAL56228	18028944	colesterol aciltransferasa 1 [<i>Pongo pygmaeus</i>]
AAC37532	4878022	acil-coenzima A: colesterol aciltransferasa [<i>Homo sapiens</i>]
2201440A	1585676	acil-CoA:colesterol aciltransferasa
Q876L3	34582302	Esterol O-aciltransferasa 1 (Esterol-éster sintasa 1)
BAE01048	67969393	producto proteico no nombrado [<i>Macaca fascicularis</i>]
XP_514030	55588858	PREDICHA: proteína hipotética XP_514030 [<i>Pan troglodytes</i>]
XP_547445	73961286	similar a Esterol O-aciltransferasa 1 (Colesterol aciltransferasa 1) (ACAT-1) [<i>Canis familiaris</i>]
EAQ84619	88177151	proteína hipotética CHGG_08633 [<i>Chaetomium globosum</i> CBS 148.51]
O77761	18202178	Esterol O-aciltransferasa 1 (Colesterol aciltransferasa 1) (ACAT-1)
XP_422267	50751122	PREDICHA: similar a Esterol O-aciltransferasa 1 (Colesterol aciltransferasa 1) (ACAT-1) [<i>Gallus gallus</i>]
XP_693284	68392980	PREDICHA: similar a Esterol O-aciltransferasa 1 (Colesterol aciltransferasa 1) (ACAT-1) [<i>Danio rerio</i>]
AAT92940	51013293	YCR048W [<i>Saccharomyces cerevisiae</i>]
XP_956576	85080625	proteína hipotética [<i>Neurospora crassa</i> N150]
XP_624691	66564061	PREDICHA: similar a ENSANGP00000016486 [<i>Apis mellifera</i>]
CAF96514	47222847	producto proteico no nombrado [<i>Tetraodon nigroviridis</i>]
XP_788209	72085563	PREDICHA: similar a esterol O-aciltransferasa 1 [<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>]
XP_445307	50285757	producto proteico no nombrado [<i>Candida glabrata</i>]
CAE70002	39596364	Proteína hipotética CBG16409 [<i>Caenorhabditis briggsae</i>]
CAG07990	47225647	producto proteico no nombrado [<i>Tetraodon nigroviridis</i>]
NP_510623	17549960	B0395.2 [<i>Caenorhabditis elegans</i>]

REFERENCIA	GI	DESCRIPCIÓN DE LA PROTEÍNA
AAX28331	76157393	proteína SJCHGC04421 [<i>Schistosoma japonicum</i>]
CAI96158	66347204	Diacilglicerol O-aciltransferasa [<i>Bubalus bubalis</i>]
XP_390039	46136695	proteína hipotética FG09863.1 [<i>Gibberella zeae</i> PH-1]
XP_643169	66819019	proteína hipotética DDB0203882 [<i>Dictyostelium discoideum</i>]
AAO53095	28850306	proteína hipotética [<i>Dictyostelium discoideum</i>]
AAB06959	1515472	acil-CoA:colesterol aciltransferasa [<i>Oryctolagus cuniculus</i>]
NP_945619	39933343	alginato o-acetiltransferasa AlgI potencial [<i>Rhodopseudomonas palustris</i> CGA009]
ZP_008...	77691302	O-acil transferasa unida a membrana, MBOAT [<i>Rhodopseudomonas palustris</i> BisB5]
XP_465546	50908115	sintasa de cera potencial [<i>Oryza sativa</i> (grupo de cultivar japónica)]

Tabla 23: Ejemplos de polipéptidos de prenildifosfato sintasa

29A: proteínas de bacterias que requieren una secuencia de dirección mitocondrial		
REFERENCIA	GI	Descripción
ZP_009...	83373595	Trans-hexapreniltransferasa [<i>Rhodobacter sphaeroides</i> ATCC 17029]
ZP_009...	83371280	Trans-hexapreniltransferasa [<i>Rhodobacter sphaeroides</i> ATCC 17025]
CAD24417	20429105	decaprenil difosfato sintasa [<i>Paracoccus zeaxanthinifaciens</i>]
ZP_010...	85705714	Geranilgeranil pirofosfato sintasa/poliprenil sintetasa [<i>Roseovarius</i> sp. 217]
ZP_010...	84515724	decaprenil difosfato sintasa [<i>Loktanella vestfoldensis</i> SKA53]
YP_165582	56695234	decaprenil difosfato sintasa [<i>Silicibacter pomeroyi</i> DSS-3]
ZP_010...	86139019	decaprenil difosfato sintasa [<i>Roseobacter</i> sp. MED 193]
ZP_009...	83941379	decaprenil difosfato sintasa [<i>Sulfitobacter</i> sp. EE-36]
ZP_009...	83854856	decaprenil difosfato sintasa [<i>Sulfitobacter</i> sp. NAS-14.1]
ZP_006...	69299873	Farnesiltransferasa [<i>Silicibacter</i> sp. TM1040]
ZP_010...	84683979	Geranilgeranil pirofosfato sintasa/poliprenil sintetasa [<i>Rhodobacterales bacterium</i> HTCC2654]
ZP_009...	84500217	decaprenil difosfato sintasa [<i>Oceanicola batsensis</i> HTCC2597]
ZP_009...	83952381	decaprenil difosfato sintasa [<i>Roseovarius nubinhibens</i> ISM]
ZP_006...	69937106	Trans-hexapreniltransferasa [<i>Paracoccus denitrificans</i> PD1222]
ZP_005...	68180845	Trans-hexapreniltransferasa [<i>Jannaschia</i> sp. CCS1]
ZP_008...	78495595	Poliprenil sintetasa [<i>Rhodopseudomonas palustris</i> BisB18]
AAV82368	67866738	decaprenil difosfato sintasa [<i>Agrobacterium tumefaciens</i>]
NP_353656	15887975	proteína hipotética AGR_C_1125 [<i>Agrobacterium tumefaciens</i> cepa C58]
ZP_008...	77688465	Farnesiltransferasa [<i>Rhodopseudomonas palustris</i> BisB5]
NP_531334	17934544	octaprenil-difosfato sintasa [<i>Agrobacterium tumefaciens</i> cepa C58]
YP_484709	86748213	Farnesiltransferasa [<i>Rhodopseudomonas palustris</i> HaA2]
AAP56240	37903500	decaprenil difosfato sintasa [<i>Agrobacterium tumefaciens</i>]
YP_192388	58040424	Decaprenil difosfato sintasa [<i>Gluconobacter oxydans</i> 621H]
23B: subunidad 1- Proteínas que contienen secuencia de dirección mitocondrial		
REFERENCIA	GI	Descripción
T43193	11279237	homólogo de trans-pentapreniltransferasa - levadura de fisión (<i>Schizosaccharomyces pombe</i>)
AAD28559	4732024	trans-preniltransferasa [<i>Homo sapiens</i>]
AAI07275	78070698	Trans-preniltransferasa [<i>Mus musculus</i>]

BAE48216	81157931	subunidad 1 de decaprenil difosfato sintasa [<i>Homo sapiens</i>]
AAH49211	29165656	proteína PDSS1 [<i>Homo sapiens</i>]
Q33DR2	85700953	Decaprenil-difosfato sintasa subunidad 1 (Solanesil-difosfato sintasa subunidad 1) (Trans-preniltransferasa)
XP_507706	55633583	PREDICHA: similar a la proteína TPRT [<i>Pan troglodytes</i>]
XP_586717	76632198	PREDICHA: similar a trans-preniltransferasa [<i>Bos taurus</i>]
XP_849908	73948851	PREDICHA: similar a trans-preniltransferasa [<i>Canis familiaris</i>]
23C: Subunidad 2- Proteínas que contienen secuencia de dirección mitocondrial		
REFERENCIA	GI	Descripción
O13851	60389474	Decaprenil-difosfato sintasa subunidad 2 (Decaprenil pirofosfato sintetasa subunidad 2)
BAE48218	81157935	subunidad 2 de solanesil difosfato sintasa [<i>Mus musculus</i>]
BAE48217	81157933	subunidad 2 de decaprenil difosfato sintasa [<i>Homo sapiens</i>]

Tabla 24: Ejemplos de polipéptidos de PHB-polipreniltransferasa

GI	DESCRIPCIÓN DE LA PROTEÍNA
51013645	YNR041C [<i>Saccharomyces cerevisiae</i>]
50285815	producto proteico no nombrado [<i>Candida glabrata</i>]
50311051	producto proteico no nombrado [<i>Kluyveromyces lactis</i>]
45200866	AGL231Wp [<i>Eremothecium gossypii</i>]
50555263	proteína hipotética [<i>Yarrowia lipolytica</i>]
68473193	<i>para</i> -hidroxibenzoato: poliprenil transferasa [<i>Candida albicans</i> SC5314]
50410039	proteína hipotética DEHA0A14212g [<i>Debaryomyces hansenii</i> CBS767]
83769349	producto proteico no nombrado [<i>Aspergillus oryzae</i>]
70994900	precursor de <i>para</i> -hidroxibenzoato-polipreniltransferasa [<i>Aspergillus fumigatus</i> Af293]
19114131	proteína hipotética SPAC56F8. 04c [<i>Schizosaccharomyces pombe</i> 972h-]
39973573	proteína hipotética MG01067. 4 [<i>Magnaporthe grisea</i> 70-15]
85078920	proteína relacionada con el precursor de <i>para</i> -hidroxibenzoato polipreniltransferasa [<i>Neurospora crassa</i> N150]
76660839	PREDICHA: similar a <i>para</i> -hidroxibenzoato-polipreniltransferasa, mitocondrial [<i>Bos taurus</i>]
52138578	<i>para</i> -hidroxibenzoato-polipreniltransferasa, mitocondrial [<i>Homo sapiens</i>]
18088424	proteína COQ2 [<i>Homo sapiens</i>]
47221448	producto proteico no nombrado [<i>Tetraodon nigroviridis</i>]
58385249	ENSANGP00000012220 [<i>Anopheles gambiae</i> cepa PEST]
50746583	PREDICHA: similar a la proteína hipotética CL640 [<i>Gallus gallus</i>]
54638587	GA21912-PA [<i>Drosophila pseudoobscura</i>]
21355567	CG9613-PA [<i>Drosophila melanogaster</i>]
71005862	proteína hipotética UM01450.1 [<i>Ustilago maydis</i> 521]

REIVINDICACIONES

1. Un hongo *Yarrowia* recombinante, caracterizado por que:

- 5 a) el hongo es oleaginoso por que puede acumular lípidos hasta al menos 20 % de su peso celular seco; y
b) el hongo produce al menos un carotenoide, y puede acumular el carotenoide producido hasta al menos 1 % de su peso celular seco; en el que el hongo comprende una modificación carotenogénica, la modificación confiere al hongo la capacidad de producir el al menos un carotenoide hasta un nivel de al menos 10 1 % de su peso celular seco, la modificación carotenogénica aumenta la expresión o actividad de los siguientes polipéptidos carotenogénicos: polipéptido de GGPP sintasa, polipéptido de fitoeno sintasa, polipéptido de fitoeno deshidrogenasa, polipéptido de licopeno ciclasa, y polipéptido de HMG CoA reductasa,
15 en el que los polipéptidos carotenogénicos derivan de un grupo de microorganismos que consiste en: *Y. lipolytica*, *M. circinelloides*, *S. cerevisiae*, *N. crassa*, *N. aromaticivorans*, *P. marcusii*.
- 20 2. El hongo de la reivindicación 1, en el que la al menos una modificación carotenogénica confiere al hongo la capacidad de producir el al menos un carotenoide hasta un nivel seleccionado del grupo que consiste en al menos 2 %, al menos 3 %, al menos 5 % y al menos 10 % del peso celular seco del hongo.
3. El hongo de la reivindicación 1 o 2, en el que el al menos un carotenoide se selecciona del grupo que consiste en astaxantina, β -caroteno, cantaxantina, zeaxantina, luteína, licopeno y combinaciones de los mismos.
- 25 4. El hongo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes 1 a 3 caracterizado por que el hongo acumula lípidos en forma de cuerpos citoplasmáticos.
- 30 5. El hongo de la reivindicación 4, en el que el al menos un carotenoide se acumula en los cuerpos oleosos citoplasmáticos.

