

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 585 477**

51 Int. Cl.:

C12P 7/22 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

C12N 9/00 (2006.01)

C12N 9/88 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.07.2007 E 07787741 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016 EP 2046966**

54 Título: **Células modificadas metabólicamente para la producción de pinosilvina**

30 Prioridad:

20.07.2006 GB 0614442

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

06.10.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KATZ, MICHAEL;
FÖRSTER, JOCHEN;
DAVID, HELGA;
SCHMIDT, HANS PETER;
SENDELIUS, MALIN;
BJØRN, SARA PETERSEN y
DURHUUS, THOMAS THOMASEN**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 585 477 T3

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

DESCRIPCIÓN

Células modificadas metabólicamente para la producción de pinosilvina

Campo de la invención

5 La invención se relaciona en general con la producción del polifenol pinosilvina. Adicionalmente, se relaciona con el uso de microorganismos de origen natural o recombinantes que producen pinosilvina para la producción de alimento, pienso y bebidas.

Antecedentes de la invención

10 La producción de agentes químicos a partir de microorganismos ha sido una aplicación importante de la biotecnología. Típicamente, las etapas en el desarrollo de tal método de bioproducción pueden incluir 1) selección de un microorganismo huésped apropiado, 2) eliminación de rutas metabólicas que llevan a subproductos, 3) desregulación de rutas deseadas a nivel tanto de actividad enzimática como a nivel transcripcional, y 4) sobreexpresión de enzimas apropiadas en las rutas deseadas. En aspectos preferidos, la presente invención a empleado combinaciones de las etapas anteriores para redirigir el flujo de carbono desde fenilalanina a través de enzimas de la ruta vegetal fenilpropanoide la cual suministra el precursor necesario para la biosíntesis deseada de pinosilvina.

15 La pinosilvina (o pinosilvina o 3,5-dihidroxi-trans-estilbeno) es un fitofenol que pertenece al grupo de las estilbeno fitoalexinas, los cuales son metabolitos secundarios de peso molecular bajo que constituyen el mecanismo de defensa activo en plantas en respuesta a infecciones u otros eventos relacionados con estrés. Las estilbenos fitoalexinas contienen el esqueleto estilbeno (trans-1,2-difeniletileno) como su estructura básica común: pueden ser suplementadas mediante la adición de otros grupos también (Hart and Shrimpton, 1979, Hart, 19819. Se ha encontrado que los estilbenos en ciertos árboles (angiospermas, gimnospermas), pero también en algunas plantas herbáceas (en especies de las familias *Myrtaceae*, *Vitaceae* y *Leguminosae*). Dichos compuestos son tóxicos para plagas, especialmente hongos bacterias e insectos. Solo pocas plantas tienen la capacidad de sintetizar estilbenos, o de producirlos en una cantidad que las provea con suficiente resistencia a plagas.

25 La síntesis del esqueleto de estilbeno básico es ejecutada por estilbeno sintasas, las cuales comprenden una pequeña familia de genes en la mayoría de las especies examinadas (Kodan *et al.* 2002). Las estilbeno sintasas parecen haber evolucionado a partir de las chalcona sintasas, y pertenecen a la superfamilia de policétido sintasa (PKS) que comparte más de 65% de homología en aminoácidos. A diferencia de las PKSs bacterianas, las estilbeno y chalcona sintasas funcionan ambas como PKSs unimodulares con un sitio activo único, que forma homodímeros relativamente pequeños (Tropf *et al.*, 1995). Las estilbeno y chalcona sintasas utilizan sustratos comunes, tres malonil-CoAs y un cinamoil-CoA/p-cumaroil-CoA, formando sus productos con mecanismos de reacción similares (Kindl, 1985). Las estilbeno sintasas pueden ser clasificadas en un tipo específico para 4-cumaroil-CoA que tiene su actividad más alta con 4-cumaroil-CoA como sustrato, tal como la resveratrol sintasa (EC 2.3.1.95), o un tipo específico para cinamoil-CoA que tiene su actividad más alta con cinamoil-CoA como sustrato, tal como la pinosilvina sintasa (EC 2.3.1.146). Los genes que codifican las resveratrol sintasas han sido descritos anteriormente para el cacahuate (*Arachis hypogaea*) (Schöppner and Kindl, 1984; Schröder *et al.*, 1988) y viña (*Vitis vinifera*) (Melchior and Kindl, 1991; Wiese *et al.*, 1994) mientras que los genes que codifican la pinosilvina sintasa han sido descritos principalmente para el pino (*Pinus sylvestris* y *strobis*) (Schanz *et al.*, 1992; Raiber *et al.*, 1995; Kodan *et al.*, 2002; Hemingway *et al.*, 1977).

40 La pinosilvina está presente en la pulpa de madera de árboles de eucalipto, píceas y pino tales como *Pinus sylvestris*, *-densiflora*, *-taeda* y *-strobis*. En especies de pino, la pinosilvina constitutiva se presenta exclusivamente en el corazón del tronco (Kindl, 1985). Sin embargo, el compuesto es inducido en la albura, floema y agujas como respuesta a lesiones, ataque fúngico o estrés ambiental tal como radiación UV y exposición al ozono (Hart, 1981; Kindl, 1985; Richter and Wild, 1992; Lieutier *et al.*, 1996; Rosemann *et al.*, 1991). El compuesto posee potente actividad antifúngica contra un amplio surtido de hongos (Lindberg *et al.*, 2004; Pacher *et al.*, 2002).

45 La pinosilvina (figura 1 forma *trans*) consiste de dos anillos fenol cercanamente conectados y pertenece por lo tanto a los polifenoles. A diferencia de la mayoría de los otros hidroxiestilbenos, la pinosilvina carece de un grupo hidroxilo en el anillo B (figura 1) y se origina por condensación de cinamoil-CoA no sustituido con tres moléculas de malonil-CoA. Dicho esto, la pinosilvina es estructuralmente similar al trihidroxiestilbeno resveratrol, el cual se encuentra en el vino tinto (Aggarwal *et al.*, 2004). Se han generado muchos datos que demuestran los beneficios para la salud del resveratrol. Por ejemplo la potente actividad anticancerígena del resveratrol a través de muchas líneas celulares de cáncer ha sido bien establecida (Aggarwal *et al.*, 2004). Dada la similitud en estructura con el resveratrol, se anticipa que la pinosilvina posee beneficios potentes para la salud también. En efecto el efecto de la pinosilvina sobre diversos cánceres, incluyendo cánceres colorrectal y de hígado, ha sido estudiado y ha indicado su actividad quimiopreventiva y antileucémica (Skindner and Stoessl, 1986; Mellanen *et al.*, 1996; Roupe *et al.*, 2005 and 2006).

Además, la pinosilvina tiene capacidad oxidante también, aunque a un nivel menor que por ejemplo, el resveratrol (Stojanovic *et al.*, 2001).

Actualmente, la pinosilvina se obtiene principalmente en una mezcla de diversos flavonoides que se extraen de la corteza del pino. Dicha extracción es un proceso de trabajo intenso con bajo rendimiento. En aspectos preferidos, la presente invención provee procesos de producción novedosos, más eficientes y de alto rendimiento.

En plantas, la ruta fenilpropanoide es responsable por la síntesis de una amplia variedad de compuestos metabólicos secundarios, incluyendo ligninas, salicilatos, cumarinas, amidas hidroxicinámicas, pigmentos, flavonoides y fitoalexinas. En efecto la formación de estilbenos en plantas procede a través de la ruta fenilpropanoide. El aminoácido L-fenilalanina es convertido en ácido trans-cinámico a través de la desaminación no oxidativa por la L-fenilalanina amonio liasa (PAL) (figura 2). A partir de ácido trans-cinámico la ruta puede ramificarse en una ruta de formación de resveratrol o en una ruta de formación de pinosilvina. En la primera ruta el ácido trans-cinámico es hidroxilado en la posición *para* a ácido 4-cumárico (ácido 4-hidroxicinámico) mediante la cinamato-4-hidroxilasa (C4H), una enzima de citocromo P450 monooxigenasa, en conjunción con NADPH: citocromo P450 reductasa (CPR). Subsecuentemente, el ácido 4-cumárico es activado entonces a 4-cumaroil-CoA mediante la acción de la 4-cumarato-CoA ligasa (4CL). Una resveratrol sintasa (VST1), puede catalizar entonces la condensación de una unidad fenil propano de la 4-cumaroil-CoA con malonil CoA, dando como resultado la formación de resveratrol. En la última ruta el ácido trans-cinámico es activado directamente a cinamoil-CoA mediante la acción de 4CL donde una pinosilvina sintasa (PST) cataliza subsecuentemente la condensación de una unidad fenilpropano del cinamoil-CoA con malonil CoA, dando como resultado la formación de pinosilvina.

Las estilbeno sintasas son enzimas más bien promiscuas que pueden aceptar una variedad de sustratos fisiológicos y no fisiológicos. Por ejemplo, la adición de diversos ésteres fenilpropanoides iniciadores de CoA lleva a la formación de varios productos *in vitro* (Ikuro *et al.*, 2004; Morita *et al.*, 2001). De la misma forma se ha demostrado que la resveratrol sintasa del ruibarbo (*Rheum tartaricum*) sintetizaba efectivamente una pequeña cantidad de pinosilvina cuando se utilizaba cinamoil-CoA como sustrato en vez de cumaroil-CoA (Samappito *et al.*, 2003).

De la misma forma, la cumaroil-CoA ligasa puede aceptar tanto ácido cumárico como ácido cinámico como sustrato, no obstante con una eficiencia catalítica (K_m/K_{cat}) que es 100 veces menor para el ácido cinámico en comparación con el ácido cumárico (Allina *et al.*, 1998; Ehling *et al.*, 1999). Se deduce de lo anterior que sería posible producir pinosilvina en una ruta que consistiría de 4CL y una estilbeno sintasa, incluso una que se designa como una resveratrol sintasa clásica.

Recientemente, se divulgó una levadura que podría producir resveratrol a partir de ácido cumárico que se encuentra en pequeñas cantidades en el mosto de la uva (Becker *et al.* 2003, ZA200408194). La producción de 4-cumaroil-CoA a partir de ácido cumárico exógeno y resveratrol concomitante, en cepas de laboratorio de *S. cerevisiae*, fue lograda coexpresando un gen heterólogo de coenzima-A ligasa, de álamo híbrido, junto con el gen de resveratrol sintasa de la viña (VST1). El otro sustrato para la resveratrol sintasa, la malonil-CoA, ya es producida endógenamente en levadura y está involucrada en la biosíntesis de ácidos grasos de *nov*o. El estudio demostró que las células de *S. cerevisiae* podrían producir cantidades diminutas de resveratrol, bien sea en la forma libre o en la forma enlazada glucósido, cuando se cultiva en medios sintéticos suplementados con ácido 4-cumárico.

Dada la promiscuidad de las resveratrol sintasa, puede ser que dicha levadura podría producir pinosilvina cuando es alimentada con cantidades sustanciales de ácido cinámico. Sin embargo, la aplicación comercial de tal levadura sería dificultada por el probable bajo rendimiento en pinosilvina, y la necesidad de adición de ácido cinámico, el cual no está presente de manera abundante en el medio industrial. Por lo tanto, para acelerar y ampliar la aplicación de la pinosilvina como un agente farmacéutico tanto como nutraceutico, es altamente deseable proveer una levadura u otro microorganismo que pueda producir pinosilvina directamente a partir de glucosa, sin adición de ácido cinámico o un derivado de ácido cinámico corriente abajo tal como cinamoil-CoA.

Un estudio reciente (Ro and Douglas, 2004) describe la reconstitución del punto de entrada de la ruta fenilpropanoide en *S. cerevisiae* introduciendo PAL, C4H y CPR de álamo. El propósito fue evaluar si estos complejos multienzimáticos (MECs) que contienen PAL y C4H son funcionalmente importantes en este punto de entrada en el metabolismo fenilpropanoide. Alimentando la levadura recombinantes con [3H]-fenilalanina se encontró que la mayor parte de la [3H]-fenilalanina metabolizada fue incorporada en ácido 4-[3H]-cumárico, y que el metabolismo de la fenilalanina se redujo altamente inhibiendo la actividad de C4H. Además, los expresadores de PAL solo metabolizaron muy poca fenilalanina en ácido cinámico. Cuando se suministró [3H]-fenilalanina y [14C]-ácido trans-cinámico simultáneamente a los expresadores triples no se encontró evidencia en cuanto a la canalización del ácido [3H]-trans-cinámico sintetizado endógenamente en ácido 4-cumárico. Por lo tanto, el flujo eficiente de carbono desde la fenilalanina al ácido 4-cumárico a través de reacciones catalizadas por PAL y C4H no parece requerir la canalización a través de un MEC en levadura, y el acoplamiento bioquímico puro de PAL y C4H parece ser suficiente para dirigir el flujo de carbono hacia la ruta fenilpropanoide. En aún otro estudio (Hwang *et al.*, 2003) la producción de flavanonas específicas para plantas por *Escherichia coli* se logró a través de la expresión de un aglomerado de genes artificial que contenía tres genes de una ruta fenilpropanoide de ver sus orígenes

heterólogos; el PAL de la levadura *Rhodotorula rubra*, 4CL del actinomiceto *Streptomyces coelicolor*, y la chalcona sintasa (CHS) de la planta de regaliz *Glycyrrhiza echinata*. Estas rutas evitaron el C4H, porque la enzima bacteriana 4CL ligaba la coenzima A tanto a ácido trans-cinámico como a ácido 4-cumárico. Además, el PAL de la *Rhodotorula rubra* utiliza tanto fenilalanina como tirosina como sustratos. Por lo tanto, las células de *E. coli* que contiene los

También se describen estudios en los cuales las propiedades enzimáticas de la pinosilvina sintasa fueron estudiadas clonando primero los genes en *Escherichia coli*. Por ejemplo, Raiber et al., 1995 reporta estilbenos de *Pinus strobus* (pino blanco oriental) que fueron investigados después de la expresión heteróloga en *Escherichia coli*. Para esto se crió una genoteca de ADNc de *P. strobus* con una sonda de estilbeno sintasa (STS) de *Pinus sylvestris* y entre los ADNc aislados se encontraron dos genes STS cercanamente relacionados, STS1 y STS2 con cinco diferencias de aminoácidos en las proteínas. Los genes fueron clonados sobre un plásmido y expresados en *E. coli* y se sometieron extractos celulares a ensayos enzimáticos. Parece ser que ambas proteínas aceptaron la cinamoil-CoA como sustrato y así fueron consideradas como pinosilvinas sintasas, si bien revelaron grandes diferencias. La STS1 tenía solamente 3-5% de la actividad de la STS2, y su pH óptimo fue desplazado a valores inferiores (pH 6), y se sintetizó con cinamoil-CoA un segundo producto desconocido. La mutagénesis dirigida al sitio demostró que un intercambio individual Arg a His en STS1 era responsable de todas las diferencias. En otro estudio tres ADNc de STS (PDSTS1, PDSTS2 y PDSTS3) de *Pinus densiflora* fueron aislados y los ADNc fueron expresados en forma heteróloga en *E. coli* para caracterizar sus propiedades enzimáticas (Kodan et al., 2002). La PDSTS3 pareció ser una isozima STS inusual que mostraba la actividad formadora de pinosilvina más alta entre las STSs probadas. Adicionalmente, la PDSTS3 fue insensible a la inhibición de producto a diferencia de la PDSTS1 y la PDSTS2. Las características inusuales de la PDSTS3 podrían ser adscritas a una carencia de la extensión en C-terminal que normalmente es común a las estilbeno sintasas, la cual es causada por una mutación de desplazamiento de marco. En aún otro estudio se crió una genoteca de ADN genómico con ADN de pinosilvina sintasa pSP-54 como sonda (Müller et al., 1999). Después de subclonar, se caracterizaron cuatro miembros diferentes por secuenciación. Las secuencias de aminoácidos deducidas de los genes PST-1, PST-2, PST-3 y PST-5 compartían una identidad global de más del 95%.

Se analizaron diferencias en la fuerza del promotor mediante expresión transiente en protoplastos de tabaco. Los constructos usados contenían la glucuronidasa bacteriana bajo el control de los promotores de los genes de pino PST-1, PST-2 y PST-3. Por tratamiento con luz UV o un disparador fúngico, el promotor de PST-1 mostró capacidad de respuesta más alta y llevo a la expresión específica en tejidos en haces vasculares. Los datos sugieren que en el pino el producto genético de PST-1 es responsable tanto de la respuesta al estrés en plantones como en la formación de pinosilvina en el corazón de la madera.

Un estudio adicional demostró que una estilbeno sintasa clonada de pino escoses (*Pinus sylvestris*) fue denominada tempranamente de manera abortiva como dihidropinosilvina sintasa, mientras que demostró ser una pinosilvina sintasa. La interpretación errónea previa fue causada por la influencia de factores bacterianos sobre la preferencia por sustrato y la actividad de la proteína específica de la planta que fue expresada en *E. coli*. Después de la mejora del sistema de expresión, el análisis cinético subsecuente reveló que la cinamoil-CoA en vez de la fenilpropionil-CoA era el sustrato preferido de la estilbeno sintasa clonada. Adicionalmente, los extractos de *P. sylvestris* contenían factores que influían selectivamente en la preferencia por el sustrato, esto es, la actividad se redujo con fenilpropionil-CoA, pero no con cinamoil-CoA. Esto explicó las diferencias aparentes entre extractos de plantas y la enzima clonada expresada en *E. coli* y las precauciones de que los factores en los huéspedes naturales y los nuevos pueden complicar la identificación funcional de las secuencias clonadas.

Adicionalmente, se describen vectores con genes de estilbeno sintasa los cuales pueden significar resveratrol sintasa y pinosilvina sintasa, para la transformación de organismos y plantas para conferir resistencia potenciada contra plagas y lesiones (EP0309862 y EP0464461).

También, se describen vectores adicionales que contienen secuencias de ADN que hibridarán a pinosilvina sintasa de *Pinus sylvestris* (US5391724) y dichos vectores para ser usados para expresión en una planta (US5973230). La incorporación de PAL y 4CL juntos con una estilbeno sintasa para la producción de pinosilvina en un organismo sin embargo no está descrita. Ni hay microorganismos que produzcan pinosilvina.

Recientemente, se ha mostrado evidencia de que el hongo filamentoso *A. oryzae* contenía la enzima chalcona sintasa (CHS) que está involucrada normalmente en la biosíntesis de flavonoides, tal como naringenina, en las plantas (Juvvadi et al., 2005; Seshime et al., 2005). En efecto se demostró también que la *A. oryzae* contenía el conjunto principal de genes responsables para el metabolismo fenilpropanoide-flavonoide, esto es, PAL, C4H y 4CL. Sin embargo, no hay evidencia de que la *A. oryzae* contenga una estilbeno sintasa.

Nuestra solicitud copendiente WO2006/089898 describe microorganismos que producen resveratrol, especialmente

levaduras.

Resumen de la invención

- La presente invención provee ahora un microorganismo genéticamente modificado para la producción de pinosilvina, en donde dicho microorganismo es una bacteria u hongo que tiene una ruta metabólica operativa que comprende al menos una primera actividad enzimática para formar cinamoil-CoA a partir de ácido cinámico y una estilbeno sintasa, en donde dicha estilbeno sintasa es expresada en dicho microorganismo a partir de ácidos nucleicos que codifican para dicha enzima la cual no es nativa del microorganismo. En microorganismos preferidos dicha ruta produce ácido cinámico y produce pinosilvina a partir del mismo. Especialmente, la invención provee el uso de tales microorganismos en la producción de pinosilvina.
- La invención incluye métodos para producir pinosilvina a partir de tales microorganismos, y opcionalmente aislar o purificar la pinosilvina producida de esta manera. El cultivo se lleva a cabo preferiblemente en ausencia sustancial de una fuente externa de ácido cinámico. Esto implica también la ausencia sustancial de una fuente externa de derivados de ácido cinámico formados a partir del mismo en la ruta fenilpropanoide tales como cinamoil-CoA.

Descripción detallada de la realización preferida

- Preferiblemente, dicha pinosilvina o derivado es producida en una reacción catalizada por una enzima en la cual la malonil-CoA endógena es un sustrato, y dicha pinosilvina es producida a partir de cinamoil-CoA.

Dicha pinosilvina o derivados es producida a partir de cinamoil-CoA, por una estilbeno sintasa la cual es expresada en dicho microorganismo a partir de ácidos nucleicos que codifican para dicha enzima la cual no es nativa del microorganismo.

- En general aquí, a menos que el texto implique otra cosa, las referencias a pinosilvina incluyen referencia a derivados oligoméricos o glicosídicamente unidos de la misma.

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

- La estilbeno sintasa puede ser una que exhiba una rata de rendimiento más alta con cinamoil-CoA como sustrato que lo hace con 4-cumaroil-CoA como sustrato, por ejemplo en un factor de al menos 1.5 o al menos 2. Así, en realizaciones adicionalmente preferidas, dicha estilbeno sintasa es una pinosilvina sintasa, preferiblemente a partir de una especie de árbol tal como una especie de *Pinus*, *Eucalyptus*, *Picea* o *Maclura*. En particular, la estilbeno sintasa puede ser una pinosilvina sintasa (EC 2.3.1.146) a partir de una planta que pertenece al género de *Pinus*, por ejemplo *P. sylvestris*, *P. strobes*, *P. densi flora*, *P. taeda*, una planta que pertenece al género *Picea*, o cualquiera del género *Eucalyptus*.

- Preferiblemente, dicho ácido cinámico puede ser producido a partir de L-fenilalanina en una reacción catalizada por una enzima en la cual se produce amoníaco y se forma adecuadamente dicho ácido cinámico a partir de L-fenilalanina mediante una fenilalanina amoníaco liasa.

- En ciertas realizaciones preferidas, dicha fenilalanina amoníaco liasa es una L-fenilalanina amoníaco liasa (EC 4.3.1.5) de una planta o un microorganismo. La planta puede pertenecer al género de *Arabidopsis*, por ejemplo, *A. thaliana*, una planta que pertenece al género de *Brassica*, por ejemplo *B. napus*, *B. rapa*, una planta que pertenece al género de *Citrus*, por ejemplo *C. reticulata*, *C. clementinus*, *C. limon*, una planta que pertenece al género de *Phaseolus*, e.g. *P. coccineus*, *P. vulgaris*, una planta que pertenece al género de *Pinus*, e.g. *P. banksiana*, *P. monticola*, *P. pinaster*, *P. sylvestris*, *P. taeda*, una planta que pertenece al género de *Populus*, e.g. *P. balsamifera*, *P. deltoides*, *P. Canadensis*, *P. kitakamiensis*, *P. tremuloides*, una planta que pertenece al género de *Solanum*, e.g. *S. tuberosum*, una planta que pertenece al género de *Prunus*, e.g. *P. avium*, *P. persica*, una planta que pertenece al género de *Vitis*, e.g. *Vitis vinifera*, una planta que pertenece al género de *Zea*, e.g. *Z. mays* u otros géneros de plantas e.g. *Agastache*, *Ananas*, *Asparagus*, *Bromheadia*, *Bambusa*, *Beta*, *Betula*, *Cucumis*, *Camellia*, *Capsicum*, *Cassia*, *Catharanthus*, *Cicer*, *Citrullus*, *Coffea*, *Cucurbita*, *Cynodon*, *Daucus*, *Dendrobium*, *Dianthus*, *Digitalis*, *Dioscorea*, *Eucalyptus*, *Gallus*, *Ginkgo*, *Glycine*, *Hordeum*, *Helianthus*, *Ipomoea*, *Lactuca*, *Lithospermum*, *Lotus*, *Lycopersicon*, *Medicago*, *Malus*, *Manihot*, *Medicago*, *Mesembryanthemum*, *Nicotiana*, *Olea*, *Oryza*, *Pisum*, *Persea*, *Petroselinum*, *Phalaenopsis*, *Phyllostachys*, *Physcomitrella*, *Picea*, *Pyrus*, *Quercus*, *Raphanus*, *Rehmannia*, *Rubus*, *Sorghum*, *Sphenostylis*, *Stellaria*, *Stylosanthes*, *Triticum*, *Trifolium*, *Triticum*, *Vaccinium*, *Vigna*, *Zinnia*. El microorganismo podría ser un hongo que pertenece al género *Agaricus*, por ejemplo *A. bisporus*, un hongo que

pertenece al género *Aspergillus*, e.g. *A. oryzae*, *A. nidulans*, *A. fumigatus*, un hongo que pertenece al género *Ustilago*, e.g. *U. maydis* una bacteria que pertenece al género *Rhodobacter*, e.g. *R. capsulatus* una bacteria que pertenece al género *Streptomyces*, e.g. *S. maritimus* una bacteria que pertenece al género *Photobacterium*, e.g. *P. luminescens*, una levadura que pertenece al género *Rhodotorula*, e.g. *R. rubra*.