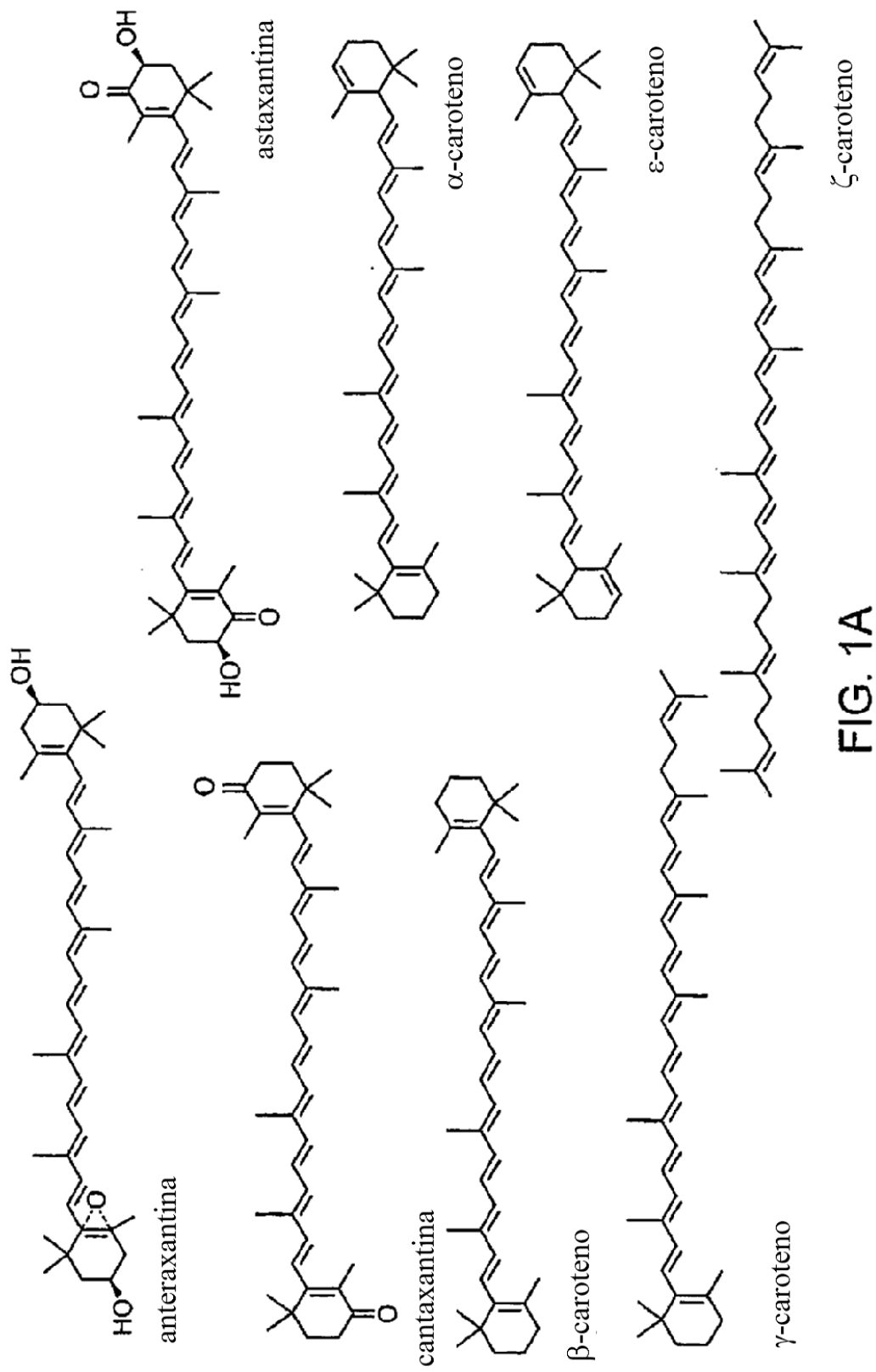


FIG. 1A

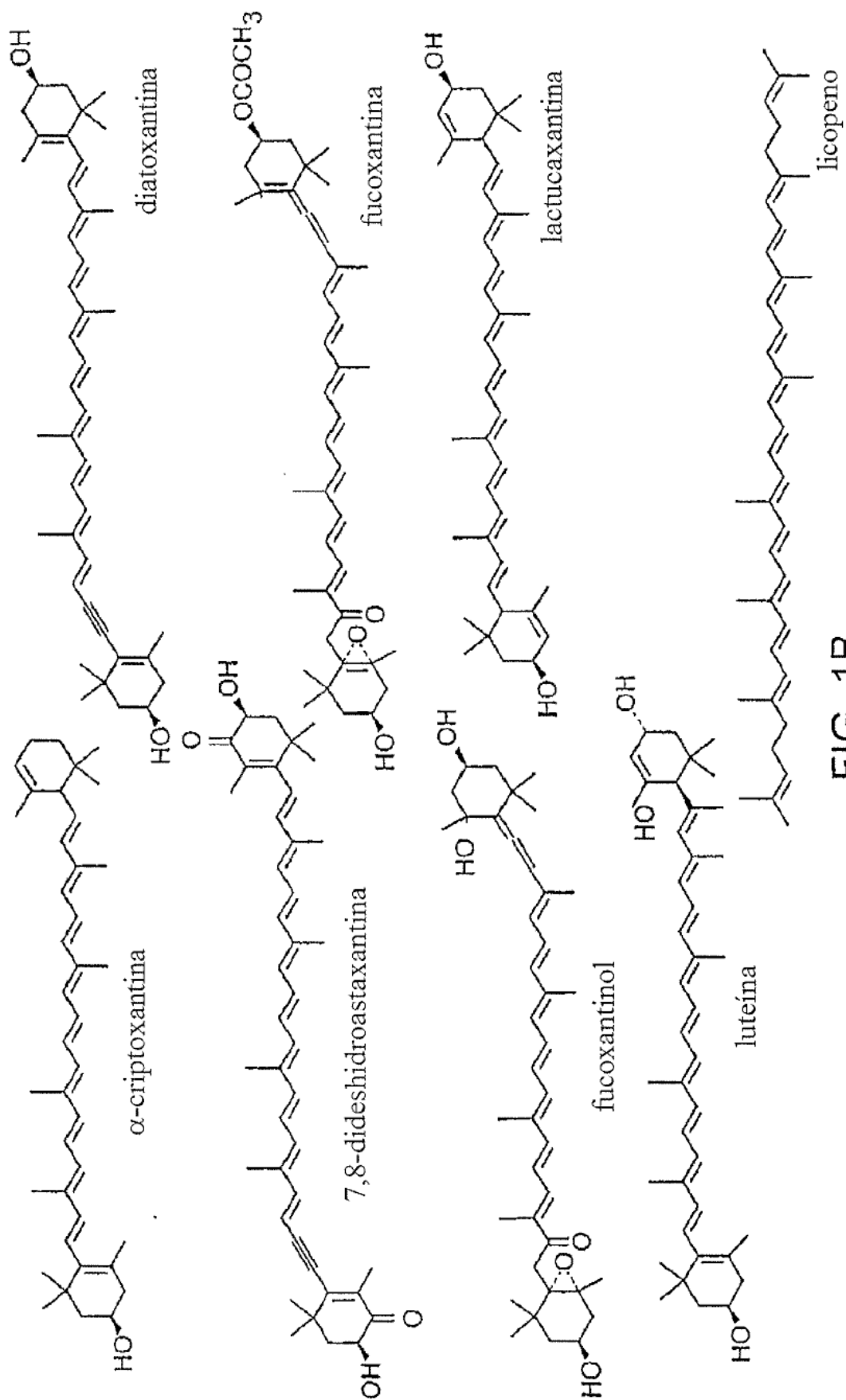


FIG. 1B

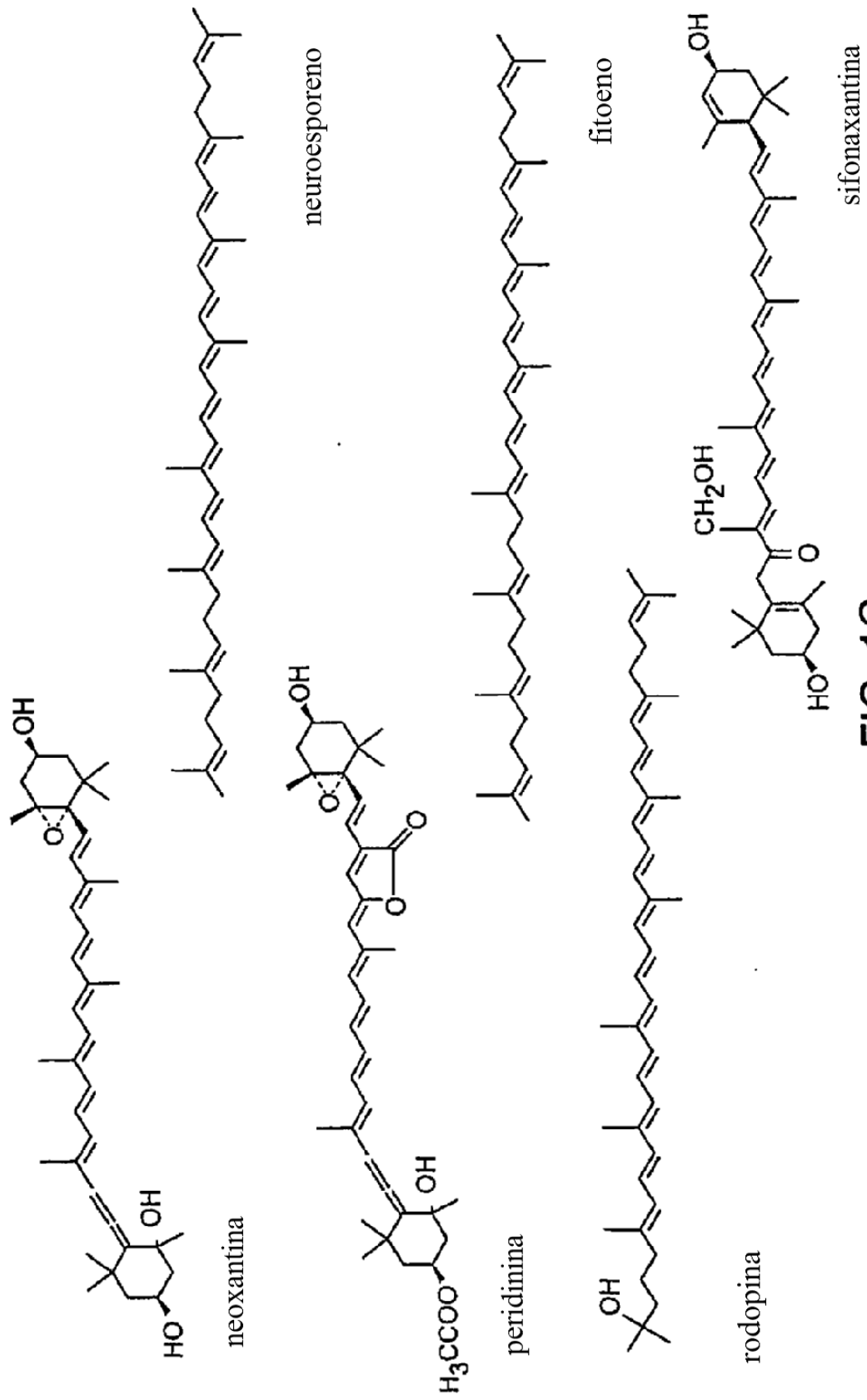


FIG. 1C

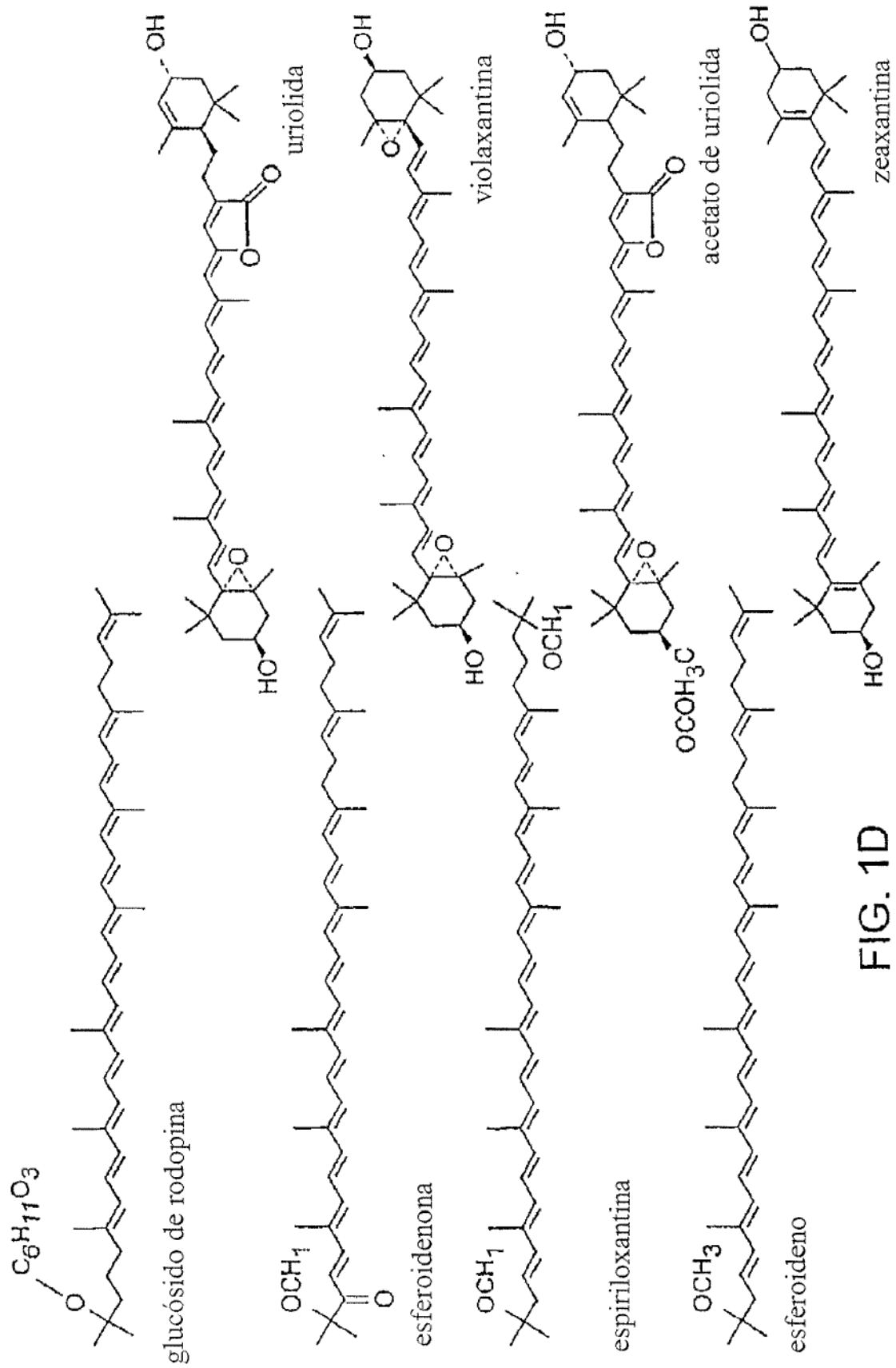
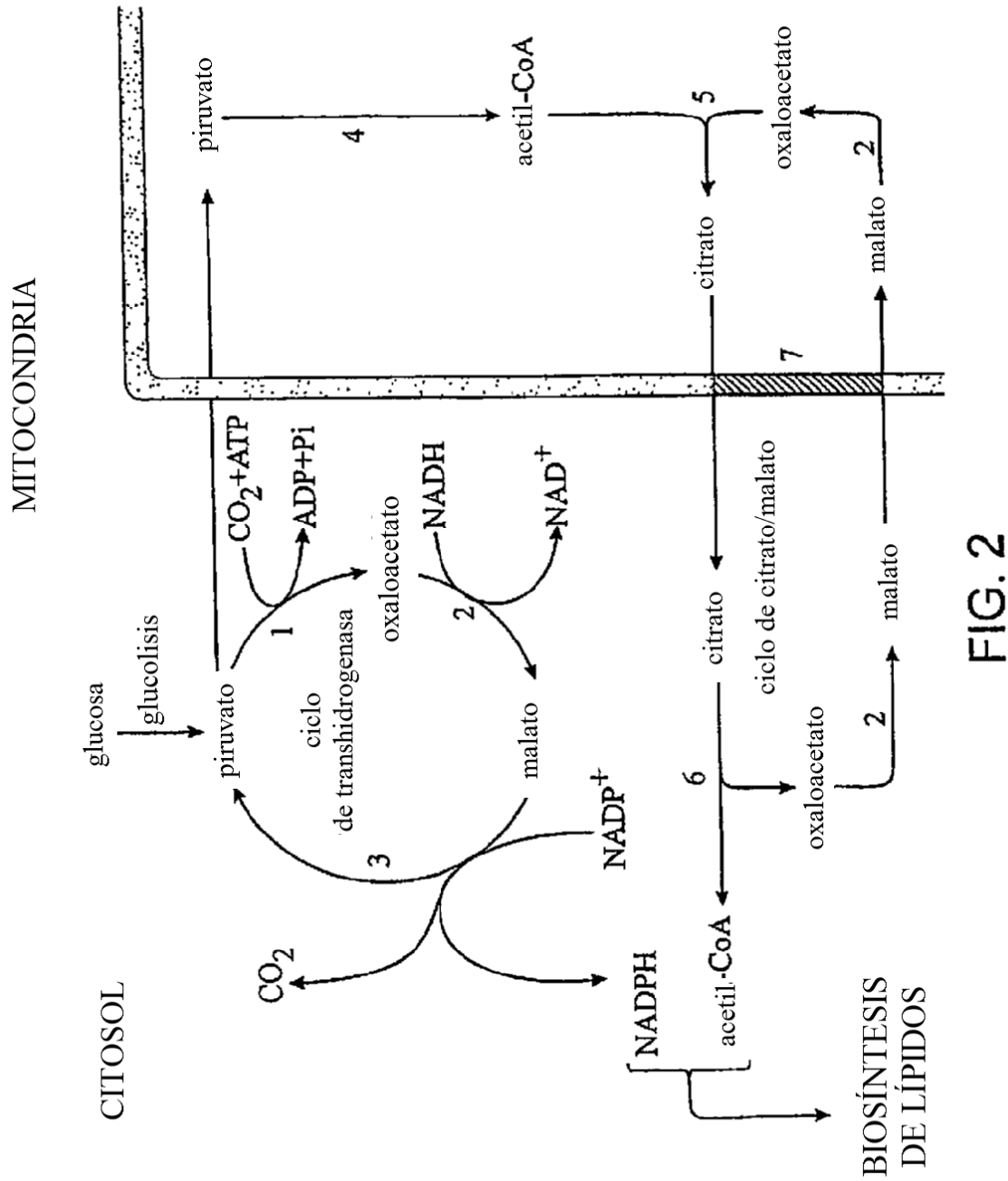


FIG. 1D



RUTA DE MEVALONATO A ISOPRENOIDES

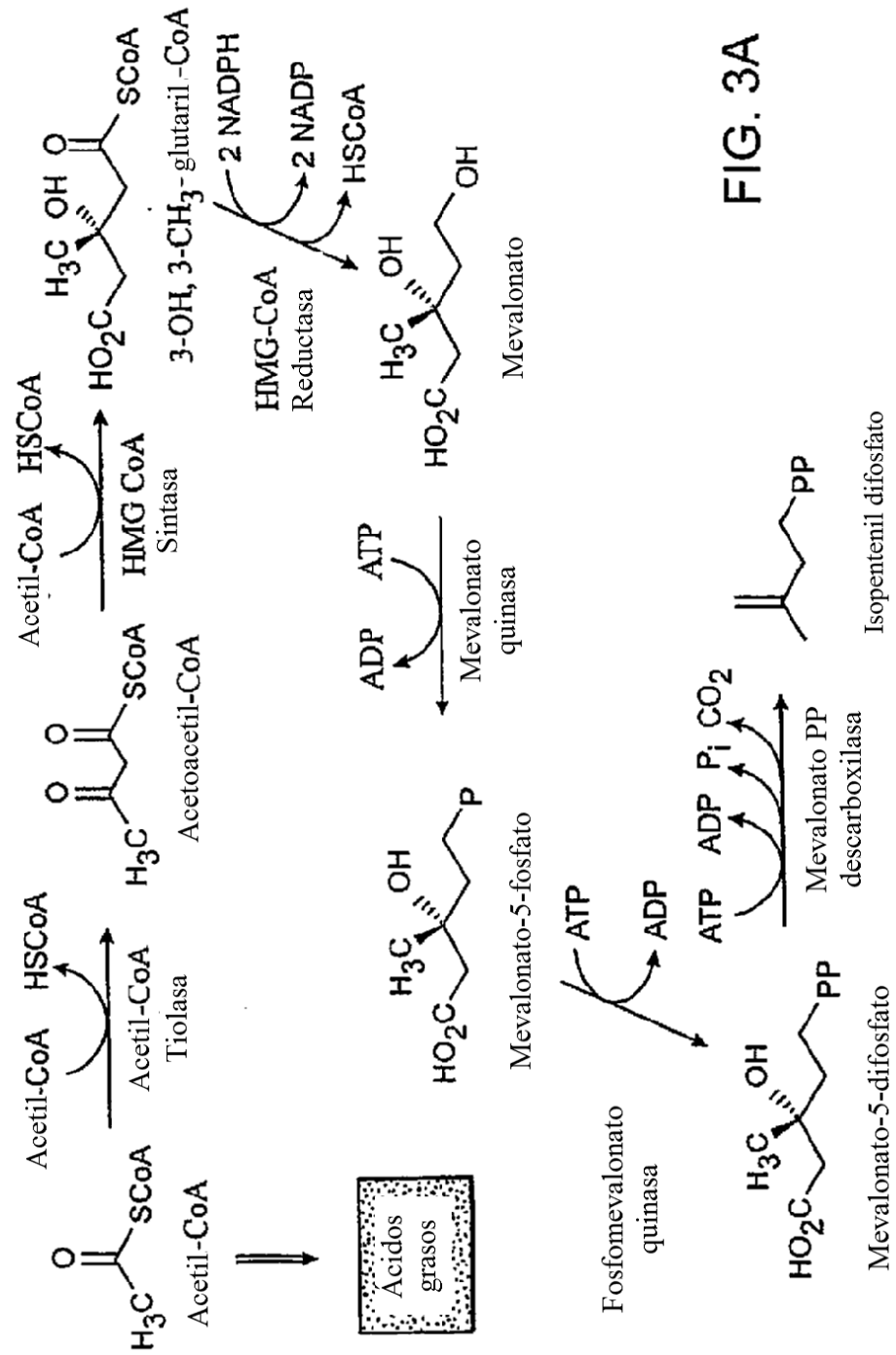


FIG. 3A

RUTA DE MEVALONATO A ISOPRENOIDES

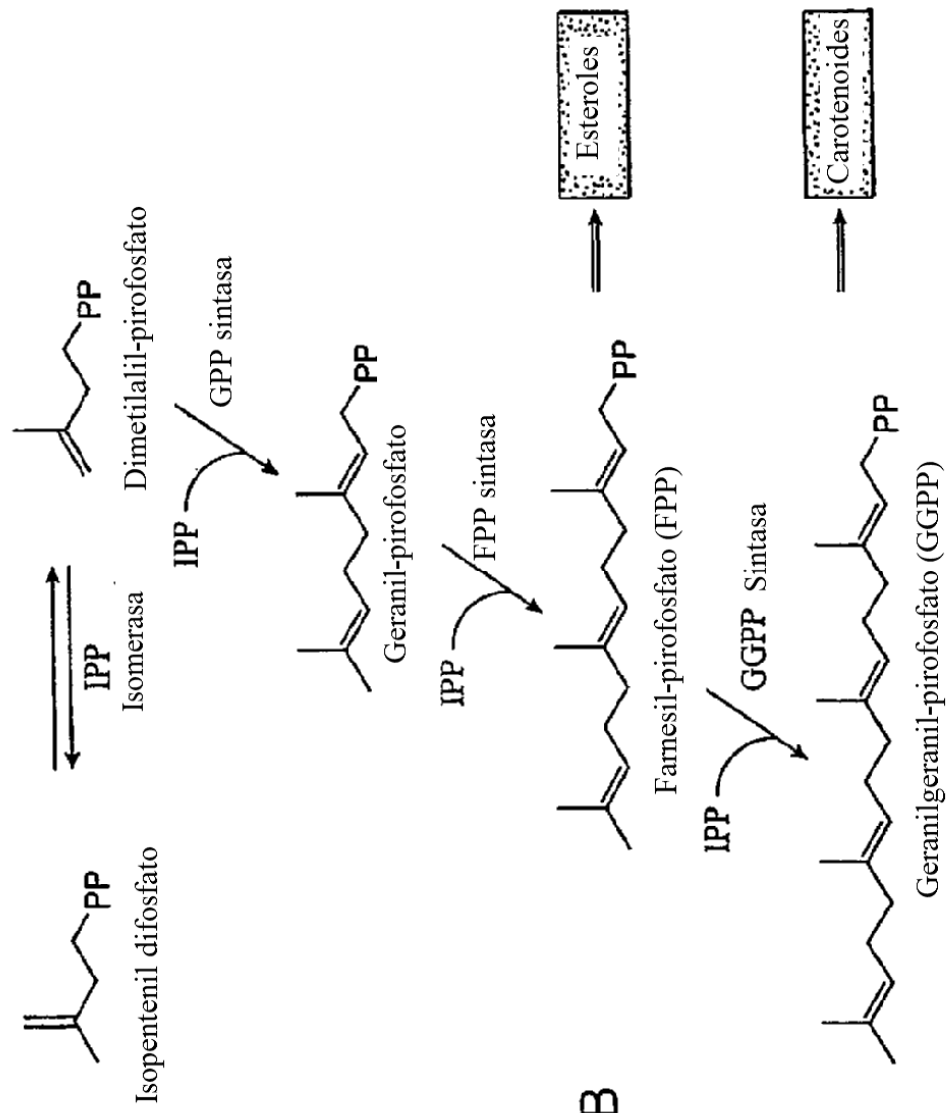