- 5 Puesto que, tal como se describió más arriba, para la producción de pinosilvina se requiere la producción de ácido cinámico por una enzima PAL y también su conversión a pinosilvina más que la producción de ácido cumárico a partir de tirosina por un sustrato promiscuo PAL o por conversión de ácido cinámico por una enzima C4H, los microorganismos para uso en la invención tienen preferiblemente una PAL que favorece la fenilalanina como sustrato (produciendo así ácido cinámico) con respecto a la tirosina (de la cual se produce ácido cumárico).
10 Preferiblemente, por lo tanto, la relación $K_m(\text{fenilalanina})/K_m(\text{tirosina})$ para la PAL es menor de 1:1, preferiblemente menor de 1:5, por ejemplo menor de 1:10. Como es usual, K_m es la concentración molar del sustrato (fenilalanina o tirosina respectivamente) que produce la mitad de la rata máxima de formación de producto ($V_{\max}$).

- La presencia de C4H no es útil para la producción de pinosilvina, pero no es preciso evitarlo dado que la diversificación del ácido cinámico a partir de la producción de pinosilvina hacia la formación de resveratrol a través de ácido cumárico no es excesiva. Por lo tanto, preferiblemente la producción de C4H es ausente o tal que $K_{\text{cat}}(\text{PAL})/K_{\text{cat}}(\text{C4H})$ es mayor que 2, preferiblemente mayor que 4. Como es usual, en cada caso K_{cat} es $V_{\max}/[\text{Enzima}]$, donde $[\text{Enzima}]$ es la concentración de la enzima relevante.

- A manera de ilustración, los valores típicos de K_m para la fenilalanina amonio liasa PAL2 de *A. thaliana* y su homólogo PAL1 están alrededor de 60 μM con fenilalanina como sustrato (Cochrane et al, 2004), y más de 1000 μM cuando se utiliza tirosina como sustrato (Watts et al, 2006). La rata de rendimiento catalítico K_{cat} para PAL2 de *A. thaliana* es 192 moles de ácido cinámico/mol de enzima PAL2 cuando se convierte fenilalanina a ácido cinámico (Cochrane et al, 2004) pero K_{cat} es diminuta para la conversión de tirosina a ácido cumárico. Una PAL con las propiedades genéticas anteriores es específica para la fenilalanina como sustrato y da exclusivamente la formación de ácido cinámico a partir de la fenilalanina y niveles indetectables de ácido cumárico a partir de tirosina.

- 25 La rata de rendimiento típica para la reacción de hidroxilasa catalizada por C4H es 25 moles de producto de ácido cumárico/mol de enzima/minuto cuando la actividad nativa de levadura CPR soporta la reacción (Urban et al, 1994). La actividad de C4H puede ser limitada por la disponibilidad de NADPH y esta puede incrementarse si la enzima citocromo P450 hidroxilasa (CPR) es sobreexpresada. Si la CPR es sobreexpresada como se ejemplifica en la literatura de 5 a 20 veces (Mizutani et al, 1998, Urban et al, 1994) las ratas de rendimiento catalítico para la reacción
30 con C4H que convierte el ácido cinámico a ácido cumárico se incrementa a 125 moles de producto de ácido cumárico/mol de enzima/minuto y 530 moles de producto de ácido cumárico/mol de enzima/minuto, respectivamente.

- El resultado de la reacción combinada PAL-C4H-CPR dependerá de los números catalíticos y la cantidad de cada enzima presente, especialmente la cantidad de CPR que soporta la donación de electrones, NADPH, para C4H. Una
35 PAL eficiente dará cerca de 192 moles de ácido cinámico/mol de PAL/minuto y la enzima C4H siguiente en la secuencia convertirá cerca de 25 moles de este ácido cinámico/mol de C4H/minuto en ácido cumárico con la actividad de CPR nativa. Así el producto dominante a partir de la reacción combinada PAL-C4H-CPR será ácido cinámico (167 moles de ácido cinámico/mol de enzima PAL/minuto y 25 moles de ácido cumárico/mol de enzima C4H/minuto con actividad de CPR nativa. Una actividad de CPR más alta llevará a más actividad de C4H por mol de
40 enzima C4H y finalmente a ácido cumárico puro si se sobreexpresa a niveles altos. Una CPR sobreexpresada solamente cinco veces como en el artículo de Mizutani (Mizutani et al, 1998) dará como resultado 125 moles de ácido cumárico/mol de C4H/minuto y solamente 67 moles de ácido cinámico serían el resultado de la PAL por minuto. Así la CPR debe al menos ser sobreexpresada cerca de 8 veces para una producción de ácido cumárico puro (indeseada).

- 45 En el caso de un organismo recombinante o natural con varias PALs/TALs y C4H se puede preparar un extracto celular y medir las ratas de rendimiento catalítico aparentes y los valores de K_m como una suma total (o de enzima agregada) de enzima aparentes PAL, TAL o C4H. A partir de estas propiedades de suma estimadas será posible determinar si el organismo producirá principalmente ácido cumárico o ácido cinámico y así cual producto de resveratrol o pinosilvina sería el resultante cuando 4CL y VST se expresan en este organismo. La rata de
50 rendimiento se expresará ahora como moles de producto/(moles total de proteína/tiempo) en vez de lo que sucede cuando se utilizan moles de enzima pura producto/(mol de enzima pura/tiempo). Por lo tanto, la relación preferida $K_m(\text{fenilalanina})/K_m(\text{tirosina})$ para la PAL menos de 1:1 puede aplicarse a la actividad de PAL agregada cuando está presente más de una PAL y la relación preferida $K_{\text{cat}}(\text{PAL})/K_{\text{cat}}(\text{C4H})$ mayor de 2 puede aplicarse al agregado de la actividad de PAL y/o C4H (modulada por CPR) cuando está presente más de una actividad de PAL y/o C4H.

- 55 Preferiblemente, los microorganismos no tienen C4H exógeno, esto es no han sido modificados genéticamente para proveer la expresión de una enzima C4H. Cualquier producción de C4H aquí entonces será nativa del organismo. Opcionalmente, el microorganismo sin C4H exógeno también puede carecer de C4H endógeno. La carencia de C4H endógeno puede deberse a una capacidad del C4H nativo de haber sido eliminado por métodos de modificación

genética o silenciamiento genético o simplemente porque el organismo carece naturalmente de los genes de C4H, puesto que la enzima no es parte de su metabolismo.

También, como se ve más arriba, la presencia de CPR no es útil para la producción de pinosilvina y su sobreexpresión, mientras que el no estar prohibido no es general deseable. De acuerdo con lo anterior, el microorganismo preferiblemente no tiene CPR endógena, no tiene CPR exógena o no tiene sobreexpresión de CPR nativa, o puede tener una expresión reducida de CPR nativa.

De manera adecuada, dicha L-fenilalanina amoníaco liasa es expresada en dicho microorganismo a partir de ácido nucleico que codifica para dicha enzima la cual no es nativa del microorganismo.

Preferiblemente, la cinamoil-CoA es formada en una reacción catalizada por una enzima en la cual el ATP y la CoA son sustratos y ADP es un producto y de manera adecuada cinamoil-CoA se forma en una reacción catalizada por una 4-cumarato-CoA ligasa (también denominada como 4-cumaroil-CoA-ligasa). Las enzimas 4-cumarato-CoA ligasa conocidas aceptan bien sea ácido 4-cumárico o ácido cinámico como sustratos y producen los correspondientes derivados CoA. En general, tales enzimas son conocidas como "4-cumarato-CoA ligasa" si muestran una actividad más alta con ácido 4-cumárico como sustrato o con ácido cinámico como sustrato. Sin embargo, nos referimos aquí a enzimas que tienen esa preferencia de sustrato como enzimas "cinamato-CoA ligasa" (o cinamoil-CoA-ligasa). Una enzima tal está descrita por ejemplo en Aneko *et al.*, 2003.

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

Un microorganismo tiene al menos una copia de al menos una secuencia genética que codifica una enzima respectiva en dicho camino metabólico que ha sido introducido por vía recombinante en dicho microorganismo.

Adicionalmente, se puede proveer una o más señales de expresión, tal como secuencias promotoras, no asociadas de manera nativa con dicha secuencia de codificación en dicho organismo. Así opcionalmente, al menos una copia de una secuencia genética que codifica una L-fenilalanina amoníaco liasa esta enlazado operativamente a una señal de expresión no asociada de manera nativa con dicha secuencia genética en dicho organismo.

Las señales de expresión incluyen secuencias de nucleótidos localizadas corriente arriba (secuencias no codificantes en 5'), dentro de, o corriente abajo (secuencias no codificantes en 3') de una secuencia de codificación, y que tienen influencia en la transcripción, procesamiento de ARN o estabilidad, o en la traducción de la secuencia de codificación asociada. Tales secuencias pueden incluir promotores, secuencias guía de la traducción, intrones y secuencias de reconocimiento de poliadenilación.

Opcionalmente, al menos una copia de la secuencia genética que codifica una 4-cumarato-CoA ligasa o cinamato-CoA ligasa, sea nativa o no, está enlazado operativamente a una señal de expresión no asociada de manera nativa con dicha secuencia genética en dicho organismo.

Opcionalmente, al menos una copia de la secuencia genética que codifica una estilbeno sintasa, la cual puede ser una resveratrol sintasa esta enlazado operativamente a una señal de expresión que no está asociada de manera nativa con dicha secuencia genética en dicho organismo.

- 5 Opcionalmente, al menos una copia de una secuencia genética que codifica una pinosilvina sintasa está enlazada operativamente a una señal de expresión que no está asociada de manera nativa con dicha secuencia genética en dicho organismo.

10 En ciertos aspectos la invención provee un microorganismo genéticamente modificado de la clase descrita, que tiene una ruta metabólica operativa en la cual un primer metabolito es transformado en un segundo metabolito en una reacción catalizada por una primera enzima, produciendo dicha etapa de reacción amoníaco, y en la cual dicho segundo metabolito es transformado en un tercer metabolito en una reacción catalizada por una segunda enzima en la cual ATP y CoA son un sustrato, y ADP es un producto, y en la cual dicho tercer metabolito es transformado en un cuarto metabolito en una reacción catalizada por una tercera enzima en la cual la malonil-CoA endógena es un sustrato.

15 Los microorganismos descritos más arriba incluyen algunos que contienen una o más copias de una secuencia de ADN heteróloga que codifica fenilalanina amoníaco liasa asociado operativamente con una señal de expresión, y que contiene una o más copias de una secuencia de ADN heteróloga que codifica 4-cumarato-CoA-ligasa o cinamato-CoA ligasa operativamente asociada con una señal de expresión, y que contiene una o más copias de una secuencia de ADN heteróloga que codifica una estilbeno sintasa, la cual puede ser resveratrol sintasa, asociada operativamente con una señal de expresión.

20 Alternativamente, los microorganismos descritos anteriormente incluyen algunos que contienen una o más copias de una secuencia de ADN heteróloga que codifica fenilalanina amoníaco liasa asociado operativamente con una señal de expresión, y que contienen una o más copias de una secuencia de ADN heteróloga que codifica 4-cumarato-CoA-ligasa o cinamato-CoA ligasa asociado operativamente con una señal de expresión, y que contiene una o más copias de una secuencia de ADN heteróloga que codifica pinosilvina sintasa asociada operativamente con una señal de expresión.

En el presente contexto el término "microorganismo" se relaciona con organismos microscópicos, incluyendo bacterias, hongos microscópicos incluyendo levaduras.

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

40 Con respecto a bacterias se da como sigue una lista no exhaustiva de bacterias adecuadas: una especie perteneciente al género *Bacillus*, una especie perteneciente al género *Escherichia*, una especie que pertenece al género *Lactobacillus*, una especie que pertenece al género *Lactococcus*, una especie que pertenece al género *Corynebacterium*, una especie que pertenece al género *Acetobacter*, una especie que pertenece al género *Acinetobacter*, una especie que pertenece al género *Pseudomonas*, etc.

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

45 El microorganismo construido y modificado puede ser cultivado utilizando procedimientos comúnmente conocidos, incluyendo cultivos quimiostáticos, por lotes, por lotes con alimentación, etc.

50 Así, la invención incluye un método para producir pinosilvina que comprende poner en contacto una célula de microorganismo genéticamente modificada de la invención con un sustrato de carbono en la ausencia sustancial de una fuente externa de ácido cinámico, teniendo dicha célula la capacidad de producir pinosilvina bajo las condiciones en las cuales el microorganismo puede ser seleccionado del grupo consistente de hongos y bacterias, especialmente levaduras.

La pinosilvina así producida puede ser aislada o purificada opcionalmente y los métodos adecuados incluyen extracción por solventes con n-hexano, seguida por extracción secuencial con éter, acetona, metanol y agua al

100%, y purificación cromatográfica sobre una columna de sílica gel utilizando un sistema n-hexano/acetato de etilo (2/1) (Suga et al. 1993).

Dicho sustrato de carbono es seleccionado opcionalmente del grupo de sustratos de carbono fermentables, consistentes de monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos, por ejemplo, glucosa, fructosa, galactosa, xilosa, arabinosa, manosa, sacarosa, lactosa, eritrosa, treosa y/o ribosa. Dicho sustrato de carbono puede ser seleccionado adicional o alternativamente del grupo de sustratos de carbono no fermentables que incluyen etanol, acetato, glicerol y/o lactato. Dicho sustrato de carbono no fermentable puede ser seleccionado adicional o alternativamente del grupo de aminoácidos y puede ser fenilalanina.

En un aspecto alternativo, la invención incluye un método para producir pinosilvina a través de la expresión heteróloga de secuencias de nucleótidos que codifican fenilalanina amoníaco liasa, 4-cumarato-CoA ligasa y resveratrol sintasa y también un método para producir pinosilvina a través de la expresión heteróloga de secuencias de nucleótidos que codifican fenilalanina amoníaco liasa, 4-cumarato-CoA ligasa y pinosilvina sintasa.

La pinosilvina, incluyendo la pinosilvina así producida, puede ser utilizada como nutracéutico en un producto alimenticio, por ejemplo, en un producto lácteo o una bebida tal como cerveza o vino.

La invención incluye adicionalmente una composición de microorganismos que comprenden células de microorganismos y al menos 1.5 mg/g de pinosilvina sobre una base de peso seco. Por ejemplo, la levadura o levadura que contiene preparaciones derivadas de levadura que contienen pinosilvina, o la pinosilvina así producida, pueden ser provistas para consumo humano o animal, por ejemplo, en forma seca, de manera adecuada como formas de dosificación orales unitarias tales como tabletas o cápsulas que contienen levadura, las cuales pueden contener por ejemplo al menos 0.5 g de dicha levadura, por ejemplo 1-3 g.

Cualquier enzima tipo silvestre citada aquí puede ser sustituida por una forma mutante de la misma, que tenga de manera adecuada una homología de aminoácidos con respecto a la enzima tipo silvestre citada de al menos 50%, más preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 90%, a al menos 95%, mientras que desde luego se mantiene la actividad enzimática requerida del tipo silvestre. Esto puede incluir el mantenimiento de cualquier preferencia por sustratos del tipo silvestre por ejemplo, por fenilalanina frente a tirosina o por ácido cinámico frente a ácido cumárico o por cinamoil-CoA frente a cumaroil-CoA. Cualquier secuencia de codificación tipo silvestre que codifica una enzima citada aquí puede ser sustituida con una secuencia que codifica para la misma enzima pero en la cual se ajusta el uso del codón. Esto se aplica tanto a enzimas tipo silvestre mencionadas aquí como a formas mutantes tal como se discutió más arriba. Las secuencias de nucleótido que codifican para formas mutantes de enzimas tipo silvestre son preferiblemente homólogas con la secuencia de nucleótidos tipo silvestre de la enzima tipo silvestre correspondiente hasta un grado de al menos 50%, más preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 90%, a al menos 95%.

Las formas mutantes de las enzimas pueden tener un nivel de actividad enzimática fundamentalmente sin cambios con respecto al de la enzima tipo silvestre o puede seleccionarse para tener un nivel más alto de actividad. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos de la enzima tipo silvestre pueden hacerse de acuerdo con la práctica conocida. Pueden desarrollarse enzimas que tengan actividad mejorada por técnicas de evolución dirigida como las conocidas en el arte, cambios aleatorios en la enzima que está siendo producida por métodos tales como la introducción de cambios genéticos aleatorios en la codificación para la enzima en un organismo de prueba adecuado tal como *E. coli* o *S. cerevisiae* seguidas por expresión y selección de mutantes mejorados cribando la propiedad deseada, o imponiendo condiciones de autoselección bajo las cuales los organismos que expresan una actividad mejorada tendrán una ventaja de supervivencia.

Referencias que se hagan aquí a la ausencia o ausencia sustancial o carencia de suministro de una sustancia, por ejemplo de ácido cinámico, incluyen la ausencia sustancial de derivados del mismo tales como ésteres del ácido cinámico (incluyendo tioésteres), por ejemplo, cinamoil-CoA, el cual puede ser metabolizado a la sustancia o que son productos inmediatos de metabolismo posterior de la sustancia. En particular, la carencia de ácido cinámico implica la carencia de cinamoil-CoA.

La pinosilvina producida de acuerdo con la invención puede ser cis-pinosilvina o trans-pinosilvina, cuya formación se espera a partir de ácido cis-cinámico y ácido trans-cinámico respectivamente. Adicionalmente, la cis-pinosilvina puede formarse a partir de ácido trans-cinámico por un proceso que incluye isomerización. Pero se esperará que normalmente predomine la forma trans.

Breve descripción de los dibujos

Para asistir en el fácil entendimiento de la anterior descripción de la invención se ha hecho referencia a los dibujos acompañantes en los cuales:

La figura 1 muestra la estructura química de la pinosilvina:

La figura 2 muestra la ruta fenilpropanoide que utiliza la resveratrol sintasa que actúa sobre el cumaroil-CoA, llevando al resveratrol; y

5 La figura 3 muestra la ruta fenilpropanoide que utiliza pinosilvina sintasa o resveratrol sintasa que actúan sobre cinamoil-CoA, llevando a pinosilvina.

La figura 4 muestra los cromatogramas de HPLC del sobrenadante y el extracto celular de cepas de *S. cerevisiae* FSSC-PAL4CLVST1 cultivadas sobre 100 g/l de galactosa. Se incluye un cromatograma de 60 nanogramos de pinosilvina pura.

10 La figura 5 muestra los cromatogramas de HPLC de un extracto celular de una cepa de *S. cerevisiae* FSSC-PAL4CLRES, cultivada sobre 100 g/l de galactosa. Se incluye un cromatograma de 60 nanogramos de pinosilvina pura.

La figura 6 muestra los datos de LC-MS para pinosilvina pura y pinosilvina producida por la cepa de *S. cerevisiae* FSSC-PAL4CLRES, cultivada sobre 100 g/l de galactosa. Se muestran ambos cromatogramas de pico base y trazas de iones negativos en M/Z211.0759 Da/e.

15 La figura 7 muestra cromatogramas de HPLC obtenidos en el Ejemplo 16.

La figura 8 muestra el análisis de HPLC de un producto extraído de la fermentación de una cepa productora de pinosilvina de *E. coli* (panel superior) y una cepa de control (panel inferior).

La invención será descrita e ilustrada adicionalmente por los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo

20 Ejemplo 1

Aislamiento de genes que codifican PAL, 4CL, RES y VST1

25 Se aislaron fenilalanina amoníaco liasa (PAL2) (Cochrane et al., 2004; SEQ ID NO: 1, 2), 4-cumarato:Coenzima A ligasa (4CL1) (Hamberger and Hahlbrock 2004; Ehltng et al., 1999; SEQ ID NO: 3, 4) a través de PCR a partir de ADNc de *A. thaliana* (BioCat, Heidelberg, Alemania) utilizando los cebadores de la Tabla 1. Se escogieron PAL2 y 4CL1 entre varios homólogos de *A. thaliana* debido a los parámetros cinéticos favorables hacia el ácido cinámico y cinamoil-CoA, respectivamente (Cochrane et al., 2004; Hamberger and Hahlbrock 2004; Ehltng et al., 1999).

30 La secuencia de codificación de la resveratrol sintasa (RES) de ruibarbo, *Rheum tataricum* (Samappito et al., 2003; SEQ ID NO: 5, 6) fue optimizada por codón para la expresión de *S. cerevisiae* utilizando la herramienta de retrotraducción en servicio en línea en www.entelechon.com, produciendo la secuencia SEQ ID NO: 7, 8. Se construyeron oligos para el ensamblaje genético sintético en MWG Biotech y el gen sintético fue ensamblado por PCR utilizando un protocolo de método modificado ligeramente con respecto al de Martin et al. (2003) descrito más adelante.

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

Cebador para amplificación de gen (Los sitios de restricción están subrayados)	Gen	Sitio restricción: cebador	Sitio restricción: vector
5'-CGGAATTCTCATGGATCAAATCGAAGCAATGTT	PAL2	EcoR1	EcoR1
5'-CGACTAGTTTGTAGCAAATCGGAATCGGAGC	PAL2	Spe1	Spe1
5'-GCTCTAGACCT ATGGCGCCACAAGAACAAGCAGTTT	4CL1	Xba1	Spe1
5'-GCGGATCCCCT TCACAATCCATTTGCTAGTTT TGCC	4CL1	BamH1	BglII

5'-CC <u>GGATCC</u> AAATGGCCCCAGAAGAGAGCAGG	RES	BamH1	BamH1
5'-CG <u>CTCGAG</u> TTAAGTGATCAATGGAACCGAAGACAG	RES	Xho1	Xho1

* SEQ ID Nos 11-16

5 Los cebadores de MWG para el ensamblaje del gen sintético fueron disueltos en agua milliQ a una concentración de 100 pmol/μl. Se combinó una alícuota de 5 μl de cada cebador en un totalmix y luego se diluyó 10 veces con agua milliQ. El gen fue ensamblado a través de PCR utilizando 5 μl de totalmix diluido por 50 μl como patrón para ADN polimerasa de fusión (Finnzymes). El programa de PCR fue como sigue: Inicial 98°C durante 30 segundos y luego 30 ciclos con 98°C durante 10 segundos, 40°C durante 1 minuto y 72°C a 1 minuto/1000 pares de bases y un final de 72°C durante 5 minutos. A partir de la reacción de PCR resultante, se purificaron 20 μl sobre gel de agarosa al 1%.

10 El resultado fue una mancha de PCR y las regiones alrededor del tamaño deseado fueron cortadas del gel de agarosa y purificados utilizando el QiaQuick Gel Extraction Kit (Quiagen). Un PCR final con los cebadores externos en la Tabla 1 produjo el gen RES requerido. Las mutaciones puntuales fueron corregidas utilizando el kit de mutagénesis II dirigida al sitio Quickchange (Stratagene, La Jolla, CA).

15 El gen VST1 que codifica resveratrol sintasa de *Vitis vinifera* (viña) (Hain et al., 1993) fue sintetizado por GenScript Corporation (Piscataway, NJ). La secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 10) fue utilizada como plantilla para generar el codón de gen sintético optimizado para expresión en *S.cerevisiae* (SEQ ID NO: 9). El gen VST1 sintético fue suministrado insertado en el vector pUC57 de *E. coli* flanqueado por sitios de restricción BamH1 y Xho1. El gen sintético fue purificado a partir del vector pUC57 mediante restricción con BamH1/Xho1 y purificado a partir de gel de agarosa utilizando el QiaQuick Gel Extraction Kit (Quiagen).

20 Ejemplo 2

Construcción de un vector de levadura para expresión de PAL2

El gen que codifica PAL2, aislado y descrito en el Ejemplo 1, fue reamplificado por PCR utilizando cebadores de avance y retroceso, con sobrantes en 5' que contenían sitios de restricción EcoR1 y Spe1 (Tabla 1). El producto de PCR de PAL2 amplificado fue digerido con EcoR1/Spe1 y ligado en un vector pESC-URA digerido con EcoR1/Spe1

25 (Stratagene), dando como resultado el vector pESC-URA-PAL2. La secuencia del gen fue verificada por secuenciación de dos clones diferentes.

Ejemplo 3

Construcción de un vector de levadura para expresión de 4CL1

El gen que codifica 4CL1 fue aislado como se describió en el Ejemplo 1. El producto de PCR 4CL1 amplificado fue digerido con Xba1/BamH1 y ligado a un vector pESC-TRP digerido con Spe1/BglII (Stratagene), dando como resultado el vector pESC-TRP-4CL1. Se secuenciaron dos clones diferentes de pESC-TRP-4CL1 para verificar la secuencia del gen clonado.