FIG. 3B

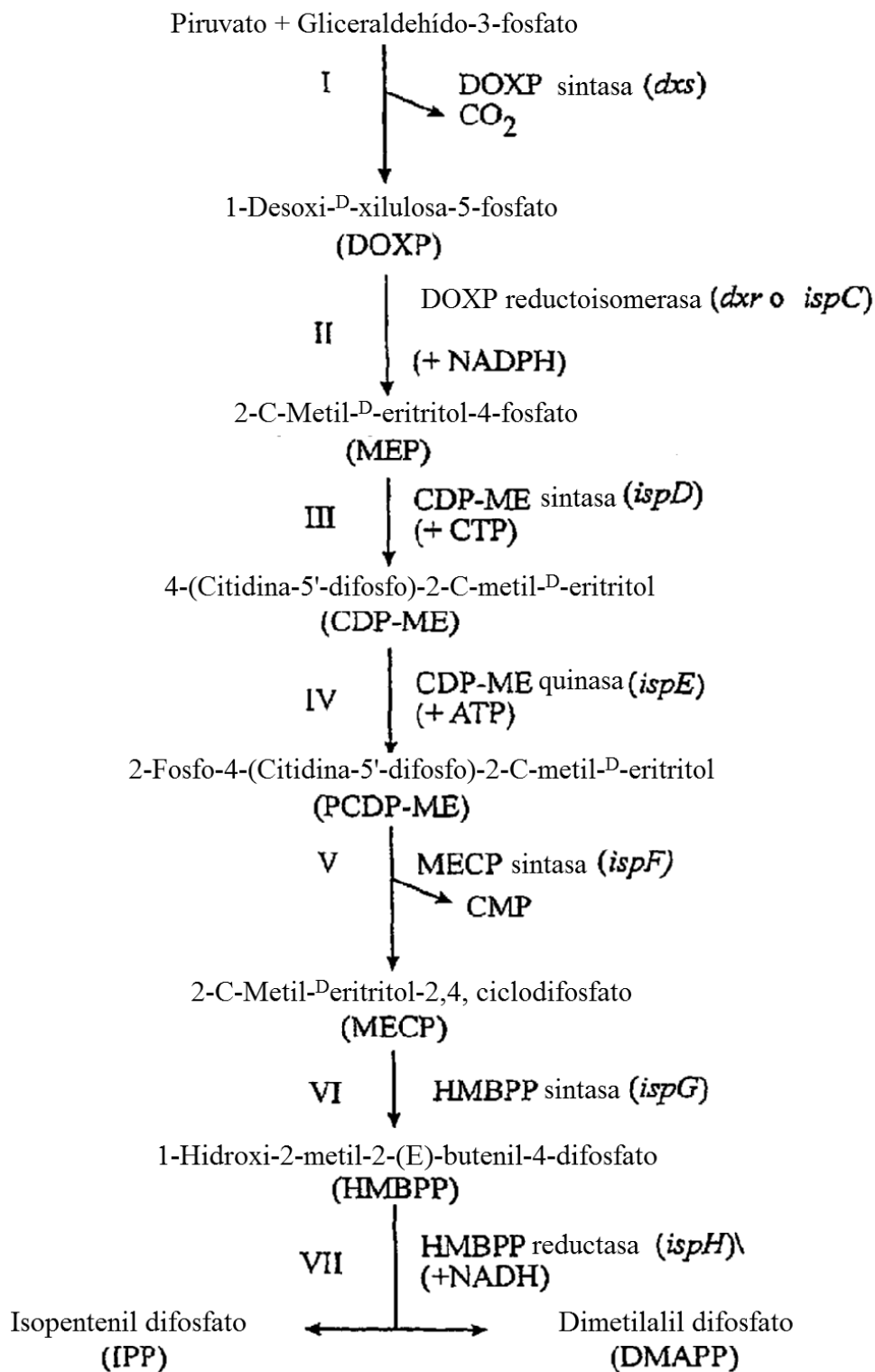


FIG. 4

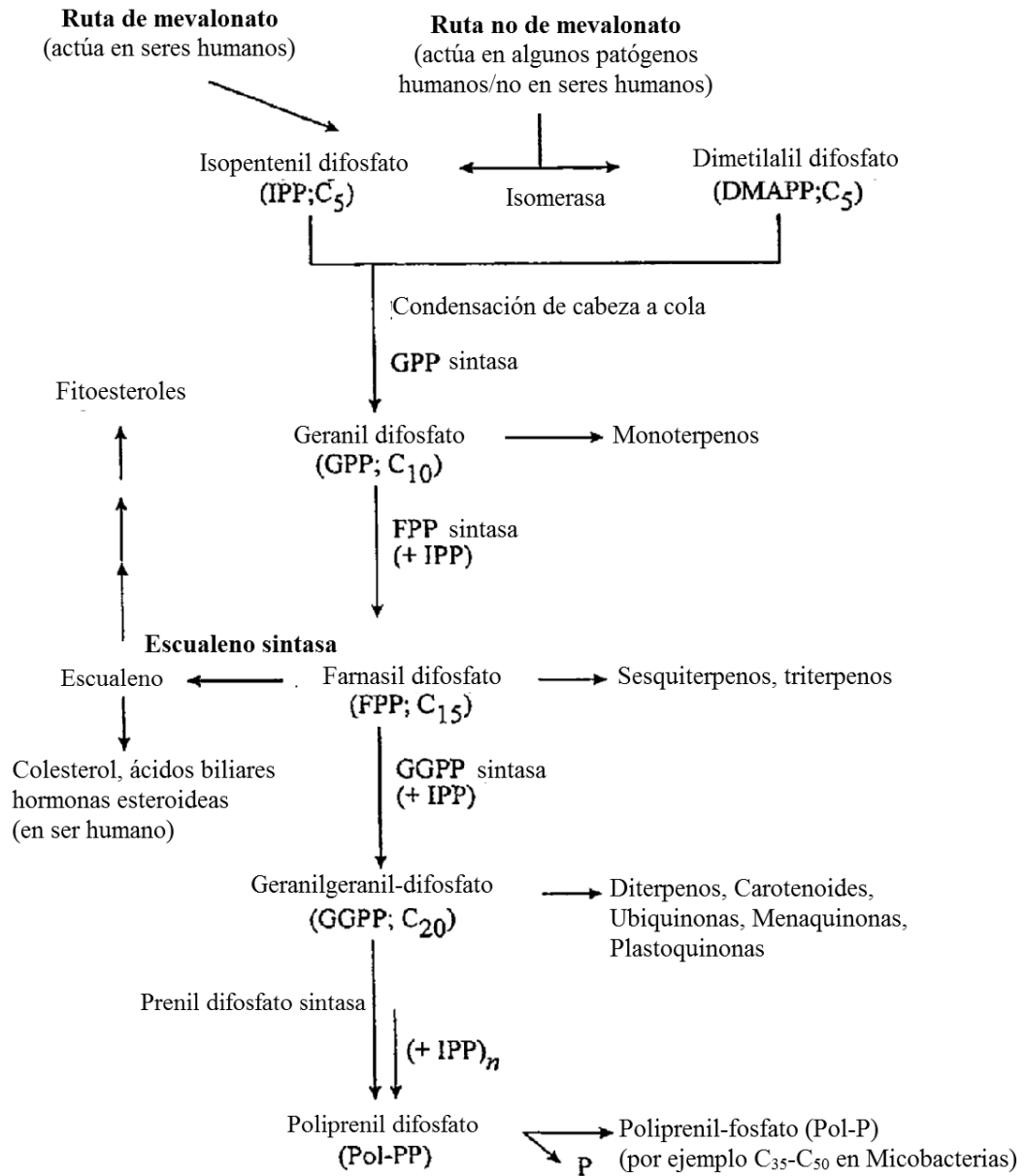


FIG. 5

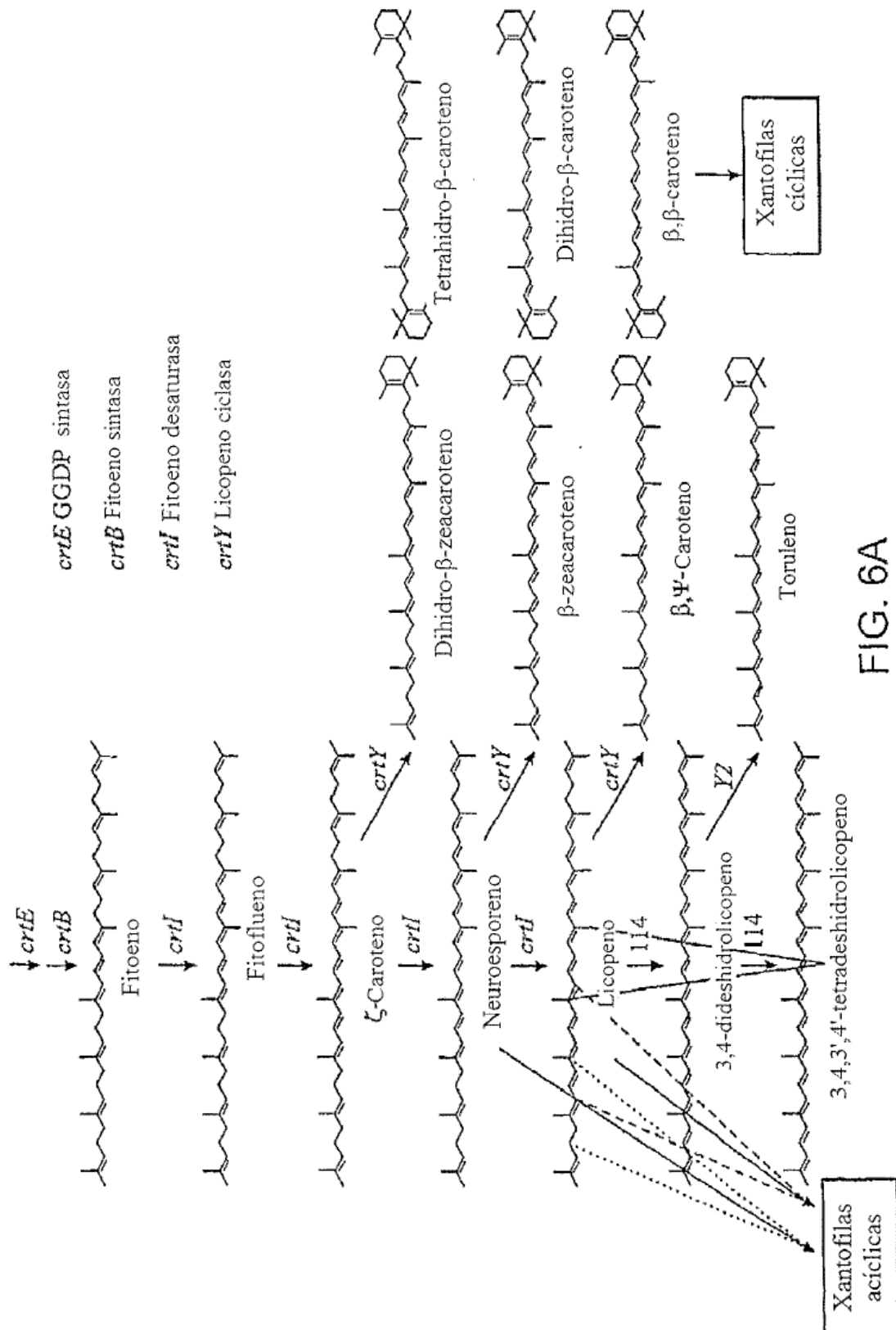


FIG. 6A