30

Ejemplo 4

Construcción de un vector de levadura para expresión de 4CL1 y RES

35 El gen que codifica RES fue aislado como se describió en el ejemplo 1. El gen RES sintético amplificado fue digerido con BamH1/Xho1 y ligado en pESC-TRP-4CL1 digerido con BamH1/Xho1 (Ejemplo 3). El plásmido resultante, pESC-TRP-4CL1-RES, contenía los genes que codifican 4CL1 y RES bajo el control del promotor divergente GAL1/GAL10. La secuencia del gen que codifica VST1 fue verificada por secuenciación de dos clones diferentes de pESC-TRP-4CL1-VST1.

40 Ejemplo 5

Construcción de un vector de levadura para expresión de 4CL1 y VST1

El gen que codifica VST1 fue aislado como se describió en el ejemplo 1. El gen VST1 purificado y digerido fue ligado en pESC-TRP-4CL1 digerido con BamH1/Xho1 (Ejemplo 3). El plásmido resultante, pESC-TRP-4CL1-VST1,

contenía los genes que codifican 4CL1 y VST1 bajo el control del promotor divergente GAL1/GAL10. La secuencia del gen que codifica VST1 fue verificada por secuenciación de dos clones diferentes de pESC-TRP-4CL1-VST1.

Ejemplo 6

Expresión de la ruta a pinosilvina en la levadura *S.cerevisiae* utilizando PAL2, 4CL1 y RES

- 5 Las cepas de levadura que contenían los marcadores genéticos apropiados fueron transformadas con los vectores descritos en los Ejemplos 2, 3 y 4, separadamente o en combinación. La transformación de la célula de levadura fue llevada a cabo de acuerdo con métodos conocidos en el arte, por ejemplo, utilizando células competentes o por electroporación (véase, por ejemplo, Sambrook et al., 1989). Los transformantes fueron seleccionados sobre medio que carecía de uracilo y/o triptófano y purificadas por extensión sobre el mismo medio.
- 10 Una cepa de *S. cerevisiae* FS01267 (MATa trp1 ura3) fue cotransformada con pESC-URA-PAL2 (Ejemplo 2) y pESC-TRP-4CL1-RES (Ejemplo 4), y la cepa transformada fue denominada FSSC-PAL24CL1RES.

Ejemplo 7

Expresión de la ruta a pinosilvina en la levadura *S.cerevisiae* utilizando PAL2, 4CL1 y VST1

- 15 Las cepas de levadura que contenían los marcadores genéticos apropiados fueron transformadas con los vectores descritos en los Ejemplos 2, 3 y 5, separadamente o en combinación. La transformación de la célula de levadura fue llevada a cabo de acuerdo con métodos conocidos en el arte, por ejemplo, utilizando células competentes o por electroporación (véase, por ejemplo, Sambrook et al., 1989). Los transformantes fueron seleccionados sobre medio que carecía de uracilo y/o triptófano y purificadas por extensión sobre el mismo medio.
- 20 La cepa *S.cerevisiae* FS01267 (MATa trp1 ura3) fue cotransformada con pESC-URA-PAL2 (Ejemplo 2) y pESC-TRP-4CL1-VST1 (Ejemplo 5), y la cepa transformada fue denominada FSSC-PAL24CL1VST1.

Ejemplo 8

Fermentación con cepas de levadura recombinantes en matraces con agitación

- 25 Las cepas de levadura recombinantes fueron inoculadas desde placas de agar con un asa de inoculación estéril y cultivadas en 100 ml de medio mineral definido (Verduyn et al., 1992) que contenía vitaminas, elementos traza, 5 g/l de glucosa, 95 g/l de galactosa. Los frascos en agitación tapados de 500 ml fueron incubados durante 3 días a 30°C y 160 rpm.

Ejemplo 9

a) Extracción de pinosilvina

- 30 Las células fueron recolectadas por centrifugación, a 5000 g durante 5 minutos. Se extrajo una alícuota de 50 ml de sobrenadante una vez con 20 ml de acetato de etilo. El acetato de etilo fue liofilizado y el producto fue redisoluto en 0.7 ml de metanol y filtrado en viales de HPLC.
- 35 La pella de células de 100 ml de medio fue disuelta en 2 ml de agua y dividida en 3 tubos de preparación rápida y desecha con perlas de vidrio. Los extractos crudos de los tres tubos fueron reunidos en 10 ml de metanol al 100% en un tubo sartorius de 50 ml y extraído sobre una cámara rotatoria durante 48 horas en un ambiente frío y oscuro a 4°C. Después de 48 horas los residuos celulares fueron eliminados a través de centrifugación durante 5 minutos, a 5000 g y el metanol fue eliminado por liofilización durante la noche. El residuo seco fue redisoluto en 0.7 ml de metanol y filtrado a viales de HPLC.

b) Análisis de pinosilvina

HPLC

- 40 Para el análisis cuantitativo de ácido cinámico, ácido cumárico y pinosilvina, las muestras fueron sometidas a separación por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) en un sistema Agilent Series 1100 (Hewlett Packard) antes de la detección por arreglo de diodos en uv a $\lambda=306$ nm. Se utilizó una columna Phenomenex (Torrance, CA, Estados Unidos) Luna 3 micrometer C18 (100 X 2.00 mm) a 40°C. Como fase móvil se utilizó un gradiente de acetonitrilo y agua milliQ (conteniendo ambos 50 ppm de ácido trifluoroacético) a un flujo de 0.4 ml/min.
- 45 El perfil de gradiente fue lineal desde 15 % de acetonitrilo a 100 % de acetonitrilo durante 20 minutos. El tiempo de

elución fue de aproximadamente 8.8-8.9 minutos para la trans-pinosilvina. El estándar puro de pinosilvina (> 95% puro) fue adquirido en ArboNova (Turku, Finlandia).

LC-MS

Las muestras y los estándares fueron analizados por LC-MS por electroaspersión negativa sobre un espectrómetro de masas con tiempo de vuelo Waters (Micromass, Manchester, Reino Unido) LCT™ con una sonda de referencia Lockspray™ acoplada a un sistema Agilent 1100 HPLC (Agilent Technologies Walbron, Alemania). Las separaciones se hicieron sobre una columna de 50 mm x 2 mm ID Luna C-18 (II) (Phenomenex, Estados Unidos) acoplada con una precolumna de 4 mm x 2 mm ID SecurityGuard™ (Phenomenex, Estados Unidos) utilizando un gradiente de agua-acetonitrilo a 0.3 ml/minuto. Ambos eluyentes contenían ácido fórmico 20 mM. La composición de solventes fue cambiada de 15% de acetonitrilo en la inyección a 100% de acetonitrilo a lo largo de 20 minutos, el cual fue mantenido durante 5 minutos antes de que el gradiente fuera regresado a las condiciones de partida. Se inyectó una muestra de 3 µl en todos los casos y la columna fue mantenida a 40°C. Todos los productos químicos eran de grado HPLC y estaban disueltos en agua Milli-Q™. Los espectros UV fueron tomados a 200-700 nm a 2 espectros por segundo con una resolución de 4 nm. El espectrómetro de masas fue sintonizado para sensibilidad máxima en modo de electroaspersión negativa hasta una resolución mejor de 5500 FWH sobre una solución de leucina encefalina (0.5 µg/ml en acetonitrilo al 50% con 0.5% de ácido fórmico). Dicha solución fue citada también como referencia de masa en el Lockspray™ en ESI negativo a 15 µl/minuto. El instrumento fue calibrado utilizando un ESI negativo sobre una mezcla carboxilada-PEG en acetonitrilo al 50%. En ambos casos la calibración tuvo un error residual menor de 2 mDa en al menos 25 iones de calibración. Las condiciones de análisis fueron seleccionadas para una fragmentación en fuente mínima.

Los espectros de masas fueron recolectados de 100 a 900 Da/e a una tasa de 0.4 segundos por espectro con tiempo de interbarrido de 0.1 segundos. Se recolectó un espectro de referencia de la sonda Lockmass™ cada 3^{er} segundo y se promediaron 10 espectros de referencia para la corrección interna de masa.

Las trazas de ión estrechas fueron extraídas utilizando +/- 25 mDa alrededor de la masa protonada o desprotonada de los metabolitos esperados.

Resultados

Las cepas FSSC-PAL24CL1RES y FSSC-PAL24CL1VST1, fueron cultivadas en 100 g/l de galactosa como se describe en el Ejemplo 8, y analizadas en cuanto a su contenido de pinosilvina. Adicionalmente, se incluyó una cepa de control FSSC-control que contenía los vectores vacíos solamente. El análisis por HPLC mostró que las cepas FSSC-PAL24CL1VST1 y FSSC-PAL24CL1RES contenían un componente con un tiempo de retención de 8.8-9.0 minutos que era idéntico a la trans-pinosilvina (figuras 4 y 5). Dicho resultado fue confirmado por el análisis de LC-MS que rebela la presencia de un componente en el sobrenadante de la cepa FSSC-PAL24CL1VST1 con un tiempo de retención de 8.2 minutos, que tenía un M/Z de 211.0579 Da/e ± 25 mDa que correspondía en efecto a la M/Z de la pinosilvina pura en modo de ion negativo (figura 6). Además los espectros de absorción UV fueron similares al espectro de absorción de la trans-pinosilvina pura (no mostrada) también, con una λ_{max} de aproximadamente 306 nm.

Los resultados, por lo tanto, demostraron la presencia de una ruta fenilpropanoide activa en *S. cerevisiae* que lleva a la producción *in vivo* de trans-pinosilvina. La producción de pinosilvina puede ser mejorada lo más probablemente cultivando las cepas bajo condiciones de cultivo bien definidas en cultivos en lotes y continuos y/o optimizando la expresión/actividades de las enzimas individuales.

Ejemplo 10

a) Construcción de un vector bacteriano para expresión de PAL2 en *Escherichia coli*

Los plásmidos que fueron utilizados en los siguientes ejemplos contenían uno o más genes marcadores para permitir que el microorganismo que los alojara fueran seleccionados entre aquellos que no. El sistema de selección se basa en marcadores dominantes, por ejemplo, resistencia contra ampicilina y kanamicina. Además, los plásmidos contenían secuencias promotoras de terminación que permitían la expresión de los genes recombinantes. Además, los plásmidos contenían sitios de restricción únicos adecuados para facilitar la clonación de los fragmentos de ADN y la subsecuente identificación de los recombinantes. En este ejemplo los plásmidos contenían tanto el gen de resistencia a ampicilina, designado como pET16b (Novagen), o el gen de resistencia a kanamicina, designado como pET26b (Novagen).

El gen que codifica PAL2, aislado como se describió en el Ejemplo 1, fue reamplificado por PCR a partir del plásmido pESC-URA-PAL2 (Ejemplo 2), utilizando cebadores de avance y retroceso, con sobrantes en 5' que contenían sitios de restricción adecuados. La introducción de dichos sitios de restricción en los extremos 5' y 3' en el

gen permitieron la ligación del producto de PCR restringido en un vector pET16b digerido que contenía el promotor T7. El plásmido resultante, pET16b-PAL2, contenía el gen que codifica PAL2 bajo el control del promotor T7.

b) Construcción de un vector bacteriano para la expresión de 4CL1 y VST1 en *Escherichia coli*

5 El gen que codifica 4CL1, aislado como se describió en el Ejemplo 1, fue reamplificado por PCR a partir del plásmido pESC-URA-4CL1-VST1 (Ejemplo 5), utilizando cebadores de avance y retroceso, con sobranes en 5' que contenían sitios de restricción adecuados. La introducción de dichos sitios de restricción en los extremos 5' y 3' del gen permitió la ligación del producto de PCR restringido en un vector pET26B digerido. El plásmido resultante, pET26B-4CL1, contenía el gen que codifica para 4CL1 bajo el control del promotor T7 de *Lactobacillus lactis*.

10 El gen que codifica VST1, aislado como se describió en el Ejemplo 1, fue reamplificado por PCR a partir del plásmido pESC-URA-4CL1-VST1 (Ejemplo 5) utilizando cebadores de avance y retroceso, con sobranes en 5' que contenían sitios de restricción adecuados. La introducción de dichos sitios de restricción en los extremos 5' y 3' del gen permitieron la ligación del producto de PCR restringido en un vector pET16B digerido. El plásmido resultante, pET16B-VST1, contenían el gen que codifica VST1 bajo el control del promotor T7. El promotor T7 y el gen que codifica VST1 fueron reamplificados como un fragmento por PCR a partir del plásmido pET16B-VST1 usando
15 cebadores de avance y retroceso, con sobranes en 5' que contenían sitios de restricción adecuados. La introducción de dichos sitios de restricción en los extremos 5' y 3' del fragmento de ADN permitió la ligación del producto de PCR restringido en el plásmido digerido pET26B-4CL1. El plásmido resultante, pET26B-4CL1-VST1, contenía los genes que codifican 4CL1 y VST1, bajo el control de su promotor T7 individual. La secuencia de los genes que codifican 4CL1 y VST1 fue verificada secuenciando los dos clones diferentes de pET26B-4CL1-VST1.

20 c) Expresión de la ruta a pinosilvina en *Escherichia coli*

Las cepas de *Escherichia coli* fueron transformadas con los vectores descritos en (a) y (b), separadamente o en combinación. La transformación de la célula bacteriana fue llevada a cabo de acuerdo con métodos conocidos en el arte utilizando células competentes, siendo una alternativa, por ejemplo, la electroporación (véase, por ejemplo
25 Sambrook *et al.*, 1989). Los transformantes fueron seleccionados sobre un medio que contenía los antibióticos ampicilina y kanamicina y purificados por extensión en el mismo medio.

La cepa de *Escherichia coli* BL21 (DE3) fue transformada separadamente con el vector pET16B-PAL2 (a), produciendo la cepa FSEC-PAL2; y con pET26B-4CL1-VST1 (b), produciendo la cepa FSEC-4CL1VST1. Además, la cepa de *Escherichia coli* BL21 (DE3) fue cotransformada con pET16B-PAL2 (a) y pET26B-4CL1-VST1 (n), y la cepa transformada fue denominada FSEC-PAL24CL1VST1.

30 d) Fermentación con cepas recombinantes de *Escherichia coli* en fermentadores

Las cepas de levadura recombinantes pueden ser cultivadas en fermentadores operados como cultivos en lote, alimentación por lotes o quimiostáticos. En este caso la fermentación se realizó en matraces con agitación.

Los precultivos de *Escherichia coli* BL21 (DE3) fueron cultivados en tubos de vidrio a 160 rpm y 37°C en 7 ml de medio LB que contenía 100 µg/ml de ampicilina y 60 µg/ml de kanamicina. Se utilizaron los precultivos que crecían
35 exponencialmente para la inoculación de 500 ml de matraces con agitación regulados que contenían 200 ml de medio LB suplementado con 50 g/l de glucosa, 5 g/l de K₂HPO₄, 80 µg/ml de ampicilina y 50 µg/ml de kanamicina, los cuales fueron incubados a 160 rpm y 37°C. Después de 5 horas, se agregó β-tiogalactopiranosido de isopropilo (IPTG) a una concentración final de 1 mM, como inductor del promotor T7 que está al frente de cada uno de los 3 genes PAL2, 4CL1 y VST1. Después de un período de incubación de 48 horas a 37°C, las células fueron
40 recolectadas y sometidas a procedimientos de extracción y analizadas en cuanto a la presencia de pinosilvina producida.

e) Extracción y análisis de pinosilvina en *Escherichia coli*

La extracción y el análisis fueron llevados a cabo utilizando los métodos como se describieron en el Ejemplo 9. Los resultados de HPLC llevados a cabo sobre los materiales extraídos de la fermentación utilizando la cepa modificada
45 descrita y una cepa de control que contenía plásmidos vacíos se muestran en la figura 9, paneles superior e inferior respectivamente. La producción de pinosilvina y ácido cinámico está marcada en la figura.

Ejemplo 11

a) Construcción de un vector bacteriano para la expresión de PAL2 en *Lactococcus lactis*

50 El plásmido PSH71 y derivados del mismo, que se utiliza en los siguientes ejemplos, es un vector lanzadera bifuncional con múltiples orígenes de replicación a partir de *Escherichia coli* y *Lactococcus lactis*. Con esto, la

especificidad del rango de huéspedes pasa por *Escherichia coli* y otras especies de bacterias del ácido láctico. Aunque las transformaciones en *Lactococcus lactis* usualmente avanzan con problemas, las transformaciones putativas difíciles en otras especies de bacterias del ácido láctico pueden, por lo tanto, ser superadas utilizando *Escherichia coli* como un huésped intermediario para la construcción de plásmidos recombinantes. El plásmido contiene uno o más genes marcadores para permitir que el microorganismo los aloje para ser seleccionados de aquellos que no lo son. El sistema de selección que se utiliza para *Lactococcus lactis* se basa en marcadores dominantes, por ejemplo, resistencia contra eritromicina y cloranfenicol, pero también se han descrito sistemas basados en genes involucrados en el metabolismo de los carbohidratos, peptidasas y marcadores grado alimenticio. Además, el plásmido contiene secuencias promotoras y terminadoras que permiten la expresión de los genes recombinantes. Los promotores adecuados son tomados de genes de *Lactococcus lactis*, por ejemplo *lacA*. Adicionalmente, el plásmido contiene sitios de restricción únicos adecuados para facilitar la clonación de los fragmentos de ADN y la identificación subsecuente de los recombinantes.

En los procedimientos más adelante el plásmido contiene bien sea el gen de resistencia a la eritromicina, designado como pSH71-ERY^r, o el gen de resistencia al cloramfenicol, designado con pSH71-CM^r.

El gen que codifica PAL2, aislado como se describió en el Ejemplo 1, es reamplificado por PCR a partir del plásmido pESC-URA-PAL2 (Ejemplo 2), utilizando cebadores de avance y retroceso, con sobrantes en 5' que contienen sitios de restricción adecuados. La introducción de dichos sitios de restricción en los extremos 5' y 3' del gen permite la ligación del producto de PCR restringido en un vector pSH71-ERY^r digerido que contiene el promotor *lacA* de *Lactococcus lactis*. El plásmido resultante, pSH71-ERY^r-PAL2, contiene el gen que codifica PAL2 bajo el control del promotor *lacA* de *Lactococcus lactis*. La secuencia del gen que codifica PAL2 es verificada por secuenciación de dos clones diferentes de pSH71-ERY^r-PAL2.

b) Construcción de un vector bacteriano para la expresión de 4CL1 y VST1 en *Lactococcus lactis*

El gen que codifica 4CL1, aislado como se describió en el Ejemplo 1, es reamplificado por PCR a partir del plásmido pESC-TRP-4CL1-VST1 (Ejemplo 5), utilizando cebadores de avance y retroceso, con sobrantes en 5' que contienen sitios de restricción adecuados. La introducción de dichos sitios de restricción en los extremos 5' y 3' del gen permite la ligación de los productos de PCR restringidos en un vector pSH71-CM^r digerido. El plásmido resultante, pSH71-CM^r-4CL1, contiene el gen que codifica para 4CL1 bajo el control del promotor *lacA* de *Lactobacillus lactis*. El gen que codifica VST1, aislado como se describió en el Ejemplo 1, es reamplificado por PCR a partir del plásmido pESC-TRP-4CL1-VST1 (Ejemplo 5) utilizando cebadores de avance y retroceso, con sobrantes en 5' que contienen sitios de restricción adecuados. La introducción de dichos sitios de restricción en los extremos 5' y 3' del gen permite la ligación del producto de PCR restringido en un vector pSH71-ERY^r digerido. El plásmido resultante, pSH71-ERY^r-VST1, contiene el gen que codifica VST1 bajo el control del promotor *lacA* de *Lactococcus lactis*. El promotor *lacA* y el gen que codifica VST1 son reamplificados como un fragmento por PCR a partir del plásmido pSH71-ERY^r-VST1 utilizando cebadores de avance y retroceso, con sobrantes en 5' que contienen sitios de restricción adecuados. La introducción de dichos sitios de restricción en los extremos 5' y 3' del fragmento de ADN permite la ligación del producto de PCR restringido en el plásmido digerido pSH71-CM^r-4CL1. El plásmido resultante, pSH71-CM^r-4CL1-VST1, contiene los genes que codifican 4CL1 y VST1 que están cada uno bajo el control de su promotor individual *lacA*. La secuencia de los genes que codifican 4CL1 y VST1 es verificada por secuenciación de dos clones diferentes de pSH71-CM^r-4CL1-VST1.

c) Expresión de la ruta a pinosilvina en *Lactococcus lactis*

Las cepas de *Lactococcus lactis* son transformadas con los vectores descritos en los Ejemplos 16 y 17, separadamente o en combinación. La transformación de la célula bacteriana se lleva a cabo de acuerdo con métodos conocidos en el arte, por ejemplo, utilizando células competentes o por electroporación (véase, por ejemplo Sambrook *et al.*, 1989). Los transformantes son seleccionados sobre un medio que contiene los antibióticos eritromicina y cloranfenicol y purificados por extensión en el mismo medio.

La cepa de *Lactococcus lactis* MG1363 es transformada separadamente con el vector pSH71-ERY^r-PAL2 (Ejemplo 16), produciendo la cepa FSLL-PAL2. Además, la cepa de *Lactococcus lactis* MG1363 es cotransformada con pSH71-ERY^r-PAL2 (Ejemplo 16) y pSH71-CM^r-4CL1-VST1 (Ejemplo 17), y la cepa transformada es denominada FSLL-PAL24CL1VST1.

d) Fermentación con cepas de *Lactococcus lactis* recombinantes en fermentadores

Las cepas recombinantes de *Lactococcus* pueden ser cultivadas en fermentadores operados como cultivos por lotes, de alimentación por lote o quimiostáticos.

Cultivos por lotes y por alimentación en lotes

El microorganismo es cultivado en un biorreactor regulado con un volumen de trabajo de 1.4 litros bajo condiciones anaerobias, aerobias o microaerobias. Todos los cultivos son incubados a 30°C, a 350 rpm. Se mantiene un pH constante de 6.6 mediante la adición automática de KOH 10 M. las células son cultivadas sobre lactosa en un medio MS10 definido suplementado con los siguientes componentes para permitir el crecimiento bajo condiciones aerobias:

5 MnSO₄ (1.25 x 10⁻⁵ g/l), tiamina (1 mg/l), y ácido DL-6, 8-tióctico (2.5 mg/l). La concentración es, por ejemplo 50 g/l. Los biorreactores fueron inoculados con células de precultivos cultivados a 30°C en matraces con agitación sobre el medio descrito más arriba regulado con concentraciones tres veces más altas de K₂HPO₄ y KH₂PO₄. Las condiciones anaerobias se aseguran purgando el medio con N₂ (99.998% de pureza) antes de la inoculación y

10 manteniendo un flujo constante de 50 ml/minuto de N₂ a través del espacio de cabeza del biorreactor durante el cultivo. Los biorreactores utilizados para cultivo microaerobio aerobio están equipados con sensores polarográficos de oxígeno que son calibrados con aire (DOT, 100%) y N₂ (DOT, 0%). Se obtienen condiciones aerobias purgando el reactor con aire a una reata de 1 vvm para asegurar que el DOT es más de 80%. Durante los experimentos microaerobios el DOT se mantiene constante a 5% purgando el reactor con un gas compuesto de una mezcla de N₂ y aire atmosférico, a una rata de 0.25 vvm.

15 Cultivos quimiostáticos

En los cultivos quimiostáticos las células pueden ser cultivadas, por ejemplo, en fermentadores de laboratorio Applikon con un volumen de trabajo de 1L a 30°C y 350 rpm. La rata de dilución (D) puede fijarse en diferentes valores, por ejemplo a 0.050 h⁻¹, 0.10 h⁻¹, 0.15 h⁻¹, o 0.20 h⁻¹. El pH se mantiene constante, por ejemplo a 6.6, mediante la adición automática de KOH 5 M, utilizando el medio de cultivo descrito más arriba, suplementado con

20 antiespumante (50 µl/l). La concentración de lactosa puede fijarse en diferentes valores, por ejemplo es 3.0 g/l 6.0 g/l, 12.0 g/l, 15.0 g/l o 18.0 g/l. El biorreactor es inoculado a una concentración de biomasa inicial de 1 mg /l y la bomba de alimentación se enciende al final de la fase de crecimiento exponencial.

Se obtiene un estado de equilibrio anaerobio introduciendo 50 ml/minuto de N₂ (99.998% de pureza) en el espacio de cabeza del biorreactor. Pueden obtenerse diferentes estados de equilibrio anóxicos purgando el reactor con 250

25 ml/minuto de gas compuesto de N₂ (99.998% de pureza) y aire atmosférico a diferentes proporciones. El electrodo de oxígeno es calibrado purgando el biorreactor con aire (100% DOT) y con N₂ (0% DOT).

Para todas las condiciones, el gas es filtrado hasta esterilidad antes de ser introducido en el biorreactor. El gas de salida es dirigido hacia un condensador enfriado a menos de -8°C y analizado en cuanto a su contenido volumétrico de CO₂ y O₂ por medio de un analizador acústico de gases.