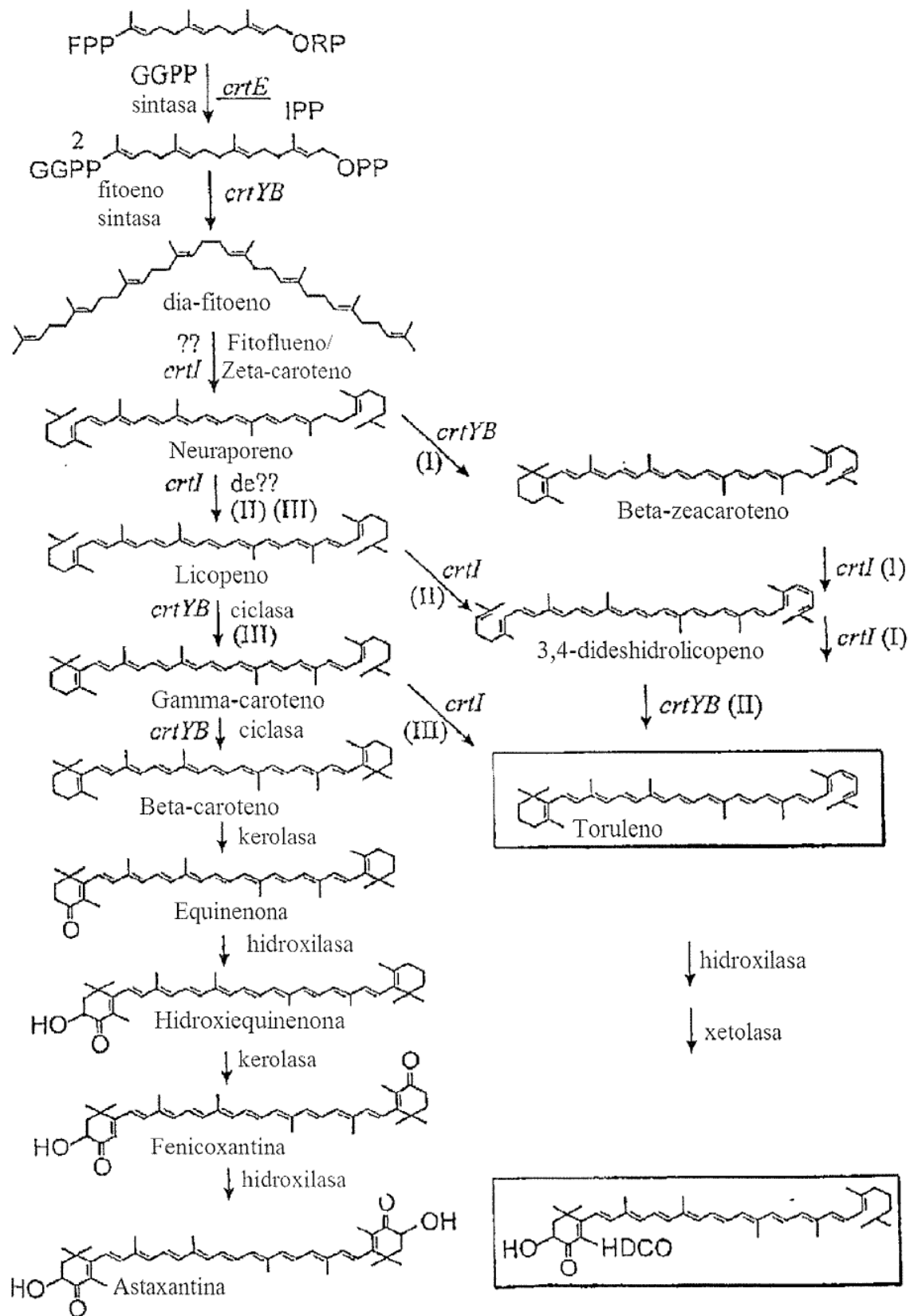


FIG. 6B

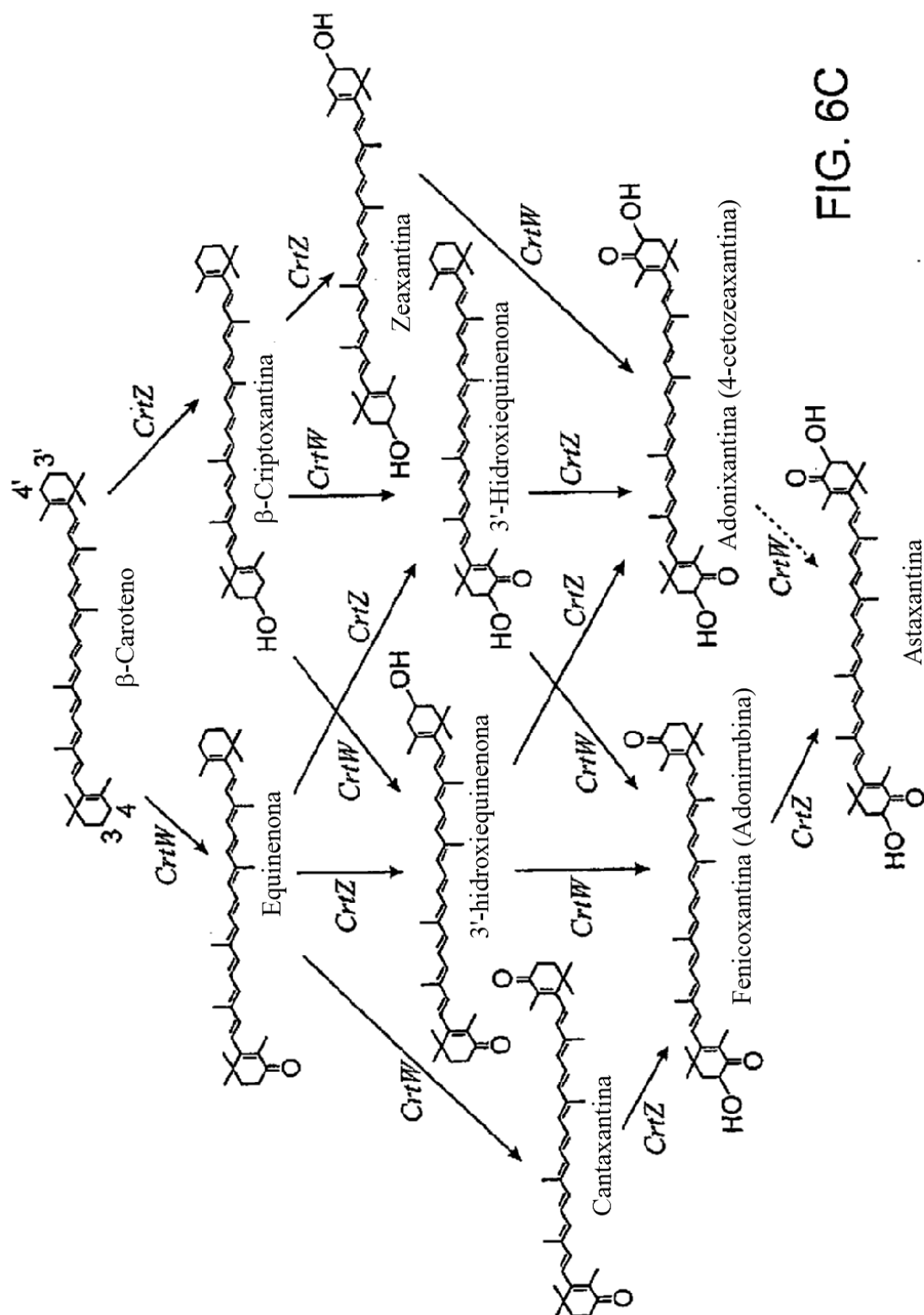


FIG. 6C

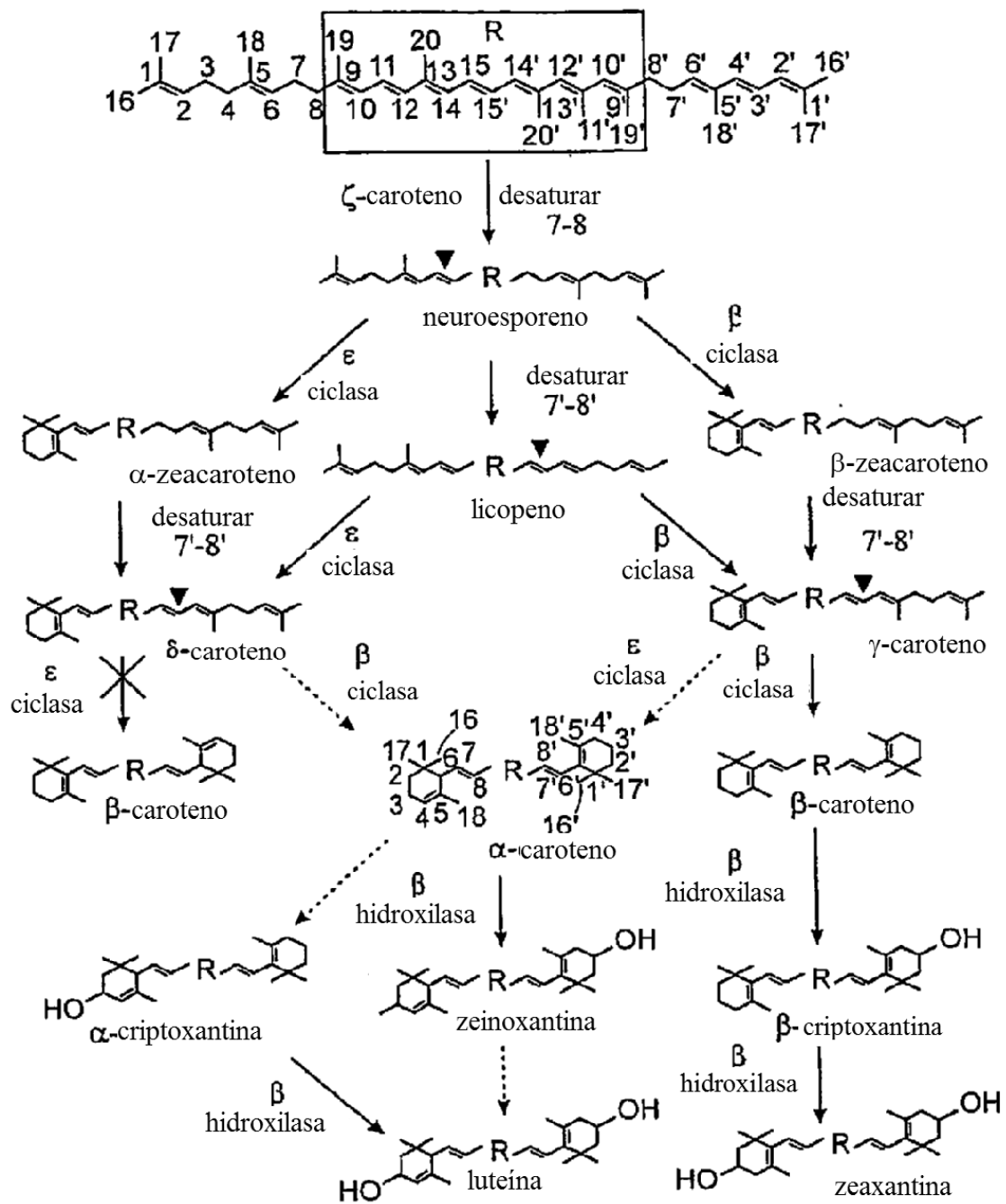
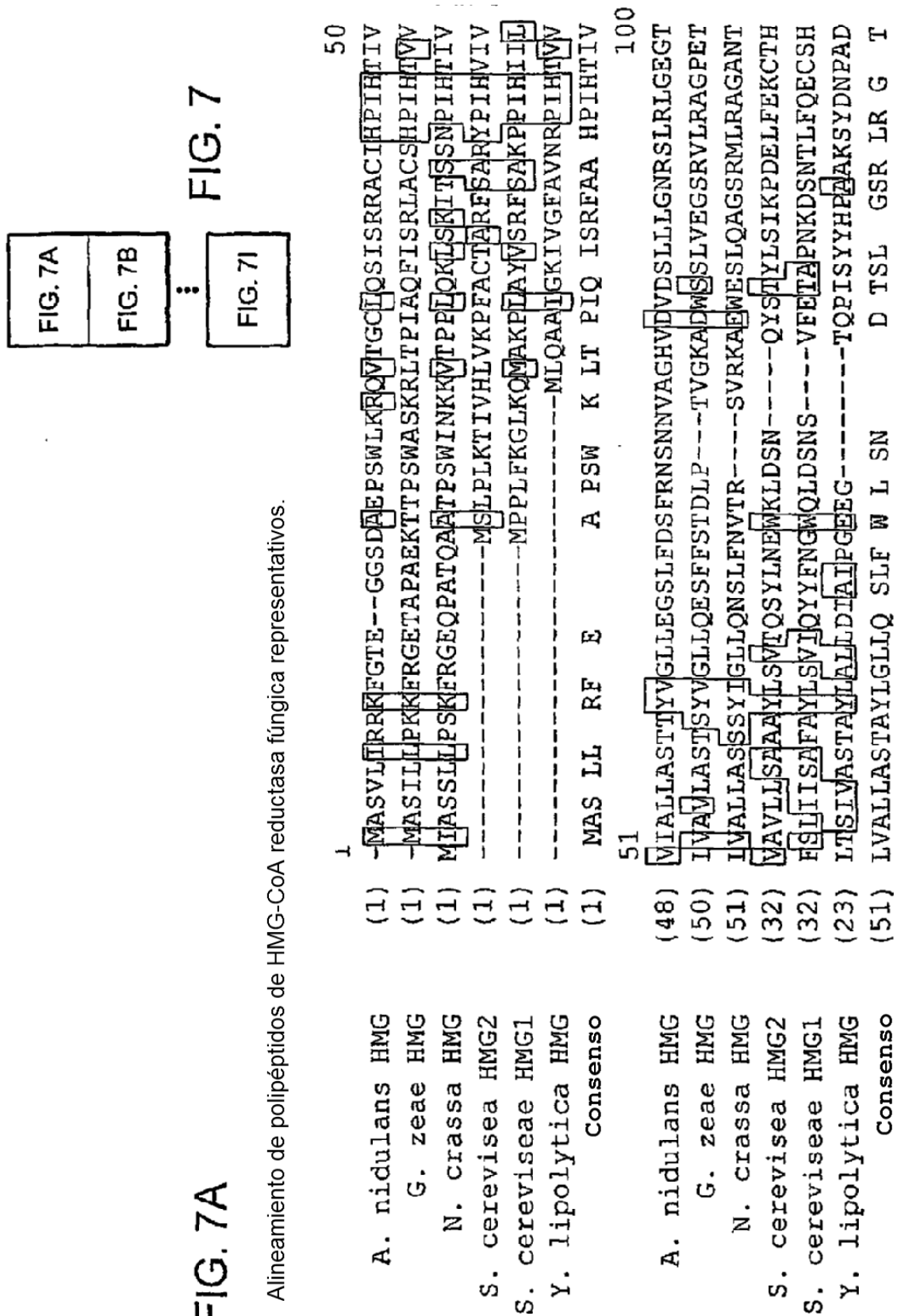


FIG. 6D

FIG. 7A

Alineamiento de polipéptidos de HMG-CoA reductasa fúngica representativos.



A. nidulans HMG G. zeae HMG N. crassa HMG S. cerevisiae HMG2 S. cerevisiae HMG1 Y. lipolytica HMG Consenso	(98) (97) (97) (77) (78) (65) (101)	101	SWKQVEDSLNQDDQKVGNP	150	ELKREVDQHLALTTLFP	DSISKS-ASTAP
			AWNWKALTEQDSIQ		HAQADADHLALLTLFP	
			EWNWQNHDP		EPANANHLALLTLFP	
			YRSPVSDTWKLLS		SKFAADIYTPFHYLLSTIS	
			YVRDSSLDGWVSIT		AHEASELPAPHHYLLNLN	
A. nidulans HMG G. zeae HMG N. crassa HMG S. cerevisiae HMG2 S. cerevisiae HMG1 Y. lipolytica HMG Consenso	(147) (139) (135) (121) (122) (100) (151)	151	ADALPVPANASAQ	200	LLPHTPNLFSF	SHDSSLVFTLPFDQVPQFLRAVQE
			RSSHVPVPQNLST		TPLPSTKNSFTAYSQ	
			QTNTPPLPSNLS		TPLPSTAISET-YSQ	
			SLDDVIYSVDHTRY		LLSEEPKIPTELVS	
			ELANTVFEKDN		KYLLQEDLSVSKEIS	
A. nidulans HMG G. zeae HMG N. crassa HMG S. cerevisiae HMG2 S. cerevisiae HMG1 Y. lipolytica HMG Consenso	(197) (180) (184) (162) (163) (142) (201)	201	LPDPTLEDEGEQKR	250	WIMRATRGVPVSGP	NGTSSWLSDAWSSFVDLI
			IPNAVSSQETIETERG		HEKMWIMKAARVQTR	
			SLFDMVKT		LAYSLSVDV	
			HVAFSWIK		WERWAYLRL	
			DIV W		NAW	

FIG. 7B

FIG. 7C

A. nidulans HMG G. zeae HMG N. crassa HMG S. cerevisiae HMG2 S. cerevisiae HMG1 Y. lipolytica HMG Consenso	(384)	GAASGVQGG-LQQFCFLAAWILFFDCILLFTFYTTILCIKLEITRIRRHV	401	450
	(347)	GAASGVQGG-LQHFCFLAAWTLFEDEILLFTFYTAILSILKLEINRIKRHV		
	(381)	GAASGVQGG-LQQFCFLAAWILFFDCILLFSEFYTAILCIKLEINRIKRHV		
	(318)	CAIYARHLPGILVNFCLISHEMLVFDIILSATFYSAILSMKLEFINIIHRST		
	(319)	CSMYAHQLKTLNFGILSAEILIFELILTPTFYSAILALRLFMNVIIHRST		
A. nidulans HMG G. zeae HMG N. crassa HMG S. cerevisiae HMG2 S. cerevisiae HMG1 Y. lipolytica HMG Consenso	(290)	GAYTGVPR--LSQFCFLSAWILIEDYMFLLTFYSAVIAIKFLINHUKENR		
	(401)	GAASGVQGG L QFCFLAAWILFFD ILLFTFYSAILAIKLEINRIKRHV	451	500
	(433)	TKRKALEEDGTTQSSVAEKVASSN-DWFGAGSDNSDADDASVFGRKIKSNN		
	(396)	DMRMALIEDDGVSRRAENVAKSIGDWRVKGDSSLFG-----RKSSS		
	(430)	QMRKALEEDGVSRRAEKVAQSN-DWPRADGKDQPGTTI--FGRQLKSTH		
A. nidulans HMG G. zeae HMG N. crassa HMG S. cerevisiae HMG2 S. cerevisiae HMG1 Y. lipolytica HMG Consenso	(368)	VIRQTLEEDGVVPTIADIIYKDE-----TASEPHFLR-----SNVA		
	(369)	IIKQTLEEDGVVPSIARIISKAE-----KKSVSSEFIN-----LSVV		
	(338)	MIQDALKEEDGVSAAVAEKVADSSPDALKDRKSDVSLFG-----ASGA		
	(451)	IIR ALEEDGVS SVAEKVAKSE DW KGSDS F KS A		
		501	550	
A. nidulans HMG G. zeae HMG N. crassa HMG S. cerevisiae HMG2 S. cerevisiae HMG1 Y. lipolytica HMG Consenso	(482)	VRRFKELMVGGFVLNVVNMNTAIPFRNS-S-----LSPLCNVFSPTPT		
	(438)	VPTFKVIMILGFIFVNIVNICSIIPFRNPRSLSTIRTWASSLGGVVAPLSV		
	(477)	IPKFKVMVVTGEVLINVINLCTIPFRSANSISSISSWARGLGGVVTPPPV		
	(404)	IIILGKASVIGLIILINIVVFTDKLNATILN-----TVYFD		
	(405)	VITMKLSVILLFVFIFNFYFGANWVNDAFN-----SLYFD		
Y. lipolytica HMG Consenso	(380)	IAVEKIFMVLGELGLNLINLTAIPHLGK-----AAAAAQSV		
	(501)	I IFKVLMIILGEVLINLVNLTAIPIR A S L GV SP V		

FIG. 7D

	551				600		
A. nidulans HMG	(524)	DPEKVAENGLDA	TVVS	AKSQKLETLVTVPPIKVKLEYP	SHYAKLGES		
G. zeae HMG	(488)	DPEKVASNGLDA	TLAAAKSN	NRPTLVTLP	IKYELEYPSIHYALGSAIN		
N. crassa HMG	(527)	DPEKVASNGLDI	LEAARAD	GRETTVTLTP	IRYRELEYPSIHYDLPPQKS		
S. cerevisiae HMG2	(439)	S---	TIYSLP	NFINYKDIGNLSNQVTISVLP	KQMYTLPKKYHQIEDSVL		
S. cerevisiae HMG1	(440)	K---	ERVSLP	DEITTSNASENEKEQAIVSVTP	LLVYKPKISYQRIEDMVL		
Y. lipolytica HMG	(416)	TPITLSPELLHAI	FA	SVP-----VVTFVPSV	VVYEHSQLILQLEDALTE		
Consenso	(551)	DPEKVA NLLDAI	AAAKSN	RETLVTVTVP	PIKYELEYPSIHY E S		
		601			650		
A. nidulans HMG	(573)	---	QSIET	EYTDQLLDA	VGGHV	LNGVLKSTEDPVI	SKWITAVLTLSIVL
G. zeae HMG	(538)	GNNAEYTD	AFHHFQGY	GVGGRMVGG	ILKSL	LED	DPVLSKWIIVTALAISVAL
N. crassa HMG	(576)	---	AEVEGGDYANLGG	YGGRMVGS	ILKSL	LED	PTLSKWIIVVVALAISVAL
S. cerevisiae HMG2	(485)	---	---	---	---	---	---
S. cerevisiae HMG1	(486)	---	---	---	---	---	---
Y. lipolytica HMG	(460)	---	---	---	---	---	---
Consenso	(601)	L	G	GG	MLGSVSKS	IEDPVI	SKWIVIALALSIAL
		651			700		
A. nidulans HMG	(619)	NGYLF	NAARWSIK	EP	QAAPAPKEP	---	---
G. zeae HMG	(588)	NGYLF	ENVARWG	IKDPNV	PEHNID	RNELARAQQ	FN
N. crassa HMG	(621)	NGYLF	NAARWG	IKDPNV	PDHPIN	PKELDEA	QKFN
S. cerevisiae HMG2	(514)	NVYIL	LNAAKI	IHTGYMNF	QPSN	KID	DLVVQQKS
S. cerevisiae HMG1	(515)	NVYIL	LNAAARI	HTSYTADQL	VKTE	VT	TKKSFTAPV
Y. lipolytica HMG	(488)	NVYIL	FGATREV	VRTQSV	KVVEKH	MP	IVIE
Consenso	(651)	NVYLF	NAARW	IKDPNV	EV	EL	Q N SA L I T

FIG. 7E

		701				750
						-----AKPKVYPKTDLNAGPKRSMEECEAMLKA
(643)	A. nidulans HMG					
	G. zeae HMG					PMR--TEPSTHAIITDDEAEGLOMTKARSDKIPNRPNEE-----LEKLLAE
	N. crassa HMG					APSSPVAPITESTDDENDAAQAKENRAVTLAAQRATTIRSQGELDKMTAAE
(564)	S. cerevisiae HMG2					E-----TPVTAKDIIISEEIQNN--ECVYALSSQDEPIRPLSNLVELMEK
(565)	S. cerevisiae HMG1					K-----VKSISSACSSSSGPHSSSEEDDSRDIESLDKKIRPLEELEALLSS
(518)	Y. lipolytica HMG					-----HSEKEEETSSSEDSIELTVGKQPKPVTESTRSLDDLEATMKA
(701)	Consenso					TPA TDDE S S V KI IRSLEEELEALLAA
		751				800
(671)	A. nidulans HMG					KRAAYLSDELLIETLSLGGKIPGYALLKSLENEELMSRVDAFLRAVKKLRRRA
(681)	G. zeae HMG					KRVKEMSDDEIVSISMRCKIPGYALLKTLG-----DFTRAVKIRRS
(721)	N. crassa HMG					KRTHELNDEETVHISLKGKIPGYALEKTLK-----DFTRAVKVRRS
(607)	S. cerevisiae HMG2					EQLKNMNNTEVSNIVVNGKIPLYSLEKKLE-----DTRLRAVLVRRK
(611)	S. cerevisiae HMG1					GNTKQLKNKEVAALVTHGKIPLYALEKKLG-----DTTRAVAVRRK
(558)	Y. lipolytica HMG					GKTKLLEDHGVVKSLSLEGKIPLYALFKQLG-----DNTRAVGIRRS
(751)	Consenso					KKTK L DEEVV LSL GKLPYALEKTLG DFTRAVKIRRS
		801				850
(721)	A. nidulans HMG					VVSRTPATSAVTSSLETISKLHYKDYNVYALVHGACCENVIGTLPLPLGVAG
(722)	G. zeae HMG					IIAARNRATSDITHSLERSKLPFEKYNWVERVFCACCENVIGYMPPLPVGVAG
(762)	N. crassa HMG					IIISRTKATTELTNILLDRSKLHYQNVNWAQVHGACCENVIGYMPPLPVGVAG
(648)	S. cerevisiae HMG2					ALST---L-AESPIVSEKLPFRNYDYDRVDFGACCENVIGYMPIPVGVIG
(652)	S. cerevisiae HMG1					ALSI---L-AEAPVLASDRLYKNNYDYDRVDFGACCENVIGYMPPLPVGVIG
(599)	Y. lipolytica HMG					IIISQ---Q-SNTKTLETISKLHYLHYDYDRVDFGACCENVIGYMPPLPVGVAG
(801)	Consenso					IIIR ATSALT SLESSKLPKYKNYDRVDFGACCENVIGYMPPLPVGVAG