30 Los cultivos se consideran en estado de equilibrio después de al menos 5 tiempos de residencia, y si las concentraciones de la biomasa y los productos finales de la fermentación permanecen sin cambios (menos de 5% de desviación relativa) durante los dos últimos tiempos de residencia.

e) Extracción y análisis de pinosilvina en *lactococcus lactis*

La extracción y el análisis se llevan a cabo utilizando los métodos como se describen en el Ejemplo 9

35 Ejemplo 12

a) Construcción de un vector fúngico para expresión de PAL2 en especies que pertenecen al genero *Aspergillus*

El plásmido que es utilizado en este ejemplo, es derivado de pARp1 que contiene la secuencia de replicación iniciadora AMA1 de *Aspergillus nidulans*, que también sostiene la replicación del plásmido autónomo en *A. niger* y *A. oryzae* (Gems et al., 1991). Además, el plásmido es un vector lanzadera, que contiene la secuencia de replicación

40 de *Escherichia coli*, y las transformaciones difíciles inherentes en *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae* pueden superarse por lo tanto utilizando *Escherichia coli* como huésped intermedio para la construcción de plásmidos recombinantes. El plásmido contiene uno o más genes marcadores para permitir que el microorganismo los aloje para ser seleccionados de aquellos que no. El sistema de selección puede basarse bien en marcadores dominantes por ejemplo marcadores de resistencia contra higromicina B, pleomicina y bleomicina o heterólogos, por ejemplo

45 aminoácidos y el gen *pyrG*. Además el plásmido contiene secuencias de promotor y terminador que permiten la expresión de los genes recombinantes. Los promotores adecuados son tomados de genes de *Aspergillus nidulans* e.g. *alcA*, *glaA*, *amy*, *niaD*, y *gpdA*. Adicionalmente, el plásmido contiene sitios de restricción únicos adecuados para facilitar la clonación de fragmentos de ADN y la subsecuente identificación de recombinantes.

El plásmido contiene el promotor constitutivo fuerte *gpdA* y marcadores auxotrópicos, originados todos de

50 *Aspergillus nidulans*; el plásmido que contiene el gen *methG* que está involucrado en la biosíntesis de metionina, se designa como pAMA1-MET; el plásmido que contiene el gen *hisA* que está involucrado en la biosíntesis de la histidina, está designado como pAMA1-HIS.

El gen que codifica para PAL2, aislado como se describe en el Ejemplo 1, es reamplificado por PCR a partir del plásmido pESC-URA-PAL2 (Ejemplo 2) utilizando cebadores de avance y retroceso, con sobrantes en 5' que contienen sitios de restricción adecuados. La introducción de dichos sitios de restricción en los 5' y 3' del gen permiten la ligación del producto de PCR restringido en un vector digerido pAMA1-MET. El plásmido resultante, pAMA1-MET-PAL2, contiene el gen que codifica para PAL2 para el control del promotor *gpdA* de *Aspergillus nidulans*. La secuencia del gen que codifica para PAL2 es verificada secuenciando los dos clones de pAMA1-MET-PAL2.

b) Construcción de un vector fúngico para expresión de 4CL1 y VST1 en especies que pertenecen al género *Aspergillus*.

El gen que codifica 4CL1, aislado como se describe en el Ejemplo 1, es reamplificado por PCR a partir del plásmido pESCTRP-4CL1-VST1 (Ejemplo 5), utilizando cebadores de avance y retroceso, con sobrantes en 5' que contienen sitios de restricción adecuados. La introducción de dichos sitios de restricción en los extremos 5' y 3' del gen permiten la ligación del producto de PSR restringido en un vector pAMA1-HIS digerido que contiene el promotor *gpdA* de *Aspergillus nidulans*. El plásmido resultante pAMA1-HIS-4CL1 contiene el gen que codifica 4CL1 bajo el control del promotor *gpdA* de *Aspergillus nidulans*. El gen que codifica VST1, aislado como se describe en Ejemplo 1, es reamplificado por PCR a partir del plásmido pESC-TRP-4CL1-VST1 (Ejemplo 5) utilizando cebadores de avance y retroceso, con sobrantes en 5' que contienen sitios de restricción adecuados. La introducción de dichos sitios de restricción en los extremos 5' y 3' del gen permiten la ligación del producto de PCR restringido en un vector pAMA1-MET digerido para producir pAMA1-MET-VST1. El promotor *gpdA* y el gen que codifica VST1 son reamplificados como un fragmento por PCR a partir del plásmido pAMA1-MET-VST1 utilizando cebadores de avance y retroceso, con sobrantes en 5' que contienen sitios de restricción adecuados. La introducción de dichos sitios de restricción en los extremos 5' y 3' del fragmento de ADN permite la ligación de producto de PCR restringido en el plásmido pAMA1-HIS-4CL1. El plásmido resultante, pAMA1-HIS-4CL1-VST1, contiene los genes que codifican 4CL1 y VST1 que están cada uno bajo el control de un promotor *gpdA* individual de *Aspergillus nidulans*. La secuencia de los genes que codifican 4CL1 y VST1 es verificada secuenciando dos clones diferentes de pAMA1-HIS-4CL1-VST1.

c) Expresión de la ruta a pinosilvina en *Aspergillus niger*.

Las cepas de *Aspergillus niger* son transformadas con los vectores descritos en (a) y (b), separadamente o en combinación. La transformación de la célula fúngica es llevada a cabo con métodos conocidos en el arte, por ejemplo, por electroporación o por conjugación (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989). Los transformantes son seleccionados sobre medio mínimo carente de metionina y/o histidina.

Una cepa de *Aspergillus niger* que es auxotrófica para histidina y metionina, por ejemplo, la cepa FGSC A919 (véase <http://www.fgsc.net>), es transformada separadamente con el vector pAMA1-MET-PAL2 (a), produciendo la cepa FSANPAL2 y con pAMA1-HIS-4CL1-VST1 (b), produciendo la cepa FSAN-4CL1VST1. Además, la cepa de *Aspergillus niger* FGSC A919 es cotransformada con pAMA1-MET-PAL2 (a) y pAMA1-HIS-4CL1-VST1 (b), y la cepa transformada es denominada FSAN-PAL24CL1VST1.

Ejemplo 13

Expresión de la ruta a pinosilvina en *Aspergillus oryzae*.

Una cepa de *Aspergillus oryzae* que contiene un conjunto nativo de genes que codifican para PAL2 y 4CL1 (Seshime *et al.*, 2005) y que es auxotrófica para metionina, es transformada con el vector pAMA1-MET-VST1 (Ejemplo 29), produciendo la cepa FSAO-VST1. La transformación de la célula fúngica se lleva a cabo con métodos conocidos en el arte, por ejemplo, por electroporación o conjugación (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989). Los transformantes son seleccionados sobre medio mínimo carente de metionina.

Ejemplo 14

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

Las cepas recombinantes de *Aspergillus* pueden ser cultivadas en fermentadores operados como cultivos por lotes, lotes con alimentación o quimiostáticos.

Cultivos por lotes y lotes con alimentación

El microorganismo es cultivado en un reactor regulado con un volumen de trabajo de 1.5 litros bajo condiciones aerobias. Todos los cultivos son incubados a 30°C, a 500 rpm. Se mantiene un pH constante de 6.0 mediante la adición automática de KOH 10 M KOH, y se obtienen condiciones aerobias purgando el biorreactor a una tasa de 1 vvm para asegurar que el DOT es más de 80%. Las células son cultivadas sobre glucosa en medio definido

consistente de los siguientes componentes para permitir el crecimiento en cultivos por lotes: 7.3 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.5 g/l de KH_2PO_4 , 1.0 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.0 g/l de NaCl , 0.1 g/l de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1 ml/l de antiespumante Sigma, 7.2 mg/l de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.3 mg/l de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.3 mg/l de $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 3.5 mg/l de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y 6.9 mg/l de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. La concentración de glucosa es, por ejemplo, 10-, 20-, 30-, 40- o 50 g/l. Para permitir el crecimiento en cultivos en lotes con alimentación el medio esta compuesto de: 7.3 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4.0 g/l de KH_2PO_4 , 1.9 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.3 g/l de NaCl , 0.10 g/l de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1 ml/l de antiespumante Sigma, 7.2 mg/l de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.3 mg/l de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.3 mg/l de $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 3.5 mg/l de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y 6.9 mg/l de $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en la fase de lote. El reactor es alimentado entonces, por ejemplo, con 285 g/kg de glucosa y 42 g/kg de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Se utiliza micelio libre de un prelote para inocular los cultivos por lotes y por lotes con alimentación. Se utiliza una concentración de esporas de $2 \cdot 10^9$ esporas/l para la inoculación del cultivo prelote a pH 2.5. Las esporas se obtienen por propagación de esporas liofilizadas sobre 29 g de arroz al cual se agregan los siguientes componentes: 6 ml de sacarosa de 15 g/l, 2.3 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.0 g/l de KH_2PO_4 , 0.5 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.50 g/l de NaCl , 14.3 mg/l de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.5 mg/l de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.50 mg/l de $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, y 13.8 mg/l de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Las esporas son propagadas a 30°C durante 7-14 días para producir una capa negra de esporas sobre los granos de arroz y son recolectadas agregando 100 ml de Tween 20 al 0.1% en agua estéril. Para todas las condiciones, el gas es esterilizado por filtración antes de ser introducido en el biorreactor. El gas de salida es conducido a través de un condensador enfriado a menos de -8°C y analizado en cuanto a su contenido volumétrico de CO_2 y O_2 por medio de un analizador acústico de gases.

Cultivos quimiostáticos

En cultivos quimiostáticos las células pueden ser cultivadas, por ejemplo, en un fermentador de laboratorio Biostat B con volumen de trabajo de 1.5-L a 30°C y 500 rpm. Se mantiene un pH constante de 6.0 mediante la adición automática de KOH 10 M KOH, y se obtienen condiciones aerobias purgando el biorreactor con aire a una rata de 1 vvm para asegurar que el DOT es más de 80%. La rata de dilución (D) puede fijarse a valores diferentes, por ejemplo a 0.050 h^{-1} , 0.10 h^{-1} , 0.15 h^{-1} , o 0.20 h^{-1} . El pH se mantiene constante a 6.6 mediante la adición automática de KOH 10 M, utilizando un medio de crecimiento mínimo con los siguientes componentes: 2.5 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.75 g/l de KH_2PO_4 , 1.0 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.0 g/l de NaCl , 0.1 g/l de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1 ml/l antiespumante Sigma, 7.2 mg/l de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.3 mg/l de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.3 mg/l de $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 3.5 mg/l de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y 6.9 mg/l de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. La concentración de glucosa puede ser fijada a valores diferentes, por ejemplo, es 3.0 g/l, 6.0 g/l, 12.0 g/l, 15.0 g/l o 18.0 g/l. El biorreactor es inoculado con micelio libre de un cultivo prelote como se describió más arriba, y la bomba de alimentación se enciende al final de la fase de crecimiento exponencial.

Para todas las condiciones, el gas es esterilizado por filtración antes de ser introducido en el biorreactor. El gas de salida es conducido a través de un condensador enfriado a menos de -8°C y analizado en cuanto a su contenido volumétrico de CO_2 y O_2 por medio de un analizador acústico de gases.

Los cultivos se consideran en estado de equilibrio después de al menos 5 tiempos de residencia, y si las concentraciones de biomasa glucosa y composición del sobranse desgasificado no cambian (menos de 5% de desviación relativa) durante los dos últimos tiempos de residencia.

Ejemplo 15

Extracción y análisis de pinosilvina en *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae*

La extracción y el análisis se llevan a cabo usando los métodos como se describió en el Ejemplo 9.

Ejemplo 16

Producción de pinosilvina en *Aspergillus nidulans* AR1

El *Aspergillus nidulans* AR1 tiene eliminado los siguientes genes *argB2*, *pyrG89*, *veA*.

a) Construcción de un vector de expresión fúngico filamentoso con el marcador *argB* (ornitina carbamoiltransferasa)

El gen que codifica *argB* incluyendo el promotor homólogo y la secuencia terminadora fue amplificada a partir de ADN genómico de *Aspergillus nidulans* AR1 utilizando el cebador de avance 5-CG GAATTC ATA CGC GGT TTT TTG GGG TAG TCA-3 (SEQ ID NO: 17) y el cebador de retroceso 5-CG CCCGGG TAT GCC ACC TAC AGC CAT TGC GAA-3 (SEQ ID NO: 18) con el sobranse en 5' que contiene los sitios de restricción *EcoRI* y *XmaI* respectivamente.

Los sitios de restricción incorporados en el producto de PCR permitieron la inserción en pUC19 (New England Biolabs, Ipswich, MA.) digerido con *EcoRI* y *XmaI* dando pUC19-*argB*.

El terminador *trpC* (Indol-3-glicerol fosfato sintasa) fue amplificado a partir de ADN genómico de *A. nidulans* utilizando el cebador de avance 5-GC GGATCC ATA GGG CGC TTA CAC AGT ACA CGA-3 (SEQ ID NO: 19) y el cebador de retroceso 5-CGGAGAGGGCGCGCCCGTGGCGGCCGC GGA TCC ACT TAA CGT TAC TGA-3 (SEQ ID NO: 20) con el sobrante en 5' que contiene el sitio de restricción BamHI y adaptámero de 27 pares de bases respectivamente.

El promotor *gpdA* (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) fue amplificado a partir de ADN genómico de *A. nidulans* *AR1* utilizando el cebador de avance 5-GCGGCCGCCACGGGCGCGCCCTCTCCG GCG GTA GTG ATG TCT GCT CAA-3 (SEQ ID NO: 21) y el cebador de retroceso 5-CG AAGCTT TAT AAT TCC CTT GTA TCT CTA CAC-3 (SEQ ID NO: 22) con el sobrante en 5' que contiene un adaptámero de 27 pares de bases y el sitio de restricción HindIII respectivamente.

El producto de PCR de fusión del fragmento *trpC* y *gpdA* con los sitios de restricción incorporados permiten la inserción en pUC19-*argB* digerido con BamHI y HindIII produciendo pAT3.

b) Construcción de un vector de expresión fúngico filamentoso con el marcador *pyrG* (orotidina-5'-monofosfato descarboxilasa) para expresión de C4H (cinamato-4-hidroxilasa) en *A. nidulans* *AR1*.

El gen que codifica C4H fue reamplificado a partir del plásmido de levadura pESC-URA-PAL2-C4H (WO2006089898, (Ejemplo 3) usando el cebador de avance 5-CG G CGCG C ATA ATG GAC CTC CTC TTG CTG GAG-3 (SEQ ID NO: 23) el cebador de retroceso 5-GG GC GGCC GC TTA TTA ACA GTT CCT TGG TTT CAT AAC G-3 (SEQ ID NO: 24) con el sobrante en 5' que contiene los sitios de restricción BssHII y NotI respectivamente. Los sitios de restricción incorporados en el producto de PCR permite la inserción en pAT3 digerido con BssHII y NotI dando pAT3-C4H. El constructo fue verificado mediante corte con enzima de restricción y secuenciación. El marcador *argB* fue retirado utilizando las dos siguientes enzimas de restricción BsiWI y PciI.

El gen que codifica *pyrG* que incluye el promotor homólogo y la secuencia terminadora fue reamplificado a partir de ADN genómico de *Aspergillus fumigatus* usando el cebador de avance 5-CGT GTAC AATA TTA AT TAA CGAGA GCG AT CGC AAT AAC CGT ATT ACC GCC TTT GAG-3 (SEQ ID NO: 25) y el cebador de retroceso 5-CGA CATG TAT TCC CGG GAA GAT CTC ATG GTC A-3 (SEQ ID NO: 26) con el sobrante 5' que contiene los sitios de restricción BsrGI, PciI, AsiSI en el cebador de avance y PciI en el cebador de retroceso. Los sitios de restricción incorporados en el producto de PCR permiten la inserción en pAT3 digerido con BsiWI y PciI dando pAT3-C4H-*pyrG*. El constructo fue verificado mediante corte con enzima de restricción y secuenciación.

c) Construcción de un vector de expresión fúngico filamentoso con el marcador *argB* para la expresión de 4CL1 (4-cumarato-CoA ligasa) en *A. nidulans* *AR1*

El gen que codifica 4CL1 fue reamplificado a partir del plásmido de levadura pESC-TRP-4CL1-VST1 usando el cebador de avance 5-GCGGAGAGGGCGCG ATG GCG CCA CAA GAA CAA GCA-3 (SEQ ID NO: 27) y el cebador de retroceso 5-TGGATCCGCGGCCGC TCA CAA TCC ATT TGC TAG TTT TGC-3 (SEQ ID NO: 28). El gen 4CL1 fue insertado en un vector pAT3 digerido con BssHII y NotI utilizando la tecnología de clonación Infusion™ PCR (Clontech, Mountain View, Calif.) para producir pAT3-4CL1. El constructo fue verificado por corte con enzima de restricción y secuenciación.

d) Construcción un vector de expresión fúngico filamentoso con marcador *argB* para expresión de VST1 (resveratrol sintasa) en *A. nidulans* *AR1*

El gen que codifica VST1 fue reamplificado a partir del plásmido de levadura pESC-TRP-4CL1-VST1 (Ejemplo 5) usando el cebador de avance 5-CG G CGCG C ATA ATG GCA TCC GTA GAG GAG TTC-3 (SEQ ID NO: 29) y el cebador de retroceso 5-GG GC GGCC GC TTA TCA TTA GTT AGT GAC AGT TGG AA-3 (SEQ ID NO: 30) con el sobrante de 5' que contiene los sitios de restricción BssHII y NotI respectivamente. Los sitios de restricción incorporados en el producto de PCR permitieron la inserción en pAT3 digerido con BssHII y NotI dando pAT3-VST1. El constructo fue verificado por corte con enzima de restricción y secuenciación.

e) Expresión de la ruta que lleva a pinosilvina en *A. nidulans* *AR1* (La cepa tiene eliminaciones (*argB2*, *pyrG89*, *veA1*)) usándose C4H, 4CL1 y VST1.

La transformación de la célula fúngica de *A. nidulans* *AR1* fue llevada a cabo de acuerdo con métodos conocidos en el arte por protoplastación utilizando enzimas para lisis de pared celular (glucanex, novozymes) Tilburn et al., 1983. La integración aleatoria de C4H, 4CL1 y VST1 fue llevada a cabo en dos etapas. Los plásmidos pAT3-4CL1 y pAT3-VST1 fueron linealizados utilizando la enzima de restricción Bmrl e integrados en el genoma por cotransformación de acuerdo con Guerra et al., 2006 utilizando el marcador auxotrófico *argB*. Sem aisló un transformante que contienen un casete de expresión 4CL1 y VST1 y una transformación sucesiva con pAT3-C4H-*pyrG*, la cual fue linealizada con Bmrl, dio una cepa de *A. nidulans* recombinante que contenía C4H, 4CL1 y VST1.

f) Fermentación con cepas de *A. nidulans* recombinantes en matraces con agitación.

Los precultivos de *A. nidulans* fueron cultivados durante 5 días sobre placas de agar a 37°C que contenían 1 g/L de glucosa, 0.85 g/L de NaNO₃, 0.1 g/L de KCl, 0.1 g/L de MgSO₄·7H₂O; y 0.3 g/L de KH₂PO₄, 0.00008 g/L, CuSO₄·5H₂O, 0.000008 g/L Na₂B₄O₇·10H₂O, 0.00016 g/L FeSO₄·7H₂O, 0.00016 g/L MnSO₄·2H₂O, 0.00016 g/L de Na₂MoO₄·2H₂O, y 0.0016 g/L de ZnSO₄·7H₂O. Los precultivos fueron usados para inoculación de matraces con agitación regulados de 500 ml que contenían 100 ml de medio Czapek (CZ). Los matraces con agitación fueron incubados a 150 rpm y 30°C y el pH inicial del medio fue de 6.2. Después de un período de incubación de 24 horas, se tomaron las muestras y se sometieron a procedimientos de extracción (véase más abajo) y se analizaron en cuanto a la presencia de pinosilvina producida.

g) Extracción de pinosilvina de cultivos en matraces con agitación de *A. nidulans*

Las muestras consistentes de 100 ml de cultivos (tanto de células como de caldo) fueron retiradas de los matraces con agitación. La extracción de los metabolitos se llevo a cabo como sigue; las muestras fueron transferidas a dos tubos Sartorius de 50 ml y centrifugadas a 4500 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue transferido a un vaso y la biomasa fue dividida en ocho alícuotas que fueron transferidas a microtubos Sarstedt de 2 ml con tapa, que contenían aproximadamente 300 µl de perlas de vidrio (0.25-0.50 mm). Los tubos fueron insertados en un Fastprep 120 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA.) durante cuatro ciclos a un nivel de 6.5 durante 30 segundos a la vez y mantenidos en hielo entre los ciclos. Las células trituradas fueron divididas en dos tubos Sartorius de 15 ml. Los tubos fueron llenados con 10 ml de sobrenadante y se agregaron 3 ml de acetato de etilo. Los tubos fueron mezclados vigorosamente sobre un mezclador con rotación durante 2 minutos y puestos sobre hielo durante 5 minutos. La fase de acetato de etilo fue separada entonces de la fase acuosa a través de centrifugación a 4500 rpm durante 10 minutos y recolectada en cuatro tubos Eppendorf de 1.5 ml. El acetato de etilo fue liofilizado durante 45 minutos y las muestras secas fueron redisueltas en 0.3 ml de metanol al 50% para posterior análisis por HPLC, como se describe en el Ejemplo 9b.

h) Resultados en matraces con agitación de *A. nidulans* recombinante

La figura 7 muestra los cromatogramas de HPLC de un experimento de matraces con agitación típico. El panel superior muestra los resultados de la cepa modificada que produce pinosilvina y el panel inferior muestra los resultados de la cepa de control tipo silvestre original. Los niveles de pinosilvina producidos por la cepa modificada variaron entre 1.0-2.0 mg/l. La cepa de control no mostró ninguna formación de pinosilvina.

La identidad del pico de pinosilvina fue confirmada adicionalmente con espectros UV con arreglo de diodos en comparación con un cromatograma de UV de un estándar puro (figura 8).

Ejemplo 17

Determinación de niveles intracelulares y extracelulares de estilbenoides en un cultivo continuo de PALCPR

Una cepa de levadura FSSC-PAL2C4H4CL2VST1-pADH1CPR1 con CPR sobreexpresado, fue cultivada en un cultivo continuo limitado en carbono con un volumen de trabajo de 1 litro. El cultivo fue alimentado con un medio definido de acuerdo con Verduyn *et al.* (1992), que contiene: 5.0 g/L de (NH₄)₂SO₄; 3.0 g/L de KH₂PO₄; 0.5 g/L de MgSO₄·7H₂O; metales traza y vitaminas y 5 g/l de glucosa y 35 g/l de galactosa como nutrientes limitantes del crecimiento. Se agregó antiespumante (300 ml/L, Sigma A-8436) para evitar la formación de espuma. La fuente de carbono fue sometida a autoclave separadamente del medio mineral y después agregada al fermentador. Además, las soluciones de vitaminas y metales traza fueron agregadas al fermentador mediante filtración estéril después del autoclave y enfriamiento del medio. El sistema fermentador fue de Sartorius BBI Systems y consistió de un recipiente reactor de 3 litros regulado con un volumen de trabajo de 1 litro equipado con un controlador Biostat B Plus. El recipiente reactor fue equipado con dos turbinas Rushton las cuales estuvieron rotando a 1000 rpm cada una, la temperatura fue mantenida a 30 ± 1°C, y el pH fue mantenido a 5.5 ± 0.2 mediante la adición automática de KOH 2M. El flujo de gas fue controlado por un controlador de flujo de masas y fue fijado en 1.5 vvm (1.5 l/minuto). El gas de salida fue conducido a través de un condensador enfriado, y fue analizado en cuanto al contenido de O₂ y CO₂ (Model 1308, Innova, Dinamarca). Se inicio un cultivo por lotes inicial con 35 g/l de galactosa por inoculación del cultivo con 10 ml de un cultivo de matraz con agitación en crecimiento exponencial que contenía 5 g/l de glucosa y 35 g/l de galactosa. El cultivo en lote fue conmutado a un modo continuo alimentando el mismo medio continuamente al reactor. La rata de dilución fue controlada sobre una base de nivel constante, buscando D = 0.050 h⁻¹. El cultivo continuo fue considerado como en estado de equilibrio cuando tanto la rata de dilución como la señal de gas de salida no habían cambiado durante al menos cinco tiempos de residencia, y cuando las concentraciones de metabolito en dos muestras sucesivas tomadas a intervalos de un tiempo de residencia, se desviaron en menos de 3%. La concentración de oxígeno disuelto, la cual fue monitorizada de manera continua, se mantuvo por encima de 60% de saturación de aire. Bajo dichas condiciones la cepa consumió toda la galactosa, y produjo principalmente biomasa y CO₂, y solamente cantidades menores de etanol. Además, el RQ fue cercano a la unidad, indicando que

el metabolismo sucedió predominantemente en modo respiratorio.

Para la determinación de estilbenoides, se tomaron muestras a aproximadamente 300 horas en fermentación correspondientes a 15 tiempos de residencia. Las células fueron recolectadas por centrifugación a 5000 g durante 5 minutos. Para la determinación de niveles extracelulares de estilbenoides, se extrajo una alícuota de 25 ml de sobrenadante una vez con 10 ml de acetato de etilo. El acetato de etilo fue liofilizado y el producto seco redisoluto en 0.6 ml de metanol. Las muestras fueron diluidas entonces 50 veces en agua transferidas a viales de HPLC y analizadas por HPLC. Adicionalmente, para evaluar si el nivel de estilbenoides que fue producido excedía la solubilidad del medio, o estaba enlazado a las membranas celulares se mezclaron alícuotas de 1 ml del cultivo celular, incluyendo así tanto células como medio, con 1 ml de etanol al 100%, y se mezclaron vigorosamente antes de la centrifugación. El sobrenadante fue transferido entonces en viales de HPLC y analizado directamente en cuanto al contenido de estilbenoides. Para la determinación de niveles intracelulares de estilbenoides, se tomó una alícuota de 50 ml de cultivo, y las células y el medio fueron separados por centrifugación. La pella fue lavada con 50 ml de agua para eliminar cualquier estilbenoide que estuviera unido a la célula o atrapado dentro de la pella; después de la recentrifugación la pella fue disuelta entonces en 1 ml de agua. La suspensión celular resultante fue distribuida en tubos de extracción y desecha con perlas de vidrio utilizando una máquina de preparación rápida. Los extractos crudos fueron reunidos en 10 ml de metanol al 100% y extraídos en una cámara rotatoria durante 24 horas en un entorno oscuro frío a 4°C. Después de esto, los residuos celulares fueron retirados por centrifugación durante 5 minutos a 5000 g y el metanol restante fue eliminado por liofilización durante la noche. El residuo seco fue redisoluto en 0.4 ml de metanol y 0.1 ml de agua. Las muestras fueron diluidas 50 veces en agua y luego transferidas a viales de HPLC, y analizadas por HPLC.

La siguiente Tabla resume los resultados después de un cultivo continuo durante 300 horas:

	Pinosilvina intracelular	Pinosilvina extracelular	Pinosilvina extracelular	Pinosilvina total
	(a)	(b)	En EtOH (c)	(a + c)
mg/l	16.45	12.55	1113.57	130.02
% de total	12.65	9.65	87.35	100.00
mg/g de peso seco	1.83	-	-	-

Los niveles intracelulares de estilbenoides se expresan en mg por gramo de biomasa (peso seco), de acuerdo con el cálculo explicado en la sección siguiente. La concentración de pinosilvina en el extracto fue determinada como 1646 mg/l; el volumen del extracto fue de 0.5 ml, por lo tanto la cantidad absoluta de pinosilvina extraída fue $0.5 \times 1646 / 1000 = 0.8230$ mg respectivamente. Los estilbenoides fueron extraídos a partir de una alícuota de cultivo de 50 ml por lo tanto las concentraciones intracelulares de pinosilvina expresadas por litro de cultivo fueron $0.8230 \times (1000/50) = 16.46$ mg/l. La concentración de biomasa de dicho cultivo fue de 9 g/l. Los niveles de pinosilvina intracelulares expresados por gramo de peso seco por lo tanto fueron $16.46/9 = 1.83$ mg/g de peso seco.

Ejemplo 18

Clonación de la ruta de trans-pinosilvina en levadura oleaginosas *Yarrowia lipolytica*

a) Aislamiento de genes

Los genes de PAL (fenilalanina amoníaco liasa), CL (cinamoil:CoA ligasa) y VST1, donde gen se define como una secuencia que codifica proteínas, son producidos como genes sintéticos (GenScript Corporation, Piscataway, NJ) con optimización de codones para la expresión en *Yarrowia lipolytica*. La determinación del uso de codones en *Y. lipolytica* ha sido descrita previamente (WO2006125000). Los genes PAL y 4CL también pueden ser aislados por PCR a partir de ADNc de *A. thaliana* (Stratagene). La cinamoil:CoA ligasa CL puede ser cualquier hidroxycinamoil:CoA ligasa que acepta ácido cinámico como sustrato. Por ejemplo, las 4-cumaroil:CoA ligasa de *A. thaliana*, codificadas por los genes 4CL1 y 4CL2, aceptan ácido cinámico aunque el sustrato preferido es ácido 4-hidroxycinámico (ácido cumárico) (Hamberger and Hahlbrock, 2004; Costa et al., 2005). Lo más preferiblemente, el CL es una ligasa optimizada por codón específica para ácido cinámico como sustrato ejemplificada por la cinamato:CoA ligasa de *Streptomyces coelicolor* (Kaneko et al, 2003). De la misma manera, el gen VST1 puede ser cualquier codón optimizado o no optimizado de estilbeno sintasa que acepta cinamoil:CoA como sustrato aunque el sustrato preferido es usualmente 4-cumaroil:CoA en estilbeno sintasas que producen resveratrol, las así llamadas

resveratrol sintasas. Este tipo de aceptación dual de sustrato está en la naturaleza del gen VST1 (Seq ID: 9) de *Vitis vinifera*. Lo más preferiblemente se usa una estilbeno sintasa de la familia de *Pinus* específica para cinamoil:CoA como sustrato (Schanz et al, 1992; Kodan et al, 2002).

b) Aislamiento de promotores y terminadores

5 Los promotores que pueden ser utilizados para la expresión de genes heterólogos en *Yarrowia lipolytica* son ejemplificados pero no limitados por los siguientes promotores: acil:CoA oxidasa POX2 de cadena larga, hp4d, isocitrato liasa ICL1, proteasa alcalina XPR2 extracelular, factor de elongación de traducción TEF, proteína ribosómica S7 RPS7, promotores GPD, YAT1, GPAT, FBA1, y FBAIN de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Müller et al, 1998: WO2006055322 WO2006125000).

10 Los terminadores que pueden ser utilizados para la expresión de genes heterólogos en la *Yarrowia lipolytica* son ejemplificados pero no limitados por los siguientes terminadores: terminadores XPR2, LIP2, PEX20, y SQS (Merkulov et al, 2000; WO2006055322; WO2006125000).

El aislamiento de los fragmentos de ADN terminadores y promotores puede hacerse a través de PCR a partir de ADN genómico de *Yarrowia lipolytica* preparado a partir de células enteras de *Y. lipolytica* ejemplificadas pero no limitadas por las células de la America Type Culture Collection, tales como ATCC16618, ATCC18943, y ATCC18944, ATCC90811, ATCC90812, y ATCC90903.

c) Generación de un casete de expresión

La generación de un casete de expresión significa el ensamblaje de un fragmento de ADN de cadena doble lineal consistente de un promotor (constitutivo o inducible) fusionado junto con la secuencia codificadora de proteínas de un gen heterólogo y una secuencia terminadora, esto es, Promotor 5'::Gen::Fragmento de ADN terminador-3'

El casete de expresión puede ser generado por una combinación de PCR de fusión de los diferentes fragmentos genéticos; promotor, gen que codifica la secuencia y fragmento terminal. Por ejemplo el gen PAL puede ser fusionado con tecnología PCR al promotor XPR2 y el fragmento resultante XPR2::PAL puede ser fusionado adicionalmente a través de una segunda reacción de PCR al terminador para generar el casete de expresión XPR2::PAL::terminador.

Una manera alternativa de generar un casete de expresión es clonar la secuencia codificadora de proteína del gen heterólogo (tal como PAL) en un vector de expresión existente, ejemplificado pero no limitado al vector ATCC 69355™. Este vector ATCC ya tiene un promotor (XPR2) y una región terminadora y un sitio de clonación múltiple (MCS) con sitios de restricción únicos entre el promotor y el terminador para la introducción de un gen heterólogo mediante herramientas de biología molecular estándares. Si el número de sitios de restricción entre la región promotora y el terminador en el vector diana están limitados puede utilizarse la tecnología del kit de clonación Infusion (Clontech, CA, Estados Unidos) puesto que requiere solamente un sitio de restricción en el vector para la inserción de genes. Al insertar el gen en un vector entre un promotor y un terminador el casete de expresión Promotor::Gen::Terminador es creado dentro de un vector circular y no como un fragmento de ADN de cadena doble simple. Si se requiere un fragmento de casete de expresión de ADN lineal puede utilizarse PCR para la amplificación del casete de expresión a partir del vector de expresión. Una persona experimentada en el arte reconocerá que pueden introducirse varios casetes de expresión en el mismo plásmido o vector dando como resultado una aglomeración de casetes de expresión preferiblemente con genes de una ruta metabólica completa, tal como la ruta de producción de pinosilvina (genes PAL, CL y VST1). La aglomeración de casetes de expresión para los tres genes necesarios para la producción de pinosilvina (PAL, CL y VST1) se define como la aglomeración de expresión de la ruta de pinosilvina.

d) Inserción de gen heterólogo, PAL, CL y VST1 para la producción de pinosilvina en *Y. lipolytica*

Los genes de la ruta de la pinosilvina (PAL, CL, VST1) son ensamblados como casetes de expresión con un promotor y terminador Promotor::Gen::Terminador. Los promotores y terminadores pueden ser el mismo o una combinación de diferentes promotores y terminadores para los diferentes genes PAL, CL y VST1. Una persona experimentada en el arte reconocerá las técnicas de clonación, vectores de clonación o herramientas de clonación disponibles necesarios para la introducción y expresión de la aglomeración de expresión de la ruta de pinosilvina (comprendiendo los casetes de expresión con los genes PAL, CL y VST1) en *Y. lipolytica*, puesto que estas herramientas han sido descritas en varias publicaciones (Le Dall et al, 1994; Pignede et al, 2000; Juretzek et al, 2001; Madzak et al, 2004) y Solicitudes de Patentes (WO2006055322; WO2006125000).

En resumen, una vez que han sido obtenidos los casetes de expresión adecuados para la expresión de la ruta de pinosilvina (PAL, CL y VST1) en *Y. lipolytica*, pueden ser (i) colocados en un vector plásmido capaz de replicación autónoma en una célula huésped o (ii) integrados directamente en el genoma de la célula huésped o una

combinación de los mismos con el fin de establecer la aglomeración de la expresión de la ruta de pinosilvina en el huésped de *Y. lipolytica*. Los casetes de expresión pueden ser diseñados para integrarse aleatoriamente dentro del genoma del huésped o pueden ser direccionados a localizaciones específicas. En ambos casos el casete de expresión es construido adicionalmente para contener regiones circundantes de homología al genoma huésped en ambos lados del casete de expresión. Las regiones de homología pueden ser de 20-1000 pares de bases suficientes para direccionar la recombinación con el locus huésped. Pueden direccionarse copias individuales a cualquier parte del genoma que no llevarán a eliminación de un gen esencial. La integración en múltiples localizaciones dentro del genoma de *Y. lipolytica* puede ser particularmente útil cuando se desean altos niveles de expresión de genes y se ejemplifican dianas para integración de copias múltiples de casetes de expresión pero no limitadas a secuencias de ADN ribosómicas (ADNr) o elementos similares a retrotransposones (elementos TY1) (Pignede et al, 2000). Cuando se integran copias múltiples de casetes de expresión dirigidos a posiciones aleatorias en el genoma de *Y. lipolytica* el casete de expresión promotor-gen-terminador puede realmente hacerse más corto, incluyendo solo promotor-gen puesto que la integración permitirá que los terminadores ya presentes en el genoma de *Y. lipolytica* sirvan como terminador para el casete de expresión.

También es posible integrar ADN plásmido que comprende casetes de expresión en locus alternos para alcanzar el número deseado de copias para el casete de expresión, ejemplificado pero no limitado al locus URA3 (Acceso No AJ306421) y el locus LEU2 (Acceso No AF260230). El vector integrador LEU2 es ejemplificado pero no limitado al vector ATCC 69355™. El vector de expresión que contiene un casete de expresión puede ser utilizado directamente para la transformación en células de *Y. lipolytica* autotróficas para leucinas para la selección del vector de expresión que contiene el gen marcador LEU2 de *Y. lipolytica*. El casete de expresión también puede ser amplificado a partir del vector de expresión por técnicas de PCR para ser utilizado posteriormente para la construcción de otros vectores de expresión que contienen marcadores antibióticos selectivos apropiados o marcadores de aminoácidos biosintéticos.

El sitio de integración URA3 puede ser utilizado repetidamente en combinación con la selección por ácido 5-fluoroorótico (5-FOA). En detalle, el gen URA3 nativo es eliminado en la cepa huésped de *Y. lipolytica* para generar una cepa que tienen un fenotipo URA- auxotrófico, en donde la selección ocurre con base en la resistencia a 5-FOA. Cuando el URA3 está presente el 5-FOA se degrada a un compuesto tóxico de 5-fluorouracilo mediante la orotidina-5'-fosfato descarboxilasa codificada por el gen URA3 y solamente serán resistentes las células que carezcan del gen URA3. Consecuentemente, una aglomeración de casetes de expresión múltiple y un nuevo gen de URA3 pueden ser integrados en múltiples rondas en diferentes locus del genoma de *Yarrowia lipolytica* para producir por lo tanto una nueva cepa que tenga el fenotipo prototrófico URA+. La integración subsecuente produce una nueva cepa URA3-auxotrófica, de nuevo utilizando selección con 5-FOA, cuando el gen URA3 introducido es eliminado de manera autónoma (denominada salida de circuito o salto). Así, el gen de URA3 en combinación con la selección por 5-FOA puede ser utilizado como un marcador de selección en múltiples rondas de modificaciones genéticas e integración de casetes de expresión.

e) Transformación de *Y. lipolytica*

Pueden utilizarse técnicas de transformación estándar (Chen et al, 1997; WO2006125000) para introducir el ADN foráneo, vectores de autorreplicación o fragmentos de ADN que comprenden los casetes de expresión en el huésped de *Y. lipolytica*, ejemplificado pero no limitado a células huésped tales como ATCC90811, ATCC90812, y ATCC90903. El método de selección usado para mantener el ADN foráneo introducido en *Y. lipolytica* puede basarse en marcadores de aminoácidos (Fickers et al, 2003) o marcadores de antibióticos (Cordero et al, 1996).

Ejemplo 19

(a) Cultivos en lote con cepas recombinantes de *Escherichia coli*

Las cepas recombinantes de *Escherichia coli* FSEC-PAL24CL1VST1 y BL21 (DE3) (cepa de control) fueron cultivadas en biorreactores controlados con un volumen de trabajo de 1.5 litros, bajo condiciones aerobias. Los cultivos fueron incubados a 30°C, a 800 rpm. Se mantuvo un pH constante de 7 por adición automática de KOH 2N. Se obtuvieron condiciones anaerobias purgando el biorreactor con aire y a una rata de 1 vvm para asegurar que la densidad de oxígeno disuelto (DOT) era mayor de 60%. El aire fue esterilizado por filtración antes de ser introducido en los biorreactores. El gas de salida fue conducido a través de un condensador enfriado a menos de 6°C y analizado en cuanto a su contenido volumétrico de CO₂ y O₂ por medio de un analizador acústico de gases. Los reactores estaban equipados con sensores polarográficos de oxígeno que fueron calibrados con aire (DOT, 100%) y N₂ (DOT, 0%).

Las células fueron cultivadas sobre glicerol en un medio semidefinido consistente de los siguientes componentes para permitir el crecimiento en cultivos por lote: 6.0 g/l de extracto de levadura, 27.2 g/l de Na₂HPO₄ (anhidro), 12.0 g/l de KH₂PO₄, 2.0 g/l de NaCl, y 4.0 g/l de NH₄Cl. La concentración de glicerol fue de 20 g/l. El medio fue suplementado con 50 mg/l de ampicilina y 50 mg/l de kanamicina. Se agregó antiespumante hasta una concentración final de 50 ul/l.

Los biorreactores fueron inoculados con 1 ml de cultivo de reserva en glicerol de la cepa recombinante, llevando a una densidad óptica final a 600 nm de aproximadamente 0.03. Los cultivos de reserva en glicerol fueron obtenidos cultivando las células en matraces con agitación en un medio semidefinido a 30°C y 150 rpm. La composición del medio fue idéntica a la descrita más arriba, pero reescalada 4 veces menos, esto es, 5 g/l de glicerol, 1.5 g/l de extracto de levadura, 6.8 g/l de Na₂HPO₄ (anhidro), 3.0 g/l de KH₂PO₄, 0.5 g/l de NaCl, y 1.0 g/l de NH₄Cl. El medio fue suplementado con 50 mg/l de ampicilina y 50 mg/l de kanamicina. Las células fueron recolectadas durante la última fase exponencial, recolectadas por centrifugación y resuspendidas en un volumen apropiado de solución de glicerol estéril al 15% (p/v), de tal manera que la densidad óptica final a 600 nm fue 30. Se almacenaron alícuotas de 1 ml de células suspendidas a -80°C.

Después de que las células comenzaron el crecimiento en los biorreactores (5.5 horas después de la inoculación), se agregó isopropil β-tiogalactopiranosido (IPTG) hasta una concentración final de 1 mM, como inductor del promotor T7 que está al frente de cada uno de los tres genes PAL2, 4CL1, y VST1.

Se tomaron muestras de caldo celular en el transcurso de los cultivos por lote y se analizaron en cuanto a la presencia de pinosilvina. Además, las muestras fueron analizadas en cuanto a biomasa (en términos de densidad óptica OD600), fuente de carbono (glicerol) y subproductos principales (etanol, acetato, piruvato, succinato).

(b) Extracción de pinosilvina en *Escherichia coli*

La pinosilvina intracelular fue extraída con acetato de etilo. Para ese propósito, se agregaron 4 mL de acetato de etilo a 8 mL de caldo celular. La extracción fue reforzada mezclando (30 s) y la separación de fases, por centrifugación (4500 rpm durante 5 minutos, a 4°C). La fase de acetato fue sometida a liofilización (aproximadamente 2 horas) y el producto seco fue redisoluto en 0.5 ml de metanol y analizado por HPLC. Estas muestras fueron diluidas adicionalmente en agua (1:5) y analizadas por HPLC.

(c) Análisis de pinosilvina

El análisis de pinosilvina en las muestras del cultivo por lotes fue llevado a cabo utilizando el método como se describió en el Ejemplo 9b. La muestra fue sometida previamente a los siguientes procedimientos de preparación de muestra, llevados a cabo en paralelo: (i) Centrifugación del caldo celular (5 minutos) y análisis de sobrenadante; (ii) Adición de etanol (99.9%) hasta una concentración final de 50% (v/v), vórtex (30 segundos), centrifugación (5 minutos) y análisis de sobrenadante; (iii) Extracción con acetato de etilo, de acuerdo con el punto (b) más arriba, y análisis de la muestra seca redisolta en metanol.

Resultados

Las cepas recombinantes de *Escherichia coli* FSEC-PAL24CL1VST1 y BL21 (DE3) (cepa de control), como se describió en el Ejemplo 10c, fueron cultivadas sobre 20 g/L de glicerol en biorreactores en modo de lote, como se describió en (a) más arriba. En el transcurso de estos cultivos, las cepas recombinantes fueron analizadas en cuanto a su contenido de pinosilvina de acuerdo con el punto (c) más arriba.

El análisis por HPLC demostró que la cepa FSEC-PAL24CL1VST1 contenía un componente con un tiempo de retención idéntico al estándar de trans-pinosilvina (figuras 4 y 5). Además, los espectros de absorción UV fueron similares al espectro de absorción de trans-pinosilvina pura (no mostrado), con un λ_{max} de aproximadamente 306 nm.

Las concentraciones máximas de pinosilvina detectadas se muestran en la siguiente Tabla:

	Pinosilvina intracelular	Pinosilvina extracelular	Pinosilvina extracelular	Pinosilvina total
	(a)	(b)	En EtOH (c)	(a) + (c)
mg/l	0.016	(*)	(*)	0.016
%	100	0	0	100
mg/g	(**)	(**)	(**)	(**)
(*) por debajo del límite de detección				
(**) no determinado				

No se detectó pinosilvina en las muestras del cultivo por lotes con la cepa de control.

Los resultados, por lo tanto, demuestran la presencia de una ruta fenilpropanoide activa que lleva la producción *in vivo* de trans-pinosilvina en *E. coli* cultivada en un biorreactor en modo de lote.

Ejemplo 20

5 (a) Cultivo en lotes con cepa recombinante de *Aspergillus nidulans*

La cepa recombinante de *Aspergillus nidulans* que contenían C4H, 4CL1, y VST1 fue cultivada en un biorreactor regulado por un volumen de trabajo de 1.5 litros, bajo condiciones aerobias. Los cultivos fueron incubados a 30°C, a 700 rpm. Se mantuvo un pH constante de 6 mediante la adición automática de KOH 2N.

10 Se obtuvieron condiciones aerobias purgando el reactor con aire a una rata de 1 vvm para asegurar que la tensión de oxígeno disuelto (DOT) era mayor al 60%. El aire fue esterilizado por filtración antes de ser introducido en los biorreactores. El gas de salida fue conducido a través de un condensador enfriado a menos de 6°C y analizado en cuanto a su contenido volumétrico de CO₂ y O₂ por medio de un analizador acústico de gases. Los biorreactores fueron equipados con sensores polarográficos de oxígeno que fueron calibrados con aire (DOT, 100%) y N₂ (DOT, 0%). Las células fueron cultivados sobre sacarosa en medio definido que consistía de los siguientes componentes:

15 3.0 g/l de NaNO₃, 1.0 g/l de KH₂PO₄, 0.5 g/l de KCl, 0.5 g/l de MgSO₄·7H₂O, 0.5/l g de FeSO₄·7H₂O. La concentración de sacarosa fue de 30 g/l. Se agregó antiespumante hasta una concentración final de 50 ul/l.

20 **0170** El biorreactor fue inoculado con esporas de las cepa de *A. nidulans* que contenía C4H, 4CL1, y VST1, previamente propagadas en medio mínimo sólido, con la siguiente composición: 1 g/L de glucosa, 0.85 g/L de NaNO₃, 0.1 g/L de KCl, 0.1 g/L de MgSO₄·7H₂O; y 0.3 g/L de KH₂PO₄, 0.00008 g/L de CuSO₄·5H₂O, 0.000008 g/L de Na₂B₄O₇·10H₂O, 0.00016 g/L de FeSO₄·7H₂O, 0.00016 g/L de MnSO₄·2H₂O, 0.00016 g/L de Na₂MoO₄·2H₂O, y 0.0016 g/L de ZnSO₄·7H₂O. Las esporas fueron cultivadas a 37°C durante 5 días y recolectadas agregando solución de Tween al 80% (0.25% (p/v)).

(b) Extracción de pinosilvina en *Aspergillus nidulans*

25 Las células fueron desechas por homogeneización (en un homogeneizador de tejido Polytron) y la pinosilvina intracelular fue extraída con 10 ml de acetato de etilo. La extracción fue forzada mezclando en un mezclador rotatorio (aproximadamente 15 minutos) y la separación de fases, por centrifugación (4500 rpm, a 4°C, durante 5 minutos). La fase de acetato fue sometida a liofilización (aproximadamente 2 horas) y el producto seco fue redisoluto en 0.5 ml de metanol y analizado por HPLC.

(c) Análisis de pinosilvina

30 El análisis de la pinosilvina en muestras del cultivo por lotes fue llevado a cabo utilizando el método como se describió en el ejemplo 9b.

Resultados

35 La cepa recombinante de *Aspergillus nidulans* que contenía C4H, 4CL1, y VST1, tal como se describió en el ejemplo 16e, fue cultivada sobre 30 g/L de sacarosa en un biorreactor en modo por lotes, de acuerdo con el Ejemplo HD4. Después de aproximadamente 48 horas de cultivo, las células fueron recolectadas del biorreactor, desechas por homogeneización y analizadas en cuanto a su contenido intracelular de pinosilvina de acuerdo con (b) y (c) más arriba.

40 El análisis por HPLC mostró que la cepa de *A. nidulans* que contenía C4H, 4CL1, y VST1 exhibía intracelularmente un componente con un tiempo de retención idéntico al estándar de trans-pinosilvina (figuras 4 y 5). Además, los espectros de absorción UV fueron similares al espectro de absorción de la trans-pinosilvina pura (no mostrado) también, con una λ_{max} de aproximadamente 306 nm.

Los resultados, por lo tanto, demuestran la presencia de una ruta fenilpropanoide activa que lleva a la producción *in vivo* de trans-pinosilvina, en *A. nidulans* cultivado en un biorreactor en modo por lotes.