FIG. 7F

		851			900
A. nidulans HMG	(771)	PLVTDGQSYFIPMATIEGVLVASASRGAKAINAGGAVIVLTG			DGMTRGH
G. zeae HMG	(772)	RLVTDGQSYFIPMATIEGVLVASASRGCKAINAGGAVT			VLTDAGMTRGH
N. crassa HMG	(812)	PLVTDGQSEFFVPMATIEGVLVASTSRGCKAINSGGAVT			VLTDAGMTRGH
S. cerevisiae HMG2	(694)	PLITDGTSYHIPMATIEGCLVASAMPGCKAINAGGATT			VLTKDGMTRGH
S. cerevisiae HMG1	(698)	PLVTDGTSYHIPMATIEGCLVASAMRGCKAINAGGATT			VLTKDGMIRGH
Y. lipolytica HMG	(645)	PMNTDGKNYHIPMATIEGCLVASATMRGCKAINAGGV			TVLTQDGMTRGH
Consenso	(851)	PLVIDGQSYHIPMATIEGVLVASASRGCKAINAGGAVT			VLTDAGMTRGP
		901			950
A. nidulans HMG	(821)	CVGFPTIARAATAAKVWLDSEEFCKSVMTAAFNST			SRFARLQHLKTALAGTY
G. zeae HMG	(822)	CVAFETIIRAGAAKLVLDSEAGSDIMKKAFNST			SRFARLQSMKTALAGTN
N. crassa HMG	(862)	CVQFETIIRAGAAKLVLDSEKQSIMKKAFNST			SRFARLETMKTAMAGTN
S. cerevisiae HMG2	(744)	VVRFPTIIRSGACKIWLDSSEEGQNSIKKAFNST			SRFARLQHTQTCLAGDL
S. cerevisiae HMG1	(748)	VVRFPTIIRSGACKIWLDSSEEGQNAIKKAFNST			SRFARLQHIQTCLAGDL
Y. lipolytica HMG	(695)	CVSEFSLKRAAGAAKIWLDSSEFGLKSMRKA			FNSTSRFARLQSLHSTLAGNL
Consenso	(901)	CV FPTL RAGAAKIWLDSSEEGQ SMKKA			FNSTSRFARLQHIKTALAGTL
		951			1000
A. nidulans HMG	(871)	LYIRFKTTTGDAMGMNMISKGVKALHVMATECGF			DDMATISVSGNECTD
G. zeae HMG	(872)	LYIRFKTTTGDAMGMNIIISKGVEHALSVMSNEAGF			DDMQIVSVSGNYCTD
N. crassa HMG	(912)	LYIRFKITTTGDAMGMNMISKGVEHALSVVMYNEG			-FE DMNIVSLSGNYCTD
S. cerevisiae HMG2	(794)	LFMRFRTTTGDAMGMNMISKGVEYSILKQMVVEEY			GWEDMEVSVSGNYCTD
S. cerevisiae HMG1	(798)	LFMRFRTTTSDAMGMNMISKGVEYSILKQMVVEEY			GWEDMEVSVSGNYCTD
Y. lipolytica HMG	(745)	LFIRFRTTTGDAMGMNMISKGVEHSLAVMVKEY			GFPFLMDIVSVSGNYCTD
Consenso	(951)	LFIRFKTTTGDAMGMNMISKGVEHALSVMV EYGF			EDMEIVSVSGNYCTD

FIG. 7G

		1001		1050
A. nidulans HMG	(921)	KKAAALNWIDGRGKSVVAEAIIIEGADVVRNVLKSDVDALVELNISKNLIGS		
G. zeae HMG	(922)	KKAAALNWIDGRGKGVVAEAIIIEGADVVRNVLKSDVDALVELNISKNLIGS		
N. crassa HMG	(961)	KKAAALNVIDGRGKSVVAEAIIIPADVVRNVLKSDVDALVELNISKNLIGS		
S. cerevisiae HMG2	(844)	KKPAAALNWIEGRGKSVVAEAIIIEGADVVRNVLKSDVDALVELNISKNLIGS		
S. cerevisiae HMG1	(848)	KKPAAALNWIEGRGKSVVAEAIIIEGADVVRNVLKSDVDALVELNISKNLIGS		
Y. lipolytica HMG	(795)	KKPAAALNWIEGRGKSVVAEAIIIPAHIVKSVLKSEVDALVELNISKNLIGS		
Consenso	(1001)	KKPAAALNWIDGRGKSVVAEAIIIEGADVVRNVLKSDVDALVELNISKNLIGS		
		1051		1100
A. nidulans HMG	(971)	AMAGSLGGFNAHASNIVTAIIFLATIGODPAQNVESSSCITIMKNTNGNLQI		
G. zeae HMG	(972)	AMAGSLGGFNAHASNIVTAIIFLATIGODPAQNVESANCIITLMKNTNGNLQI		
N. crassa HMG	(1011)	AMAGSMGGFNAHASNIVTAIIFLATIGODPAQNVESANCIITLMKNTNGNLQI		
S. cerevisiae HMG2	(894)	AMAGSLGGFNAHASNIVTAIIFLATIGODPAQNVESANCIITLMKNTNGNLQI		
S. cerevisiae HMG1	(898)	AMAGSLGGFNAHASNIVTAIIFLATIGODPAQNVESANCIITLMKNTNGNLQI		
Y. lipolytica HMG	(845)	AMAGSLGGFNAHASNIVTAIIFLATIGODPAQNVESANCIITLMKNTNGNLQI		
Consenso	(1051)	AMAGSLGGFNAHASNIVTAIIFLATIGODPAQNVESANCIITLMKNTNGNLQI		
		1101		1150
A. nidulans HMG	(1021)	AVSMPSIEVGTIGGGTILEAQGAMIDILGVGRGSHPTNPGDNARQLARIIVA		
G. zeae HMG	(1022)	SVSMPSIEVGTIGGGTILEPQSAMIDILGVGRGSHPTNPGDNARQLARIIVA		
N. crassa HMG	(1061)	SVSMPSIEVGTIGGGTILEPQSAMIDILGVGRGSHPTNPGDNARQLARIIVA		
S. cerevisiae HMG2	(944)	SVSMPSIEVGTIGGGTILEPQSAMIDILGVGRGSHPTNPGDNARQLARIIVA		
S. cerevisiae HMG1	(948)	SVSMPSIEVGTIGGGTILEPQSAMIDILGVGRGSHPTNPGDNARQLARIIVA		
Y. lipolytica HMG	(895)	SVSMPSIEVGTIGGGTILEPQSAMIDILGVGRGSHPTNPGDNARQLARIIVA		
Consenso	(1101)	SVSMPSIEVGTIGGGTILEPQSAMIDILGVGRGSHPTNPGDNARQLARIIVA		

FIG. 7H

		1151		1200	
A. nidulans HMG	(1071)	AAVLAGEFLSLCS	SALAAAGHLVRAHMAHNR	SAAPTRS	ATPVSAAVGATRGLS
G. zeae HMG	(1072)	ASVLAGELSLCS	SALAAAGHLVRAHMC	HNRSAAP	SRSTTPAPMTPVRSFDTK
N. crassa HMG	(1111)	AAVLAGELSLCS	SALAAAGHLVKAHMAHNR	SAPPTRT	STPAPAAAAGLTMIS
S. cerevisiae HMG2	(994)	CAVLAGELSLCS	SALAAAGHLVQSHMTHNR	KTNKANELP	----QPSNKGPPC
S. cerevisiae HMG1	(998)	CAVLAGELSLCS	CAALAAAGHLVQSHMTHNR	KPAEPTKPN	NLDATDINRLKDG
Y. lipolytica HMG	(945)	SGVLAELSLCS	SALAAAGHLVQSHMTHNR	SQAPTPAKQ	SQADLQRLQNGSN
Consenso	(1151)	AAVLAGELSLCS	SALAAAGHLVQA	HMTNRS	SAAPTRS TP A T
		1201		1250	
A. nidulans HMG	(1121)	MTSSR	-----	-----	
G. zeae HMG	(1122)	MRCQPNKDIRN	ILLTQHPSKPTITYSKRVIKSTIHLNPL	ILALEDNSVQ	
N. crassa HMG	(1161)	S	-----N---	PNAAAVERSRR	
S. cerevisiae HMG2	(1040)	KTSALL	-----	-----	
S. cerevisiae HMG1	(1048)	SVTCIKS	-----	-----	
Y. lipolytica HMG	(995)	TCIRS	-----	-----	
Consenso	(1201)	I S	-----	-----	
		1251		1289	
A. nidulans HMG	(1126)	-----	-----	-----	
G. zeae HMG	(1172)	TRDVQLGDQV	STRGTLDVAGGPGQGGVAAGGVARRVVGS	-----	
N. crassa HMG	(1174)	-----	-----	-----	
S. cerevisiae HMG2	(1046)	-----	-----	-----	
S. cerevisiae HMG1	(1055)	-----	-----	-----	
Y. lipolytica HMG	(1000)	-----	-----	-----	
Consenso	(1251)	-----	-----	-----	

FIG. 71

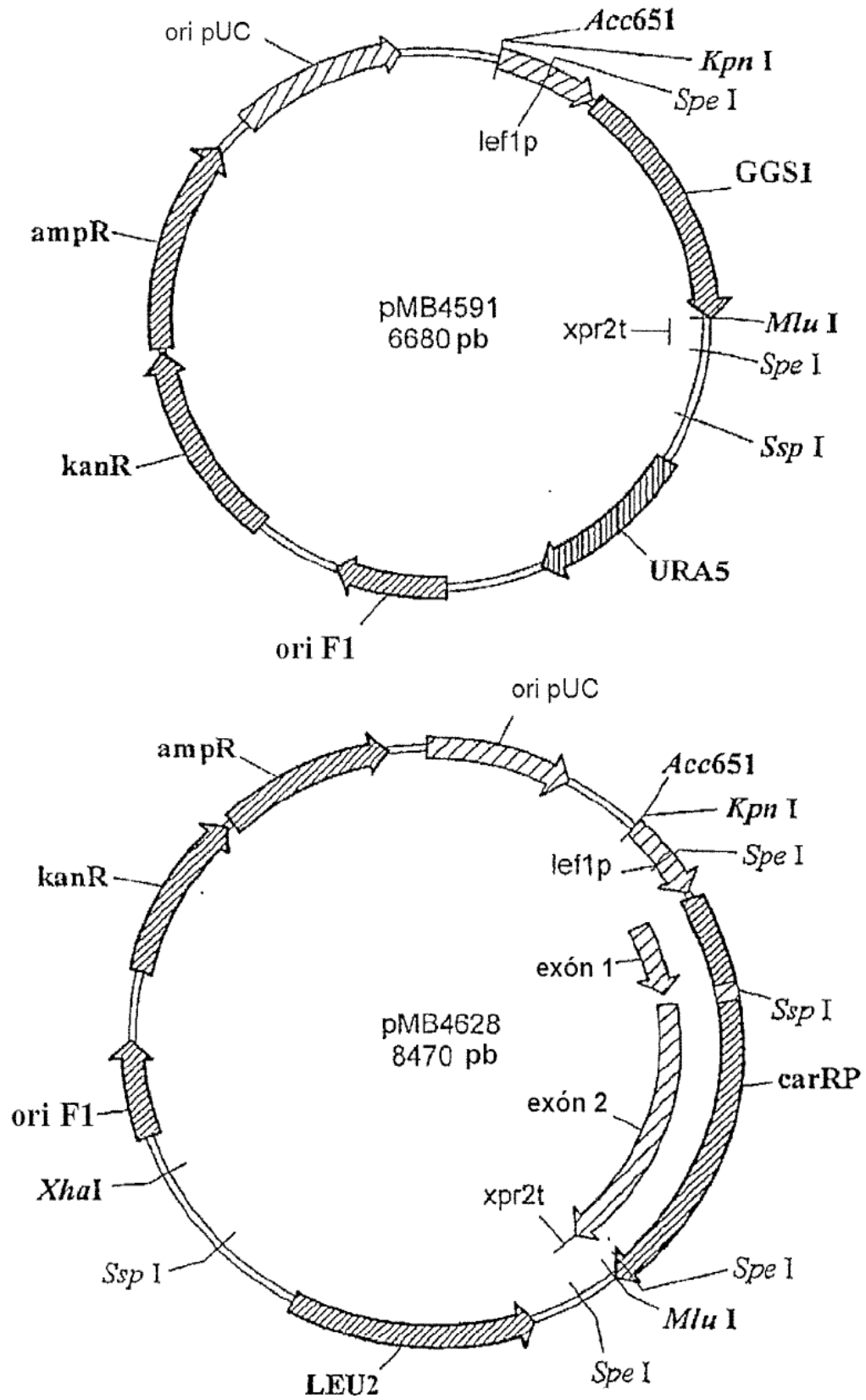


FIG. 8A

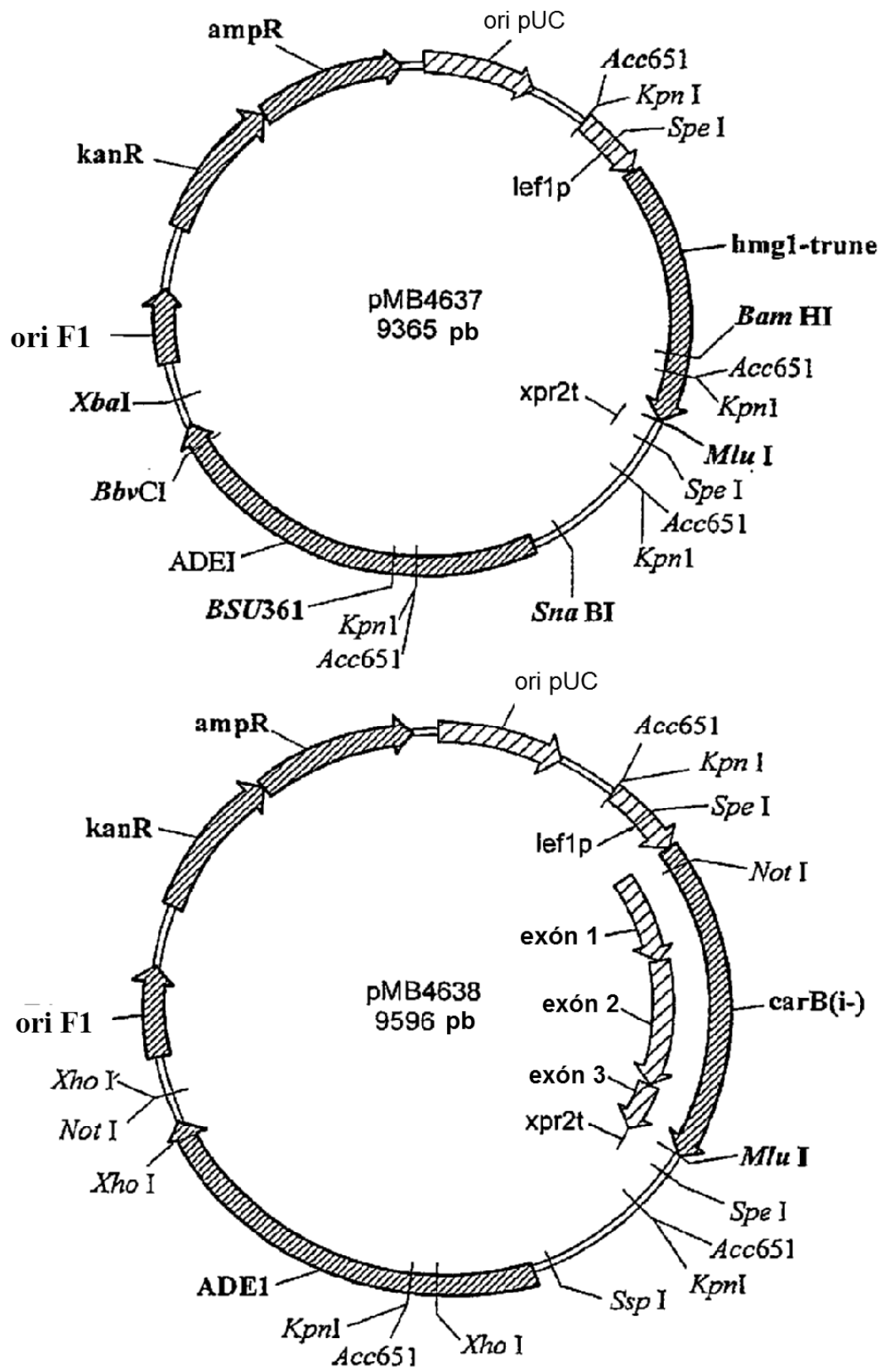


FIG. 8B

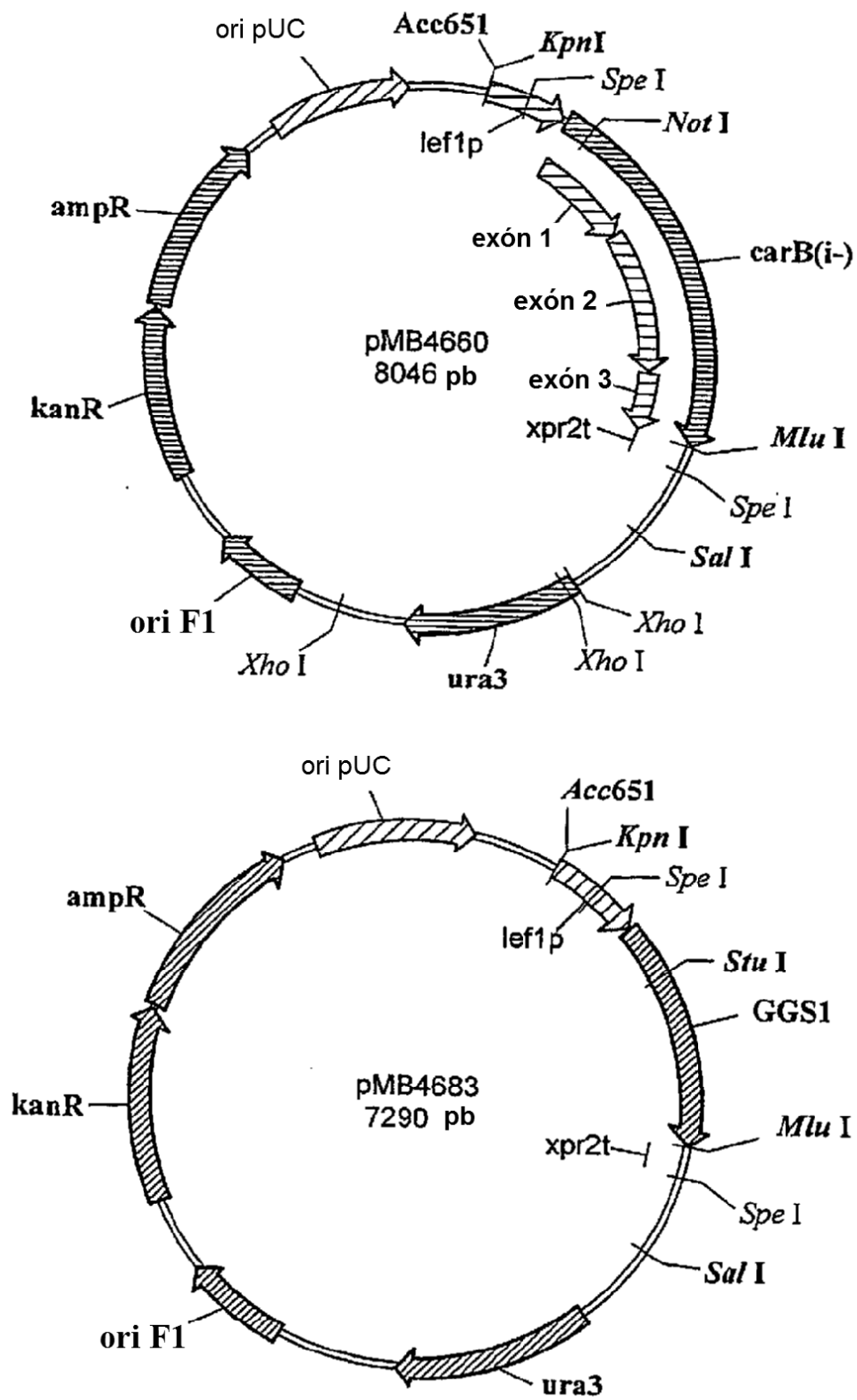


FIG. 8C

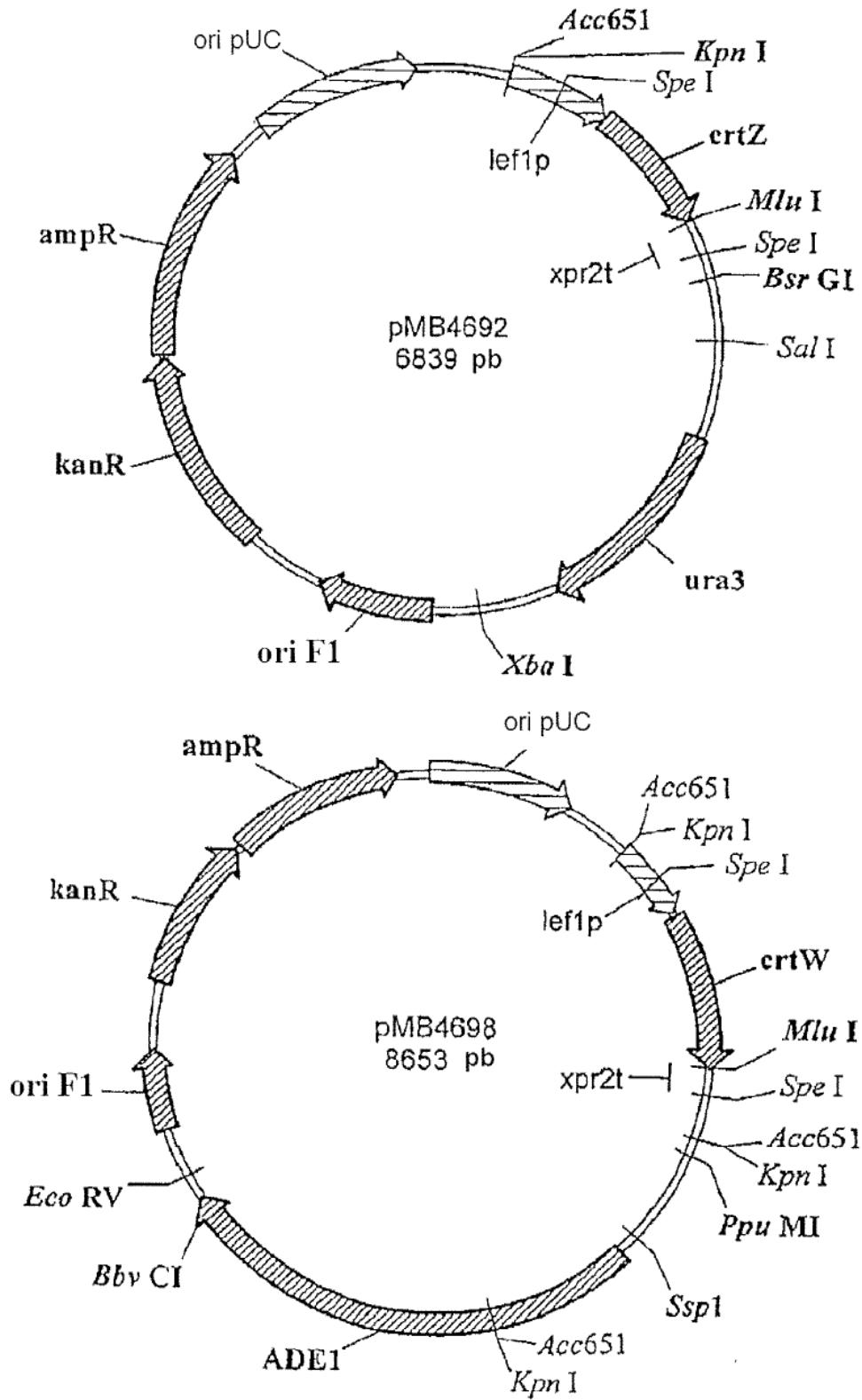


FIG. 8D