Referencias

45 Patente no. ZA200408194

Patente no. EP0309862

Patente no. EP0464461

Patente No. US5391724

Patente No. US5973230 Solicitud de Patente WO2006125000

Method for the production of resveratrol in a recombinant oleaginous microorganism

5 Huamg Lixuan Lisa, Du Pont (US)

Solicitud de Patente WO2006055322

High arachidonic acid producing strains of *Yarrowia lipolytica*

Damude Howard, Du Pont (US)

10 Abe, I., Watanabe, T. and Noguchi, H. (2004). Enzymatic formation of long-chain polyketide pyrones by plant type III polyketide synthases. *Phytochemistry*. 6, 2447-2453.

Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, Seeram NP, Shishodia S, Takada Y. (2004). Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res*. 24, 2783-840. Review.

15 Allina, S.M., Pri-Hadash, A., Theilmann, D.A., Ellis, B.E. and Douglas, C.J. (1998) 4-coumarate: Coenzyme A ligase in hybrid poplar. Properties of enzymes, cDNA cloning, and analysis of recombinant clones. *Plant Physiol*. 116, 743-754.

Becker JV, Armstrong GO, van der Merwe MJ, Lambrechts MG, Vivier MA, Pretorius IS. (2003). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the synthesis of the wine-related antioxidant resveratrol. *FEMS Yeast Res*. 4, 79-85.

20 Chen DC, Beckerich JM, Gaillardin C. One-step transformation of the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1997;48:232-5.

Cochrane, F.C., Davin, L.B. and Lewis N.G. (2004). The *Arabidopsis* phenylalanine ammonia lyase gene family: kinetic characterization of the four PAL isoforms. *Phytochemistry* 65, 1557-1564.

Cordero Otero R, Gaillardin C. Efficient selection of hygromycin-B-resistant *Yarrowia lipolytica* transformants. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1996;46:143-8.

25 Costa ML, Bedgar DL, Moinuddin SGA, Kim K, Cardenas CL, Cochrane FC, Shockey JM, Helms GL, Amakura Y, Takahashi H et al.

Characterization in vitro and in vivo of the putative multigene 4-coumarate:CoA ligase network in *Arabidopsis*: syringyl lignin and sinapate/sinapyl alcohol derivative formation

Phytochemistry, 2005;66:2072-2091

30 Ehrling, J., Büttner, D., Wang, Q., Douglas, C.J., Somssich, I.E. and Kombrink, E. (1999). Three 4-coumarate:coenzyme A ligases in *Arabidopsis thaliana* represents two evolutionary divergent classes in angiosperms. *The plant journal*. 19, 9-20.

Fickers P, Le Dall MT, Gaillardin C, Thonart P, Nicaud JM. New disruption cassettes for rapid gene disruption and marker rescue in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J Microbiol Methods*. 2003;55:727-37.

35 Gehlert, R., Schoppner, A. and Kindl, H. Stilbene synthase from seedlings of *Pinus sylvestris* - purification and induction in response to fungal infection. *Mol. Plant-Microbe Interaction* 3 (1990) 444-449.

Gems, D., Johnstone, I.L. and Clutterbuck, A.J. (1991). An autonomously replicating plasmid transforms *Aspergillus nidulans* at high frequency. *Gene* 98, 61-67.

40 Hain, R., Reif, H.J., Krause, E., Langebartels, R., Kindl, H., Vornam, B., Wiese, W., Schmelzer, E., Schreier, P.H., Stocker, R.H. and Stenzel, K. (1993). Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant.

Nature 361, 153-156.

Hwang EI, Kaneko M, Ohnishi Y, Horinouchi S. (2003). Production of plant-specific flavanones by *Escherichia coli* containing an artificial gene cluster. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2699-706.

5 Hamberger, B. and Hahlbrock, K. (2004). The 4-coumarate:CoA ligase gene family in *Arabidopsis thaliana* comprises one rare, sinapate-activating and three commonly occurring isoenzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101, 2209-2214.

Hart, J. H. (1981) Role of phytostilbenes in decay and disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathology* 19, 437-458.

Hart, J. H., Shrimpton, D. M. (1979). Role of stilbenes in resistance of wood to decay. *Phytopathology* 69, 1138-1143.

10 Hemingway R.W., McGraw, G.W. and Barras, S. J. (1977). Polyphenols in *Ceratocystis minor* infected *Pinus taeda*: Fungal Metabolites, phloem and xylem phenols. *J. Agric. Food Chem.*, 25, 717-722.

Juvvadi, P.R., Seshime, Y., Kitamoto, K. (2005). Genomics reveals traces of fungal phenylpropanoid-flavonoid metabolic pathway in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *J Microbiol.* 43, 475-486.

Juretzek T, Le Dall M, Mauersberger S, Gaillardin C, Barth G, Nicaud J. Vectors for gene expression and amplification in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Yeast.* 2001;18:97-113.

15 Kaneko, M., Ohnishi, Y. and Horinouchi, S. Cinnamate:Coenzyme (2003). A ligase from the Filamentous Bacteria *Streptomyces coelicolor* A3(2), *J. Bact.* 185, 20-27.

Kindl, H. (1985) Biosynthesis of stilbenes. In Higuchi T, ed, *Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components*. Academic Press, London, pp 349-377.

20 Kodan, A., Kuroda, H. and Sakai, F. (2002). A stilbene synthase from Japanese red pine (*Pinus densiflora*): Implications for phytoalexin accumulation and down-regulation of flavonoid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 3335-3339.

Le Dall MT, Nicaud JM, Gaillardin C. Multiple-copy integration in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Curr Genet.* 1994;26:38-44.

25 Lieutier, F., Sauvard, D., Brignolas, F., Picron, V., Yart, A., Bastien, C. and Jay-Allemand, C. (1996) Changes in phenolic metabolites of Scots pine phloem induced by *Ophiostoma brunneo-ciliatum*, a bark beetle-associated fungus. *Eur. J. For Pathol.* 26, 145-158

Lindberg LE, Willfor SM, Holmbom BR. (2004) Antibacterial effects of knotwood extractives on paper mill bacteria. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 31, 137-147.

30 Madzak C, Gaillardin C, Beckerich JM. Heterologous protein expression and secretion in the nonconventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review. *J Biotechnol.* 2004;109:63-81.

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

Melchior F, Kindl H (1991). Coordinate and elicitor dependent expression of stilbene synthase and phenylalanine ammonia-lyase genes in *Vitis cv. Optima*. *Arch. Biochem. Biophys* 288, 552-557.

35 Mellanen, P., Petanen, T., Lehtimäki, J., Makela, S., Bylund, G., Holmbom, B., Mannila, E., Oikari, A. and Santti, R. (1996). Wood-derived estrogens: studies in vitro with breast cancer cell lines and in vivo in trout. *Toxicol. App. Pharm.* 136, 381-388.

40 Merkulov S, van Assema F, Springer J, Fernandez Del Carmen A, Mooibroek H. Cloning and characterization of the *Yarrowia lipolytica* squalene synthase (SQS1) gene and functional complementation of the *Saccharomyces cerevisiae* *erg9* mutation. *Yeast.* 2000;16:197-206.

Mizutani M and Ohta D et al, 1998 Two Isoforms of NADPH: Cytochrome P450 Reductase in *Arabidopsis thaliana*. *Gene Structure, Heterologous Expression in Insect Cells, and Differential Regulation Plant Physiol.* 116, 357-367

Morita, H., Noguchi, H., Schröder, J. and Abe, I. (2001). Novel polyketides synthesized with a higher plant stilbene

synthase. Eur. J. Biochem. 268, 3759-3766.

Müller S, Sandal T, Kamp-Hansen P, Dalbøge H. Comparison of expression systems in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Schizosaccharomyces pombe* and *Yarrowia lipolytica*. Cloning of two novel promoters from *Yarrowia lipolytica*. Yeast. 1998;14:1267-83.

- 5 Nicaud JM, Madzak C, van den Broek P, Gysler C, Duboc P, Niederberger P, Gaillardin C. Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia lipolytica*. FEMS Yeast Res. 2002;2:371-9.

Pignède G, Wang HJ, Fudalej F, Seman M, Gaillardin C, Nicaud JM. Autoclone and amplification of LIP2 in *Yarrowia lipolytica*. Appl Environ Microbiol. 2000;66:3283-9.

- 10 Preisig-Muller, R., Schwekendiek, A., Brehm, I., Reif, H.J. and Kindl, H. (1999). Characterization of a pine multigene family containing elicitor-responsive stilbene synthase genes. Plant Mol. Biol. 1999 39, 221-229.

Pacher T, Seger C, Engelmeier D, Vajrodaya S, Hofer O, Greger H. (2002). Antifungal stilbenoids from *Stemona collinsae*. J Nat Prod. 65, 820-827.

- 15 Raiber S, Schröder G, Schröder J. (1995). Molecular and enzymatic characterization of two stilbene synthases from Eastern white pine (*Pinus strobus*). A single Arg/His difference determines the activity and the pH dependence of the enzymes. FEBS Lett. 361, 299-302.

Richter, C., Wild, A. (1992). Phenolic compounds in needles of Norway spruce trees in relation to novel forest decline: I. Studies on trees from site of the Northern Black Forest. Biochem. Biophys. Pflanz 188, 305-320.

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

Rosemann, D., Heller, W. and Sandermann, H. (1991). Biochemical Plant Responses to Ozone. II. Induction of Stilbene Biosynthesis in Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.) Seedlings. J. Plant Physiol. 97, 1280-1286.

Roupe, K.A., Fukuda, C., Halls, S., Yáñez, J.A. and Davies N.M. (2005) Pinosylvin: Method of Analysis, Anti-Cancer Activity and Metabolism. American Association of Pharmaceutical Scientists Annual Meeting. November. Accepted.

- 25 Roupe, K.A., Remsberg, C.M., Yáñez, J.A. and Davies, N.M. (2006). Pharmacometrics of Stilbenes: Seguing Towards the Clinic. Curr. Clin. Pharmac. 1, 81-101.

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

- 30 Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d edition, Cold Spring Harbor, N.Y.

Schanz, S., Schröder, G. and Schröder, J. (1992). Stilbene synthase from Scot's pine (*Pinus sylvestris*) FEBS Lett. 313, 71-74.

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

- 35 Schröder G, Brown JWS, Schröder J. (1988). Molecular analysis of resveratrol synthase. cDNA clones and relationship with chalcone synthase. Eur J Biochem 172, 161-169.

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

- 40 Skinnider, L. and Stoessl A. (1986). The effect of the phytoalexins, lubimin, (-)-maackiain, pinosylvin, and the related compounds dehydroloroglossol and hordatine M on human lymphoblastoid cell lines. Experientia 42, 568-570.

Stojanovic, S., Sprinz, H. and Brede, O. (2001). Efficiency and mechanism of the anti-oxidant action of transresveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. Arch. Biochem. Biophys. 391, 79-89.

Suga T., Ohta S., Munesada K., Ide N., Kurokawa M., Shimizu M., Ohta E. (1993). Endogenous pine wood

nematicidal substances in pines, *Pinus massoniana*, *P. strobus* and *P. palustris*. *Phytochemistry* 33, 1395-1401.

Tropf, S., Karcher, B., Schröder, G. and Schröder, J. (1995). Reaction mechanisms of homodimeric plant polyketide synthase (stilbenes and chalcone synthase). A single active site for the condensing reaction is sufficient for synthesis of stilbenes, chalcones, and 6'-deoxychalcones. *J. Biol. Chem.* 270, 7922-7928.

- 5 Urban P, Werck-Reichhart D, Teutsch HG, Durst F, Regnier S, Kazmaier M, Pompon D (1994) Characterization of recombinant plant cinnamate 4-hydroxylase produced in yeast. Kinetic and spectral properties of the major plant P450 of the phenylpropanoid pathway. *Eur J Biochem.* 222:843-50

Verduyn C, Postma E, Scheffers WA, Van Dijken JP. (1992). Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast.* 8, 501-517.

- 10 Watts et al; Watts KT, Mijts BN, Lee PC, Manning AJ, Schmidt-Dannert C.(2006). Discovery of a substrate selectivity switch in tyrosine ammonia-lyase, a member of the aromatic amino acid lyase family. *Chem Biol.* 13:1317-26.

Wiese W, Vornam B, Krause E, Kindl H (1994). Structural organization and differential expression of three stilbene synthase genes located on a 13 kb grapevine DNA fragment. *Plant Mol Biol* 26, 667-677.

Lo que sigue es un resumen de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos que aparecen aquí:

- 15 SEQ ID NO: 1 es una secuencia de nucleótidos de *Arabidopsis thaliana* que codifica una fenilalanina amoníaco liasa (PAL2).

SEQ ID NO: 2 es la secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 3 es una secuencia de nucleótidos de *Arabidopsis thaliana* que codifica una 4-cumarate:CoenzimaA ligasa (4CL1).

- 20 SEQ ID NO: 4 es la secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID NO: 3.

SEQ ID NO: 5 es una secuencia de nucleótidos de *Rheum tataricum* que codifica una resveratrol sintasa (RES).

SEQ ID NO: 6 es la secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID NO: 5.

SEQ ID NO: 7 es una secuencia de nucleótidos de *Rheum tataricum* que codifica una resveratrol sintasa (RES), la cual es optimizada por codón para expresión en *S. cerevisiae*.

- 25 SEQ ID NO: 8 es la secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID NO: 7.

SEQ ID NO: 9 es una secuencia de nucleótidos de *Vitis vinifera* que codifica una resveratrol sintasa (VST1), la cual es optimizada por codón para expresión en *S. cerevisiae*.

SEQ ID NO: 10 es la secuencia de aminoácidos codificada por SEQ ID NO: 9.

SEQ ID NOS 11-16 son secuencias de cebador que aparecen en la Tabla 1, Ejemplo 1.

- 30 SEQ ID Nos 17 a 22 son secuencias de cebador usadas en el Ejemplo 16a.

SEQ ID Nos 23 a 26 son secuencias de cebador usadas en el Ejemplo 16b.

SEQ ID Nos 27 a 30 son secuecias de cebador usadas en el Ejemplo 16c.

PhoenixTemp45986.tmp.txt

Listado de secuencias

- 35 <110> Fluxome Sciences A/S

<120> Células modificadas metabólicamente para la producción de pinosilvina

<130> PJS/P15302wo

<150> GB 0614442.2

<151> 2006-07-06

<160> 30

<170> Patentin versión 3.3

5 <210> 1
<211> 2154
<212> ADN
<213> Arabidopsis thaliana

10 <400> 1

```

atggatcaaa tcgaagcaat gttgtgcggc ggaggagaga agacaaaagt ggcggttact      60
acgaagactt tggcagatcc attgaattgg ggtttagcag cggatcaaat gaaaggaagt      120
catttagatg aagtgaagaa gatggtcgaa gagtatcgta gaccagtcgt gaatcttggc      180
ggagaaacac tgacgatcgg acaagttgct gccatctcca ccgtaggagg cagcgttaag      240
gttgagttag cggagacttc aagagccggt gtgaaagcta gcagtgattg ggttatggag      300
agcatgaaca aaggtactga cagttacgga gtcaccaccg gctttggtgc tacttctcac      360
cggagaacca aaaacggcac cgcattacaa acagaactca ttagattttt gaacgccgga      420
atattcggaa acacgaagga gacatgtcac acactgccgc aatccgccac aagagccgcc      480
atgctcgtca gagtcaacac tcttctccaa ggatactccg ggatccgatt cgagatcctc      540
gaagcgatta caagtctcct caaccacaac atctctccgt cactacctct ccgtggaacc      600
attaccgcct ccggcgatct cgttcctctc tcttacatcg ccggacttct caccggccgt      660
cctaattcca aagccaccgg tcccgacggt gaatcgctaa ccgcgaaaga agcttttgag      720
aaagccggaa tcagtactgg attcttcgat ttacaaccta aggaagggtt agctctcggt      780
aatggcacgg cggttggatc tggaatggcg tcgatggttc tattcgaagc gaatgtccaa      840
gcggtgtag cggaggtttt atcagcgatc ttcgcggagg ttatgagcgg gaaacctgag      900
tttaccgatc atctgactca tcgtttaaaa catcatcccg gacaaatcga agcggcggcg      960
ataatggagc acatactcga cggagactca tacatgaaat tagctcaaaa gggtcacgag     1020
atggatccat tgcagaaacc aaaacaagat cgttacgctc ttcgtacatc tcctcaatgg     1080
ctaggtcctc aaattgaagt aatccgtcaa gctacgaaat cgatagagcg tgaaatcaac     1140
tccgttaacg ataatccgtt gatcgatggt tcgaggaaca aggcgattca cggtggtaac     1200
ttccaaggaa caccaatcgg agtttctatg gataacacga gattggcgat tgctgcgatt     1260
gggaagctaa tgtttgctca attctctgag cttgttaatg atttctacaa caatggactt     1320
ccttcgaatc taactgcttc gagtaatcca agtttggtt atggattcaa aggagcagag     1380
attgctatgg cttcttattg ttctgagctt caatacttgg ctaatccagt cacaagccat     1440

```

gttcaatcag ctgagcaaca taatcaagat gtgaactctc ttggtttgat ctcgtctcgt 1500
 aaaacatctg aagctgtgga tattcttaag ctaatgtcaa caacgttcct tgtggggata 1560
 tgtcaagctg ttgatttgag acatttggag gagaatctga gacaaactgt gaagaacaca 1620
 gtttctcaag ttgctaagaa agtgtaacc actggaatca acggtgagtt acatccgtca 1680
 aggttttgcg agaaggactt gcttaagggtt gttgatcgtg agcaagtgtt cacgtatgtg 1740
 gatgatcctt gtagcgctac gtaccggtt atgcagagac taagacaagt tattgttgat 1800
 cacgctttgt ccaacggtga gactgagaag aatgcagtga cttcgatctt tcaaaagatt 1860
 ggagcttttg aagaggagct taaggctgtg cttccaaagg aagttgaagc ggctagagcg 1920
 gcttatggga atggaactgc gccgattcct aaccggatta aggaatgtag gtcgtatccg 1980
 ttgtataggt tcgtgagggg agagcttggg acgaagttgt tgactggaga aaaggttgtg 2040
 tctccgggag aggagtttga taaggcttct actgctatgt gtgaaggtaa acttattgat 2100
 ccggttgatgg attgtctcaa ggaatggaac ggagctccga ttccgatttg ctaa 2154

<210> 2

<211> 717

<212> PRT

5 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

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

ES 2 585 477 T3

145					150						155				160
Met	Leu	Val	Arg	Val ₁₆₅	Asn	Thr	Leu	Leu	Gln ₁₇₀	Gly	Tyr	Ser	Gly	Ile ₁₇₅	Arg
Phe	Glu	Ile	Leu ₁₈₀	Glu	Ala	Ile	Thr	Ser ₁₈₅	Leu	Leu	Asn	His	Asn ₁₉₀	Ile	Ser
Pro	Ser	Leu ₁₉₅	Pro	Leu	Arg	Gly	Thr ₂₀₀	Ile	Thr	Ala	Ser	Gly ₂₀₅	Asp	Leu	Val
Pro	Leu ₂₁₀	Ser	Tyr	Ile	Ala	Gly ₂₁₅	Leu	Leu	Thr	Gly	Arg ₂₂₀	Pro	Asn	Ser	Lys
Ala ₂₂₅	Thr	Gly	Pro	Asp	Gly ₂₃₀	Glu	Ser	Leu	Thr	Ala ₂₃₅	Lys	Glu	Ala	Phe	Glu ₂₄₀
Lys	Ala	Gly	Ile	Ser ₂₄₅	Thr	Gly	Phe	Phe	Asp ₂₅₀	Leu	Gln	Pro	Lys	Glu ₂₅₅	Gly
Leu	Ala	Leu	Val ₂₆₀	Asn	Gly	Thr	Ala	Val ₂₆₅	Gly	Ser	Gly	Met	Ala ₂₇₀	Ser	Met
Val	Leu	Phe ₂₇₅	Glu	Ala	Asn	Val	Gln ₂₈₀	Ala	Val	Leu	Ala	Glu ₂₈₅	Val	Leu	Ser
Ala	Ile ₂₉₀	Phe	Ala	Glu	Val	Met ₂₉₅	Ser	Gly	Lys	Pro	Glu ₃₀₀	Phe	Thr	Asp	His
Leu ₃₀₅	Thr	His	Arg	Leu	Lys ₃₁₀	His	His	Pro	Gly	Gln ₃₁₅	Ile	Glu	Ala	Ala ₃₂₀	
Ile	Met	Glu	His	Ile ₃₂₅	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser ₃₃₀	Tyr	Met	Lys	Leu	Ala ₃₃₅	Gln
Lys	Val	His	Glu ₃₄₀	Met	Asp	Pro	Leu	Gln ₃₄₅	Lys	Pro	Lys	Gln	Asp ₃₅₀	Arg	Tyr
Ala	Leu	Arg ₃₅₅	Thr	Ser	Pro	Gln	Trp ₃₆₀	Leu	Gly	Pro	Gln	Ile ₃₆₅	Glu	Val	Ile
Arg	Gln ₃₇₀	Ala	Thr	Lys	Ser	Ile ₃₇₅	Glu	Arg	Glu	Ile	Asn ₃₈₀	Ser	Val	Asn	Asp
Asn ₃₈₅	Pro	Leu	Ile	Asp	Val ₃₉₀	Ser	Arg	Asn	Lys	Ala ₃₉₅	Ile	His	Gly	Gly	Asn ₄₀₀
Phe	Gln	Gly	Thr	Pro ₄₀₅	Ile	Gly	Val	Ser	Met ₄₁₀	Asp	Asn	Thr	Arg	Leu ₄₁₅	Ala
Ile	Ala	Ala	Ile ₄₂₀	Gly	Lys	Leu	Met	Phe ₄₂₅	Ala	Gln	Phe	Ser	Glu ₄₃₀	Leu	Val

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5 <210> 3
<211> 1686
<212> ADN
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 3

```

atggcgccac aagaacaagc agtttctcag gtgatggaga aacagagcaa caacaacaac   60
agtgacgtca ttttccgata aaagttaccg gatatttaca tcccgaacca cctatctctc   120
cacgactaca tcttccaaaa catctccgaa ttcgccacta agccttgcct aatcaacgga   180
ccaaccggcc acgtgtacac ttactccgac gtccacgtca tctcccgcca aatcgccgcc   240
aattttcaca aactcggcgt taaccaaacc gacgtcgtca tgctcctcct cccaaactgt   300
cccgaattcg tcctctcttt cctcgcgcgc tccttcgcgc gcgcaaccgc caccgcccga   360
aaccctttct tcaactcggc ggagatagct aaacaagcca aagcctccaa caccaaactc   420
ataatcaccg aagctcgtta cgtcgacaaa atcaaaccac ttcaaaacga cgacggagta   480
gtcatcgtct gcacgcagca caacgaatcc gtgccaatcc ctgaaggctg cctccgcttc   540
accgagttga ctacgtcgac aaccgaggca tcagaagtca tcgactcggg ggagatttca   600
ccggacgacg tgggtggcact accttactcc tctggcacga cgggattacc aaaaggagtg   660
atgctgactc acaagggact agtcacgagc gttgctcagc aagtcgacgg cgagaacccg   720
aatctttatt tccacagcga tgacgtcata ctctgtgttt tgcccatggt tcatatctac   780
gctttgaact cgatcatggt gtgtggtctt agagttgggt cggcgattct gataatgccg   840
aagtttgaga tcaatctgct attggagctg atccagaggt gtaaagtgcg ggtggctccg   900
atggttccgc cgattgtggt ggccattgca aagtccttcg agacggagaa gtatgatttg   960
agctcgataa gagtggtgaa atctggtgct gctcctcttg gtaaagaact tgaagatgcc  1020
gttaatgccg agtttcctaa tgccaaactc ggtcagggat acggaatgac ggaagcaggt  1080
ccagtgcctg caatgtcgtt aggttttgca aaggaacctt ttccgggtta gtcaggagct  1140
tgtggtactg ttgtaagaaa tgctgagatg aaaatagttg atccagacac cggagattct  1200
ctttcgagga atcaaccggt tgagatttgt attcgtggtc accagatcat gaaagggtac  1260
ctcaacaatc cggcagctac agcagagacc attgataaag acggttggtc tcatactgga  1320
gatattggat tgatcgatga cgatgacgag cttttcatcg ttgatcgatt gaaagaactt  1380
atcaagtata aaggttttca ggtagctccg gctgagctag aggctttgct catcggtcat  1440
cctgacatta ctgatgttgc tgttgcgcga atgaaagaag aagcagctgg tgaagttcct  1500
gttgcatatt tgggtgaaatc gaaggattcg gagttatcag aagatgatgt gaagcaattc  1560
gtgtcgaaac aggttggtgt ttacaagaga atcaacaaag tgttcttcac tgaatccatt  1620
cctaaagctc catcagggaa gatattgagg aaagatctga gggcaaaact agcaaatgga  1680
ttgtga                                     1686

```

<210> 4
<211> 561
<212> PRT
<213> Arabidopsis thaliana

5

<400> 4

Met Ala Pro Gln Glu Gln Ala Val Ser Gln Val Met Glu Lys Gln Ser
 1 5 10 15
 Asn Asn Asn Asn Ser Asp Val Ile Phe Arg Ser Lys Leu Pro Asp Ile
 20 25 30
 Tyr Ile Pro Asn His Leu Ser Leu His Asp Tyr Ile Phe Gln Asn Ile
 35 40 45
 Ser Glu Phe Ala Thr Lys Pro Cys Leu Ile Asn Gly Pro Thr Gly His
 50 55 60
 Val Tyr Thr Tyr Ser Asp Val His Val Ile Ser Arg Gln Ile Ala Ala
 65 70 75 80
 Asn Phe His Lys Leu Gly Val Asn Gln Asn Asp Val Val Met Leu Leu
 85 90 95
 Leu Pro Asn Cys Pro Glu Phe Val Leu Ser Phe Leu Ala Ala Ser Phe
 100 105 110
 Arg Gly Ala Thr Ala Thr Ala Ala Asn Pro Phe Phe Thr Pro Ala Glu
 115 120 125
 Ile Ala Lys Gln Ala Lys Ala Ser Asn Thr Lys Leu Ile Ile Thr Glu
 130 135 140
 Ala Arg Tyr Val Asp Lys Ile Lys Pro Leu Gln Asn Asp Asp Gly Val
 145 150 155 160
 Val Ile Val Cys Ile Asp Asp Asn Glu Ser Val Pro Ile Pro Glu Gly
 165 170 175
 Cys Leu Arg Phe Thr Glu Leu Thr Gln Ser Thr Thr Glu Ala Ser Glu
 180 185 190
 Val Ile Asp Ser Val Glu Ile Ser Pro Asp Asp Val Val Ala Leu Pro
 195 200 205
 Tyr Ser Ser Gly Thr Thr Gly Leu Pro Lys Gly Val Met Leu Thr His
 210 215 220
 Lys Gly Leu Val Thr Ser Val Ala Gln Gln Val Asp Gly Glu Asn Pro
 225 230 235 240
 Asn Leu Tyr Phe His Ser Asp Asp Val Ile Leu Cys Val Leu Pro Met

ES 2 585 477 T3

245										250					255				
Phe	His	Ile	Tyr 260	Ala	Leu	Asn	Ser	Ile 265	Met	Leu	Cys	Gly	Leu 270	Arg	Val				
Gly	Ala	Ala 275	Ile	Leu	Ile	Met	Pro 280	Lys	Phe	Glu	Ile	Asn 285	Leu	Leu	Leu				
Glu	Leu 290	Ile	Gln	Arg	Cys	Lys 295	Val	Thr	Val	Ala	Pro 300	Met	Val	Pro	Pro				
Ile 305	Val	Leu	Ala	Ile	Ala 310	Lys	Ser	Ser	Glu	Thr 315	Glu	Lys	Tyr	Asp	Leu				
Ser	Ser	Ile	Arg	Val 325	Val	Lys	Ser	Gly	Ala 330	Ala	Pro	Leu	Gly	Lys 335	Glu				
Leu	Glu	Asp	Ala 340	Val	Asn	Ala	Lys	Phe 345	Pro	Asn	Ala	Lys	Leu 350	Gly	Gln				
Gly	Tyr	Gly 355	Met	Thr	Glu	Ala	Gly 360	Pro	Val	Leu	Ala	Met 365	Ser	Leu	Gly				
Phe	Ala 370	Lys	Glu	Pro	Phe	Pro 375	Val	Lys	Ser	Gly	Ala 380	Cys	Gly	Thr	Val				
Val 385	Arg	Asn	Ala	Glu	Met 390	Lys	Ile	Val	Asp	Pro 395	Asp	Thr	Gly	Asp	Ser 400				
Leu	Ser	Arg	Asn	Gln 405	Pro	Gly	Glu	Ile	Cys 410	Ile	Arg	Gly	His 415	Gln	Ile				
Met	Lys	Gly	Tyr 420	Leu	Asn	Asn	Pro	Ala 425	Ala	Thr	Ala	Glu	Thr 430	Ile	Asp				
Lys	Asp	Gly 435	Trp	Leu	His	Thr	Gly 440	Asp	Ile	Gly	Leu	Ile 445	Asp	Asp	Asp				
Asp	Glu 450	Leu	Phe	Ile	Val	Asp 455	Arg	Leu	Lys	Glu	Leu 460	Ile	Lys	Tyr	Lys				
Gly 465	Phe	Gln	Val	Ala	Pro 470	Ala	Glu	Leu	Glu	Ala 475	Leu	Leu	Ile	Gly	His 480				
Pro	Asp	Ile	Thr	Asp 485	Val	Ala	Val	Val	Ala 490	Met	Lys	Glu	Glu	Ala 495	Ala				
Gly	Glu	Val	Pro 500	Val	Ala	Phe	Val	Val 505	Lys	Ser	Lys	Asp	Ser 510	Glu	Leu				
Ser	Glu	Asp 515	Asp	Val	Lys	Gln	Phe 520	Val	Ser	Lys	Gln 525	Val	Val	Phe	Tyr				

Lys Arg Ile Asn Lys Val Phe Phe Thr Glu Ser Ile Pro Lys Ala Pro
530 535 540

Ser Gly Lys Ile Leu Arg Lys Asp Leu Arg Ala Lys Leu Ala Asn Gly
545 550 555 560

Leu

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

<400> 5

```
atggcaccgg aggagtccag gcatgctgaa actgcagtta acagagccgc caccgtcctg      60
gccatcggca ctgccaaacc gccaaactgc tactatcaag cggactttcc tgactttctac      120
ttccgtgcc acaacagcga ccacctcacg cacctcaagc aaaaatttaa ggcgatttgt      180
gagaaatcga tgattgaaaa acgttatctc catttgacgg aagaaattct caaggagaat      240
ccaaatattg cttccttcga ggcgccatca ttggatgtaa gacataacat tcaagtga aa      300
gaagtgggtg tgctcggaaa agaggcagct ttgaaggcca tcaatgagtg gggccaaccc      360
aagtcaaaga tcacgcgcct cattgtgtgt tgtattgccg gcgttgacat gccggcgca      420
gactatcaac tactaaact ccttggctta caactttctg ttaagcgatt tatgttttac      480
cacctaggat gctatgccgg tggcaccgtc cttcgccttg cgaaggacat agcagaaaac      540
aacaaggaag ctcgtgttct catcgttcgc tctgagatga cgccaatctg tttccgtggg      600
ccatccgaaa cccacataga ctccatggta gggcaagcaa tatttggtga cgggtgctgcg      660
gctgttatag ttggtgcaaa tcccgaaccta tccatcgaaa ggccgatttt cgagttgatt      720
tctacatccc aaactatcat acctgaatcc gatgggtgca ttgagggaca tttgcttgaa      780
gttggactca gtttccaact ctaccagact gttccctcat taatctctaa ttgtatcgaa      840
acttgctctt caaaggcttt cacacctctt aacattagtg attggaactc actattctgg      900
attgcacacc ctggtggccg tgctatcctt gacgatatcg aggtactgt tggctctcaag      960
aaggagaaac ttaaggcaac aagacaagtt ttgaacgact atgggaacat gtcaagtgt      1020
tgcgatattt tcatcatgga tgagatgagg aagaagtcgc tcgcaaacgg tcaagtaacc      1080
actggagaag gactcaagtg ggggtgttctt tttgggttcg ggccaggtgt tactgtggaa      1140
actgtggttc taagcagtgt gccgctaatt acctga      1176
```

<210> 6
10 <211> 391
<212> PRT
<213> Rheum tataricum

<400> 6

Met Ala Pro Glu Glu Ser Arg His Ala Glu Thr Ala Val Asn Arg Ala

ES 2 585 477 T3

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ser Val Pro Leu Ile Thr
385 390

<210> 7

<211> 1176

<212> ADN

5 <213> Rheum tataricum

<400> 7

```

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

tgtgtatttt tcattatgga tgagatgaga aaaaagtcac ttgcaaatgg ccaggtcacg      1080
acaggtgagg gtctaaaatg gggagtccta ttcggattcg gcccagggtg cactgttgaa      1140
accgttgtcc tgtcttcggt tccattgatc acttaa                                1176

```

<210> 8

<211> 391

5 <212> PRT

<213> Rheum tataricum

<400> 8

ES 2 585 477 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ser Val Pro Leu Ile Thr
385 390

<210> 9

<211> 1182

<212> ADN

5 <213> Vitis vinifera

<400> 9

atggcatccg tagaggagtt cagaaatgca cagagggcaa aaggtccagc aaccatattg	60
gctattggaa cagccacccc tgatcactgt gtttatcaat ctgattacgc tgattactat	120
ttcagagtaa ctaaaagtga acatatgaca gaacttaaga aaaagtttaa tagaatttgt	180
gataaatcta tgataaagaa aagatacata catctaactg aagaaatggt agaggaacat	240
ccaaatatag gtgcatatat ggcaccatct ttgaatatta gacaagaaat cataacagcc	300
gaggtaccta gactaggtag agacgcagcc ttgaaagctt taaaggaatg gggacaacca	360
aaatctaaga ttacacattt ggttttctgt acaacttccg gtgtcgaaat gccagggtgt	420
gattataaac tagcaaactt attgggatta gagacctctg ttagaagagt tatgttgtat	480
catcaagggtt gttacgccgg aggtacagtg cttagaactg ctaaggattt ggcagaaaat	540
aacgccggtg ctagggtttt agtcgtctgc agtgaaatca ctgtcgtaac tttcagaggt	600
ccatcagaag atgctctaga cagtttggtc ggacaagcat tgtttggcga tggatcttcc	660
gccgtaattg taggcagcga tcctgatgtg tccattgaaa gaccactatt tcaattagtt	720
tctgctgctc aaacttttat tccaaattcc gccggtgcc tagcaggaaa cttgagagaa	780
gttggtttga cttttcattt gtggcctaata gtcccaacct taatttcaga aaacatcgaa	840
aatgcttaa ctcaagcctt tgaccatttg ggcataagcg actggaactc attgttttgg	900
attgctcatc caggtggtcc agcaatttta gacgcagtg aggcaaaact aaacttagag	960
aagaaaaagt tggaagctac aagacacgtt ctatcagagt atggcaacat gagctctgcc	1020
tgcgttttat tcattctaga tgagatgagg aagaagtctt taaaggggtga aaaagccaca	1080
accggagaag gtttagattg ggggtgttcta tttggtttcg gtcctggctt aacaattgag	1140
acagtgggtg tacactctgt tccaactgtc actaactaat ga	1182

<210> 10
 <211> 392
 <212> PRT
 <213> Vitis vinífera
 <400> 10

5

ES 2 585 477 T3

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

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

Leu Ala Glu Asn Asn Ala Gly Ala Arg Val Leu Val Val Cys Ser Glu
 180 185 190

Ile Thr Val Val Thr Phe Arg Gly Pro Ser Glu Asp Ala Leu Asp Ser
 195 200 205

Leu Val Gly Gln Ala Leu Phe Gly Asp Gly Ser Ser Ala Val Ile Val
 210 215 220

Gly Ser Asp Pro Asp Val Ser Ile Glu Arg Pro Leu Phe Gln Leu Val
 225 230 235 240

Ser Ala Ala Gln Thr Phe Ile Pro Asn Ser Ala Gly Ala Ile Ala Gly
 245 250 255

Asn Leu Arg Glu Val Gly Leu Thr Phe His Leu Trp Pro Asn Val Pro
 260 265 270

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

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

Gly Gly Pro Ala Ile Leu Asp Ala Val Glu Ala Lys Leu Asn Leu Glu
 305 310 315 320

Lys Lys Lys Leu Glu Ala Thr Arg His Val Leu Ser Glu Tyr Gly Asn
 325 330 335

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

Ser Leu Lys Gly Glu Lys Ala Thr Thr Gly Glu Gly Leu Asp Trp Gly
 355 360 365

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

His Ser Val Pro Thr Val Thr Asn
 385 390

<210> 11

<211> 33

<212> ADN

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 11
cggaattctc atggatcaaa tcgaagcaat gtt 33

5 <210> 12
<211> 29
<212> ADN
<213> Arabidopsis thaliana

10 <400> 12
cgactagttt agcaaacgg aatcggagc 29

<210> 13
<211> 36
15 <212> ADN
<213> Arabidopsis thaliana

<400> 13
gctctagacc tatggcgcca caagaacaag cagttt 36

20 <210> 14
<211> 36
<212> ADN
<213> Arabidopsis thaliana

25 <400> 14
gcggatcccc ttcacaatcc attgctagt ttgcc 36

<210> 15
30 <211> 31
<212> ADN
<213> Rheum tartaricum

<400> 15
35 ccggatccaa atggccccag aagagagcag g 31

<210> 16
<211> 35
<212> ADN
40 <213> Rheum tartaricum

<400> 16
cgctcgagtt aagtgatcaa tggaaccgaa gacag 35

45 <210> 17
<211> 32
<212> ADN
<213> Aspergillus nidulans

50 <400> 17
cggaattcat acgcggtttt ttgggtagt ca 32

<210> 18
<211> 32
55 <212> ADN
<213> Aspergillus nidulans

<400> 18
cgcccgggta tgccacctac agccattgcg aa 32

60 <210> 19
<211> 32

<212> ADN

<213> Aspergillus nidulans
 <400> 19
 gcggatccat agggcgctta cacagtacac ga 32
 5
 <210> 20
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Aspergillus nidulans
 10
 <400> 20
 cggagagggc gcgcccggtg cggccgcgga tccactaac gttactga 48
 15
 <210> 21
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Aspergillus nidulans
 20
 <400> 21
 gcggccgcca cgggcgcgcc ctctccggcg gtagtgatgt ctgctcaa 48
 25
 <210> 22
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Aspergillus nidulans
 30
 <400> 22
 cgaagcttta taattccctt gtatctctac ac 32
 35
 <210> 23
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> Cebador para PCR basado en plásmido para el gen C4H
 45
 <400> 23
 cggcgcgcat aatggacctc ctcttgctgg ag 32
 50
 <210> 24
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> Cebador para PCR basado en plásmido para el gen C4H
 60
 <400> 24
 gggcggccgc ttattaacag ttccttggtt tcataacg 38
 65
 <210> 25
 <211> 56
 <212> ADN
 <213> Aspergillus fumigatus
 70
 <400> 25
 cgtgtacaat attaattaac gagagcgatc gcaataaccg tattaccgcc ttgag 56
 75
 <210> 26
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Aspergillus fumigatus
 80
 <400> 26

cgacatgtat tcccgggaag atctcatggt ca 32

<210> 27
 <211> 35
 5 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador para PCR basado en plásmido para el gen VST1

10 <400> 27
 gcggagaggg cgcgatggcg ccacaagaac aagca 35

<210> 28
 15 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 20 <223> Cebador basado en plásmido para el gen VST1

<400> 28
 tggatccgcg gccgctcaca atccattgac tagttttgc 39

25 <210> 29
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Secuencia de cebador para PCR basado en plásmido para el gen VST1

<400> 29
 35 cggcgcgcat aatggcatcc gtagaggagt tc 32

<210> 30
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Secuencia de cebador para PCR basado en plásmido para el gen VST1

<400> 30
 45 gggcggccgc ttatcattag ttagtgacag ttggaa 36

Reivindicaciones

1. El uso de un microorganismo modificado genéticamente para la producción de pinosilvina, en donde dicho microorganismo es una bacteria u hongo y en donde dicho microorganismo tiene una ruta metabólica operativa, produciendo dicha ruta pinosilvina a partir de ácido cinámico y comprendiendo al menos una primera actividad enzimática para formar cinamoil-CoA a partir de ácido cinámico y una estilbeno sintasa, en donde dicha estilbeno sintasa es expresada en dicho microorganismo a partir de un ácido nucleico que codifica para dicha enzima la cual no es nativa del microorganismo.
2. El uso reivindicado en la reivindicación 1, en donde dicho microorganismo produce ácido cinámico y produce pinosilvina a partir del mismo.
3. El uso reivindicado en la reivindicación 1, en donde dicha estilbeno sintasa es resveratrol sintasa (EC 2.3.1.95) a partir de una planta que pertenece al género de *Arachis*, una planta que pertenece al género de *Rheum*, o una planta que pertenece al género de *Vitis* o uno cualquiera de los géneros *Pinus*, *Picea*, *Lilium*, *Eucalyptus*, *Parthenocissus*, *Cissus*, *Calochortus*, *Polygonum*, *Gnetum*, *Artocarpus*, *Nothofagus*, *Phoenix*, *Festuca*, *Carex*, *Veratrum*, *Bauhinia* o *Pterolobium* o es una pinosilvina sintasa (EC 2.3.1.146) de una planta que pertenece al género de *Pinus*, e.g. *P. sylvestris*, *P. strobes*, *P. densiflora*, *P. taeda*, una planta que pertenece al género *Picea*, o uno cualquiera de los géneros *Eucalyptus*.
4. El uso reivindicado de cualquier reivindicación precedente, en donde dicho ácido cinámico es producido en dicha ruta a partir de L-fenilalanina mediante una L-fenilalanina amoníaco liasa (PAL) expresada en dicho microorganismo a partir de ácido nucleico que codifica dicha enzima la cual no es nativa del microorganismo.
5. El uso reivindicado en la reivindicación 4, en donde dicho ácido cinámico es formado a partir de L-fenilalanina por la L-fenilalanina amoníaco liasa (EC 4.3.1.5) de una planta que pertenece al género de *Arabidopsis*, una planta que pertenece al género de *Brassica*, una planta que pertenece al género de *Citrus*, una planta que pertenece al género de *Phaseolus*, una planta que pertenece al género de *Pinus*, una planta que pertenece al género de *Populus*, una planta que pertenece al género de *Solanum*, una planta que pertenece al género de *Prunus*, una planta que pertenece al género de *Vitis*, una planta que pertenece al género de *Zea*, o una planta que pertenece a uno cualquiera de los géneros *Agastache*, *Ananas*, *Asparagus*, *Bromheadia*, *Bambusa*, *Beta*, *Betula*, *Cucumis*, *Camellia*, *Capsicum*, *Cassia*, *Catharanthus*, *Cicer*, *Citrullus*, *Coffea*, *Cucurbita*, *Cynodon*, *Daucus*, *Dendrobium*, *Dianthus*, *Digitalis*, *Dioscorea*, *Eucalyptus*, *Gallus*, *Ginkgo*, *Glycine*, *Hordeum*, *Helianthus*, *Ipomoea*, *Lactuca*, *Lithospermum*, *Lotus*, *Lycopersicon*, *Medicago*, *Malus*, *Manihot*, *Medicago*, *Mesembryanthemum*, *Nicotiana*, *Olea*, *Oryza*, *Pisum*, *Persea*, *Petroselinum*, *Phalaenopsis*, *Phyllostachys*, *Physcomitrella*, *Picea*, *Pyrus*, *Quercus*, *Raphanus*, *Rehmannia*, *Rubus*, *Sorghum*, *Sphenostylis*, *Stellaria*, *Stylosanthes*, *Triticum*, *Trifolium*, *Triticum*, *Vaccinium*, *Vigna*, o *Zinnia*, o a partir de un hongo filamentoso que pertenece al género *Aspergillus*.
6. El uso como se reivindica en la reivindicación 4 o reivindicación 5, en donde dicho PAL es uno que acepta fenilalanina como sustrato y produce ácido cinámico a partir de la misma, tal que si el PAL también acepta tirosina como sustrato y forma ácido cumárico a partir de la misma, la relación $K_m(\text{fenilalanina})/K_m(\text{tirosina})$ para dicho PAL es menor de 1:1.
7. El uso como se reivindica en la reivindicación 6, en donde si dicho microorganismo produce una enzima cinamato-4-hidroxilasa (C4H), la relación $K_{cat}(\text{PAL})/K_{cat}(\text{C4H})$ es al menos 2:1.
8. El uso reivindicado en cualquier reivindicación precedente, en donde se forma cinamoil-CoA en dicha ruta en una reacción catalizada por una enzima en la cual el ATP y la CoA son sustratos y el ADP es un producto catalizado por una 4-cumarato-CoA ligasa o una cinamato-CoA ligasa.
9. El uso reivindicado en cualquier reivindicación precedente en donde al menos una copia de una secuencia genética que codifica una 4-cumarato-CoA ligasa o cinamato-CoA ligasa está enlazado operativamente a una señal de expresión que no está asociada de manera nativa con dicha secuencia genética en dicho organismo.
10. El uso reivindicado en cualquier reivindicación precedente, en donde el microorganismo es una levadura que pertenece al género *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Pichia*, *Debaromyces*, *Hansenula*, *Yarrowia*, *Zygosaccharomyces* o *Schizosaccharomyces*.
11. Un método para producir pinosilvina que comprende cultivar una célula de un microorganismo genéticamente modificada, siendo dicha célula de microorganismo una célula bacteriana o fúngica que tiene una ruta metabólica para producir pinosilvina bajo condiciones de producción de pinosilvina, en donde dicha ruta produce pinosilvina a partir de ácido cinámico y comprende al menos una primera actividad enzimática para formar cinamoil-CoA a partir de ácido cinámico y una estilbeno sintasa, en donde dicha estilbeno sintasa es expresada en dicho microorganismo a partir de un ácido nucleico que codifica para dicha enzima la cual no es nativa del microorganismo, y una

fenilalanina amoníaco liasa (PAL) que acepta fenilalanina como sustrato y produce ácido cinámico a partir de la misma, siendo dicha PAL tal que si la PAL también acepta tirosina como un sustrato y forma ácido cumárico a partir de la misma, la relación $K_m(\text{fenilalanina})/K_m(\text{tirosina})$ para dicha PAL es menor de 1:1, y en donde sí dicho microorganismo produce una enzima cinamato-4-hidroxilasa (C4H), la relación $K_{cat}(\text{PAL})/K_{cat}(\text{C4H})$ es al menos 2:1.

- 5 12. Un microorganismo genéticamente modificado, siendo dicho microorganismo una bacteria o un hongo y que tiene una ruta metabólica que produce cinamoil-CoA y produce pinosilvina a partir de la misma por la acción de una estilbeno sintasa, en donde dicha estilbeno sintasa es expresada en dicho microorganismo a partir de un ácido nucleico que codifica para dicha enzima la cual no es nativa para el microorganismo al cual tiene una rata de rendimiento más alto con un sustrato de cinamoil-CoA que con un sustrato de 4-cumaroil-CoA.
- 10 13. Un microorganismo genéticamente modificado, siendo dicho microorganismo una bacteria o un hongo y teniendo una ruta metabólica operativa que produce cinamoil-CoA y produce pinosilvina a partir de la misma por la acción de una estilbeno sintasa, en donde dicha estilbeno sintasa es expresada en dicho microorganismo a partir de un ácido nucleico que codifica para dicha enzima la cual no es nativa para el microorganismo, en donde dicha cinamoil-CoA es producida a partir de ácido cinámico, y en donde dicho ácido cinámico es formado a partir de L-fenilalanina
- 15 mediante una L-fenilalanina amoníaco liasa (PAL) la cual es una que acepta fenilalanina como sustrato y produce ácido cinámico a partir de la misma, tal que si la PAL también acepta tirosina como un sustrato y forma ácido cumárico a partir de la misma, la relación $K_m(\text{fenilalanina})/(K_m(\text{tirosina}))$ para dicha PAL es menor de 1:1.
- 20 14. Una composición de microorganismos que comprende células de microorganismos genéticamente modificados, en donde dicho microorganismo tiene una ruta metabólica operativa, produciendo dicha ruta pinosilvina a partir de ácido cinámico y comprendiendo al menos una primera actividad enzimática para formar cinamoil-CoA a partir de ácido cinámico y una estilbeno sintasa, en donde dicha estilbeno sintasa es expresada en dicho microorganismo a partir de un ácido nucleico que codifica para dicha enzima la cual no es nativa para el microorganismo, y en donde dicha composición tiene al menos 1.5 mg/g de pinosilvina sobre una base de peso seco, en donde el microorganismo es una levadura del género *Saccharomyces*, y/o en donde dicha pinosilvina es producida al menos
- 25 en parte en y contenida dentro de las células de dicho microorganismo.

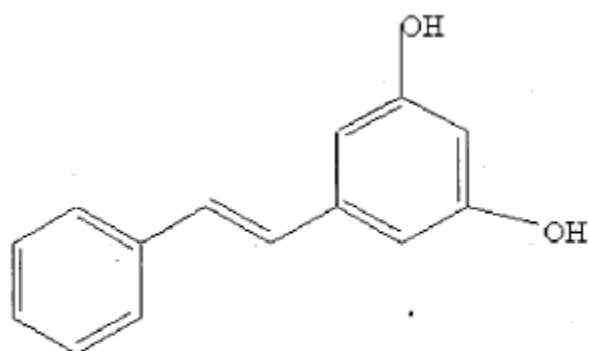


Figura 1

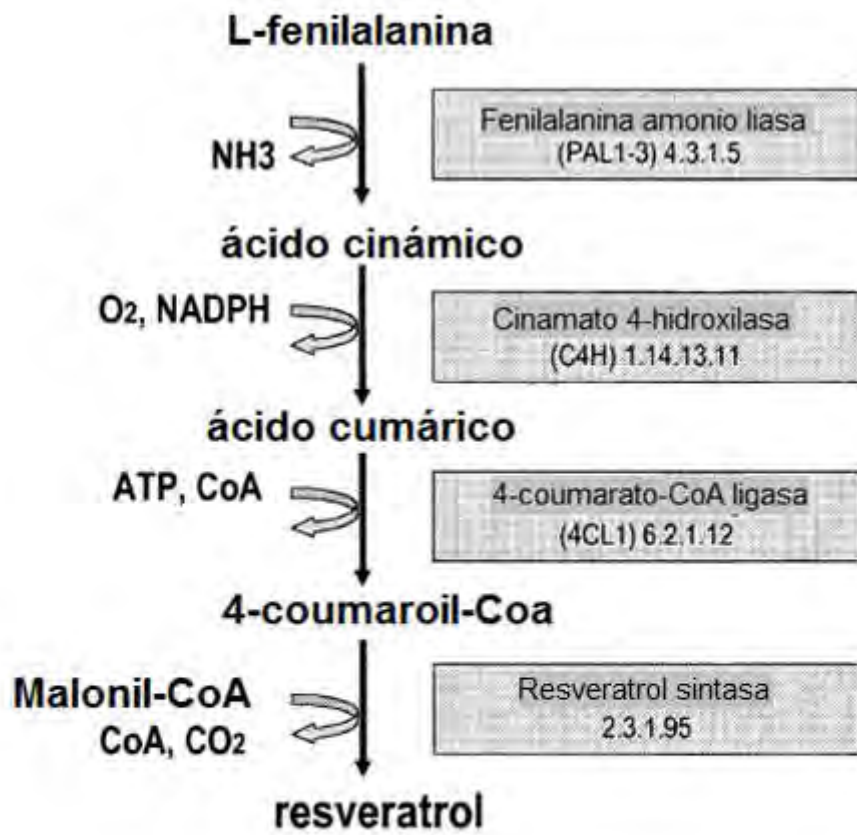


Figura 2

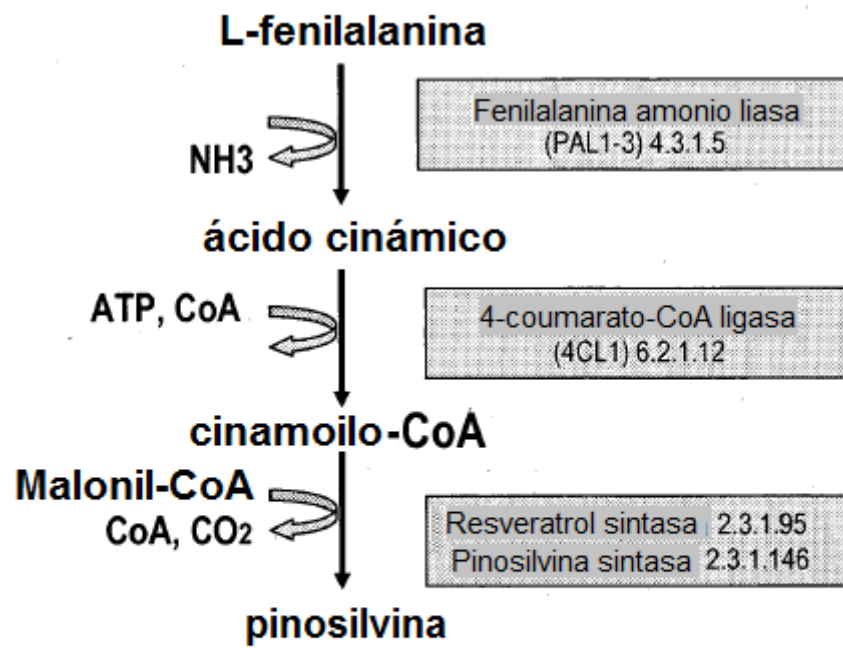


Figura 3

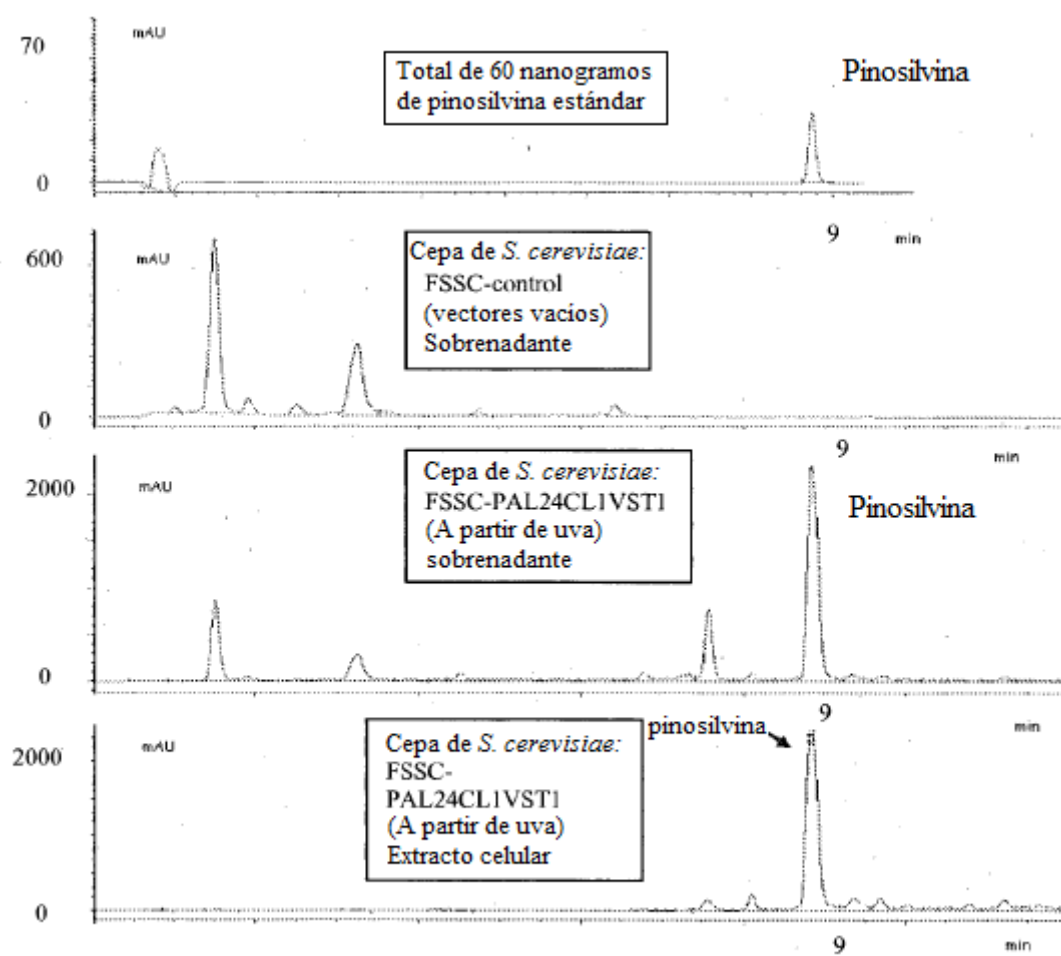


Figura 4

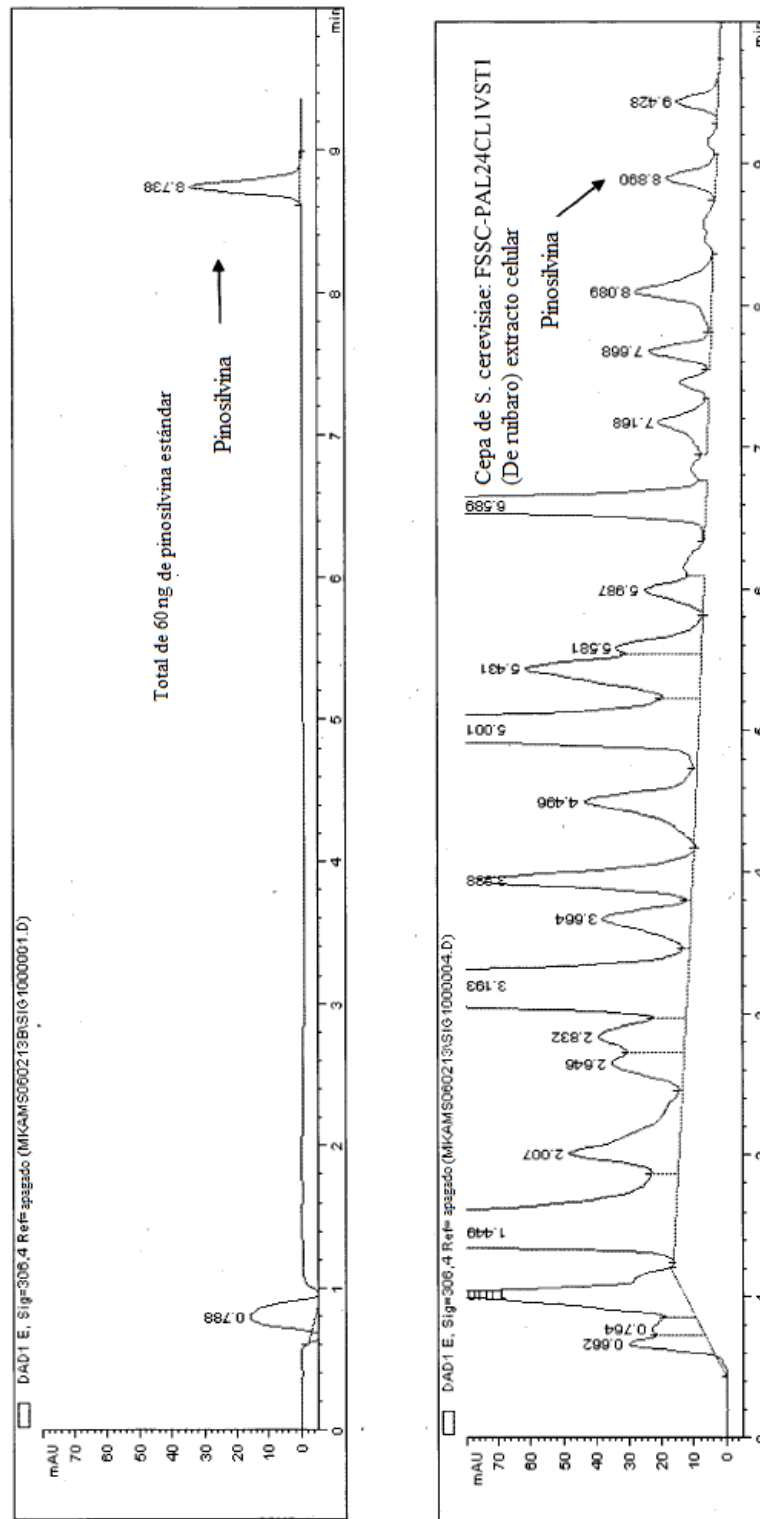
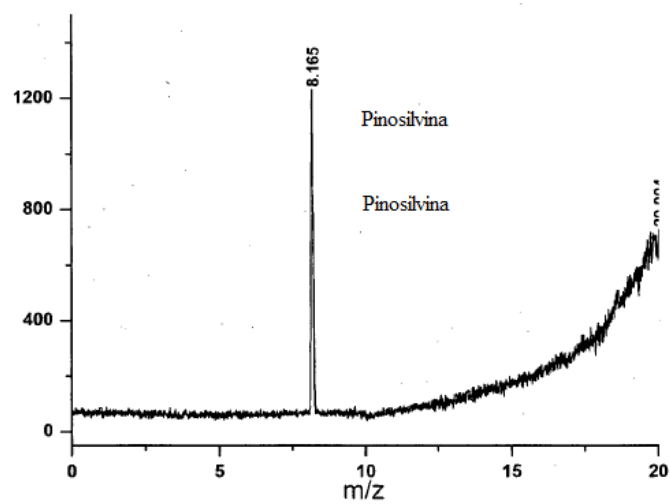


Figura 5

Figura 6

A

Pico de base de cromatograma negativo
de pinosilvina estándar ESI



B

Traza de ión negativo
de pinosilvina estándar a 211.0759 Da/c $\pm$ 25 mDa

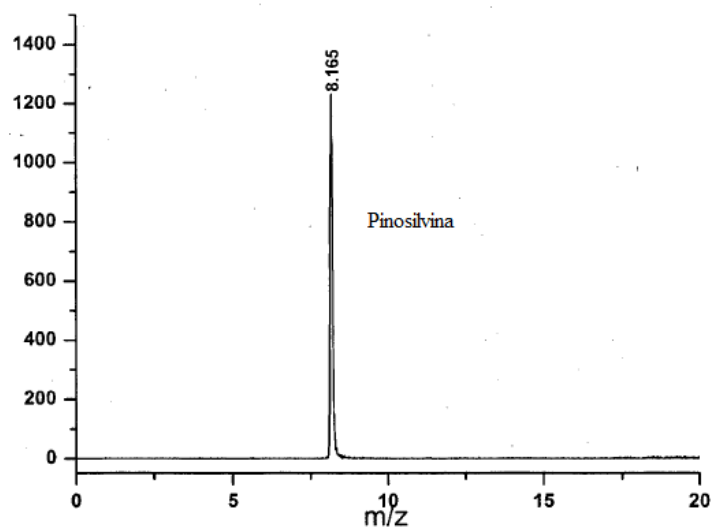
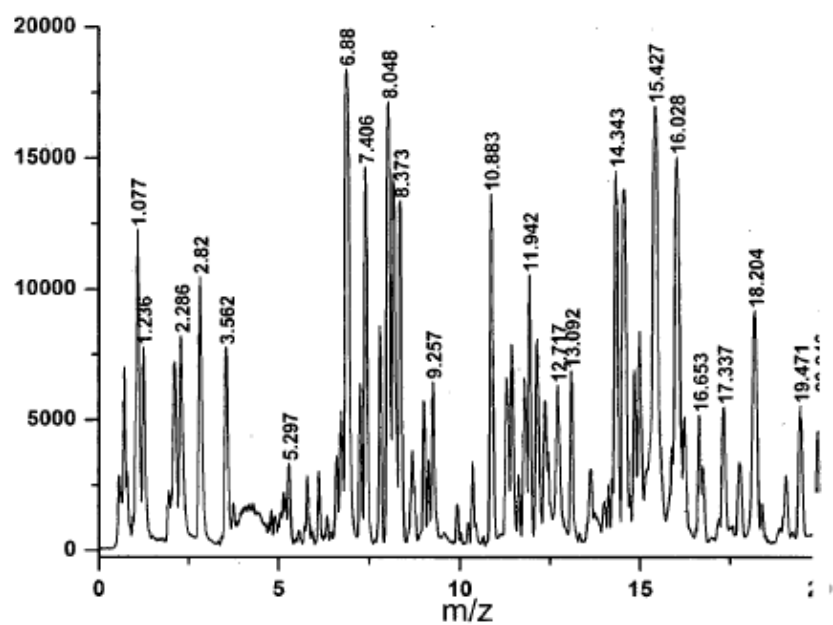
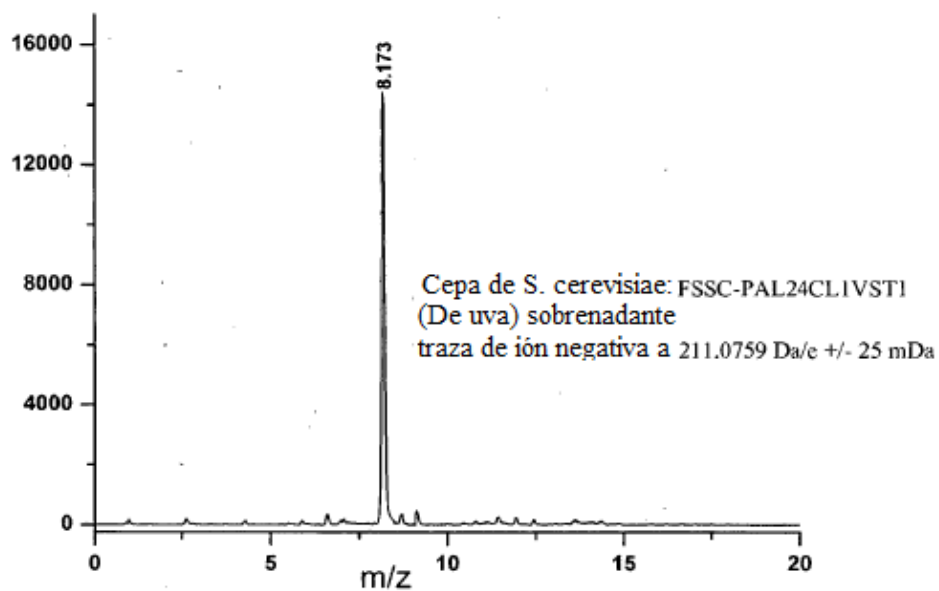


Figura 6 (cont)

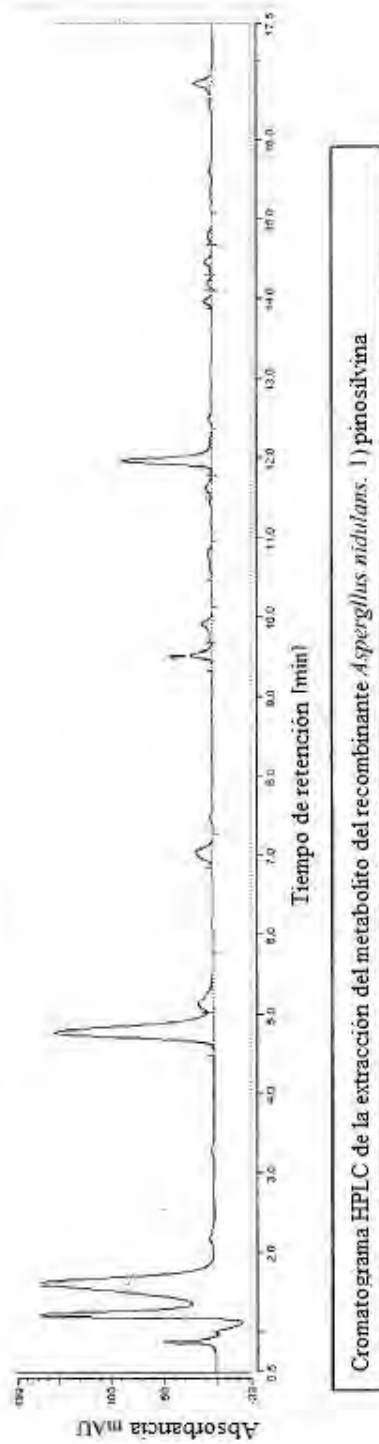
C



D



Producción de pinosilvina en el recombinante *A. nidulans*



Cepa *A. nidulans* tipo progenitor silvestre

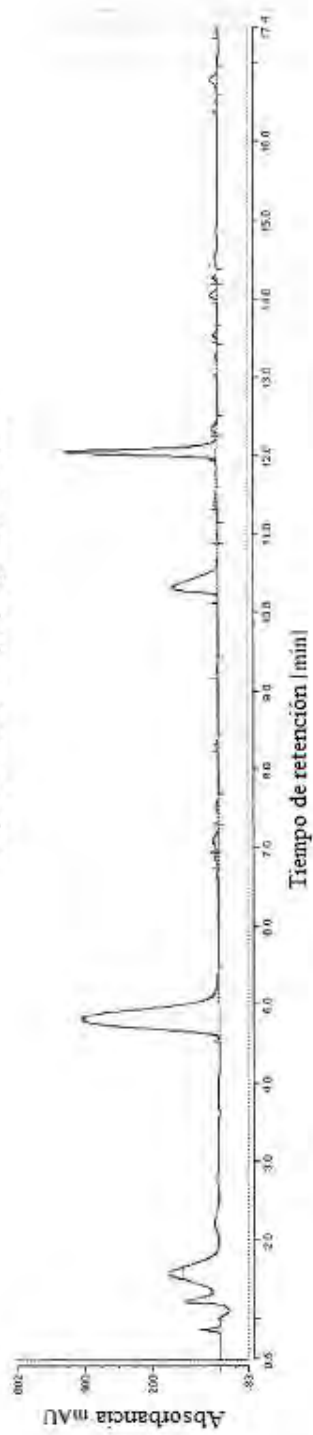


Figura 7

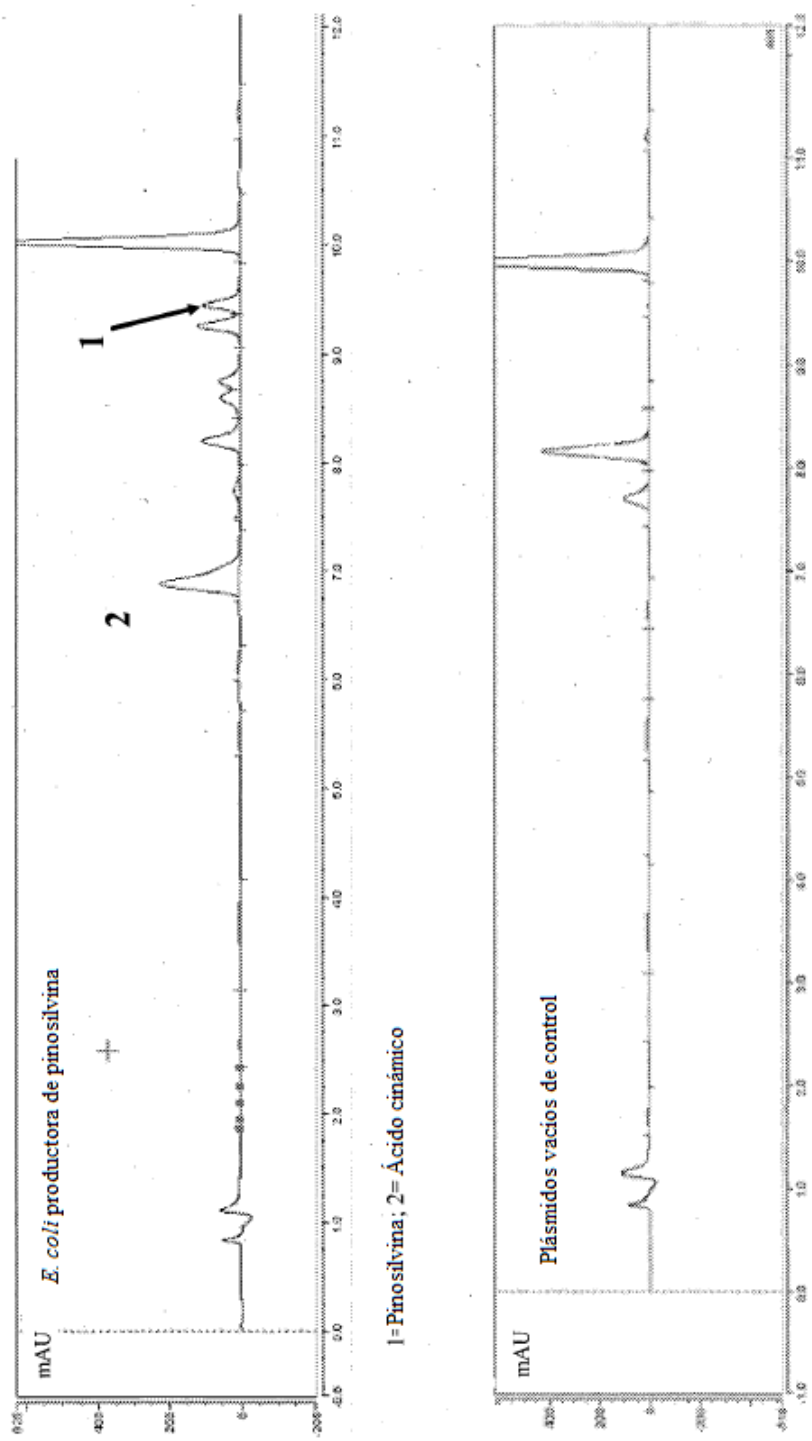


Figura 8