

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 616 085**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/88** (2006.01)

**C12P 5/00** (2006.01)

**C12P 7/40** (2006.01)

**C12P 7/26** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.12.2010 PCT/NL2010/050848**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.06.2011 WO2011074954**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2010 E 10803280 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.11.2016 EP 2513303**

54 Título: **Valenceno sintasa**

30 Prioridad:

**16.12.2009 EP 09179499**

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

**09.06.2017**

73 Titular/es:

**ISOBIONICS B.V. (100.0%)  
Urmonderbaan 22  
6167 RD Geleen, NL**

72 Inventor/es:

**ACHKAR, JIHANE;  
SONKE, THEODORUS;  
BOUWMEESTER, HENDRIK JAN;  
BOSCH, HENDRIK JAN y  
BEEKWILDER, MARTINUS JULIUS**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 616 085 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

Valenceno sintasa

- 5 La invención se refiere a una valenceno sintasa, a un ácido nucleico que codifica dicha valenceno sintasa, a un vector de expresión que comprende dicho ácido nucleico, a una célula hospedadora que comprende dicho vector de expresión, a un método para preparar valenceno, a un método para preparar nootkatona y a un método para preparar una valenceno sintasa.
- 10 Muchos organismos tienen la capacidad de producir una amplia serie de terpenos y terpenoides. Los terpenos se construyen de hecho o conceptualmente a partir de restos de 2-metilbutano, habitualmente denominados unidades de isopreno, que tiene la forma molecular  $C_5H_8$ . Se puede considerar la unidad de isopreno como uno de los componentes básicos comunes de la naturaleza. Las fórmulas moleculares básicas de terpenos son múltiplos de esta fórmula:  $(C_5H_8)_n$ , en la que n es el número de unidades de isopreno ligadas. Esta se denomina la regla de isopreno, como resultado de la que los terpenos también se indican como isoprenoides. Las unidades de isopreno pueden ligarse entre sí "de cabeza a cola" para formar cadenas lineales o pueden disponerse para formar anillos. En su biosíntesis, se forman terpenos a partir de los precursores de 5 carbonos universales isopentil difosfato (IPP) y su isómero, dimetilalil difosfato (DMAPP). En consecuencia, un esqueleto de carbono de terpeno generalmente comprende un múltiplo de 5 átomos de carbono. Son más comunes los terpenos de 5, 10, 15, 20, 30 y 40 carbonos, que se denominan hemi, mono, sesqui, di, tri y tetra-terpenos, respectivamente. Además de conexiones de "cabeza a cola", los tri y tetra-terpenos también contienen una conexión de "cola a cola" en su centro. Los terpenos pueden comprender grupos funcionales adicionales, como alcoholes y sus glucósidos, éteres, aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos y ésteres. Estos terpenos funcionalizados se denominan en el presente documento terpenoides. Como los terpenos, los terpenoides tienen en general un esqueleto de carbono que tiene un múltiplo de 5 átomos de carbono. Debería observarse que no es necesario que el número total de carbonos en un terpenoide sea un múltiplo de 5, por ejemplo, el grupo funcional puede ser un grupo éster que comprende un radical de alquilo que tiene cualquier número de átomos de carbonos.
- 15
- 20
- 25
- 30 Aparte de las definiciones proporcionadas anteriores, es importante observar que los términos "terpeno", "terpenoide" e "isoprenoide" se usan con frecuencia indistintamente en bibliografía abierta así como de patentes.
- El valenceno es un terpeno de origen natural, producido en plantas específicas, tales como diversas frutas cítricas. En estas plantas el farnesil difosfato (FPP) se convierte enzimáticamente en valenceno en presencia de una valenceno sintasa.
- 35 El valenceno es, por ejemplo, industrialmente aplicable como un aroma o saporífero. El valenceno puede obtenerse por destilación de aceites esenciales de cítricos obtenidos de frutas cítricas, pero el aislamiento de estos aceites es incómodo debido a la baja concentración de valenceno en estas frutas (del 0,2 al 0,6 % en peso).
- 40 Se ha propuesto preparar valenceno de forma microbiológica, haciendo uso de microorganismos modificados genéticamente por incorporación de un gen que codifica una proteína que tiene actividad valenceno sintasa. Por lo tanto puede usarse valenceno sintasa producida para la preparación de valenceno a partir de FPP, una conversión que podría ejecutarse como una reacción aislada (*in vitro*) o como parte de una ruta metabólica más larga que conduce con el tiempo a la producción de valenceno a partir de azúcar (*in vivo*).
- 45 Se conocen varias valenceno sintasas de cítricos. Por ejemplo, en los documentos US 7.273.735 y US 7.442.785 se describe la expresión de valenceno sintasa de *Citrus x paradisi* en *E. coli*. Además, se ha descrito valenceno sintasa de *Vitis vinifera* en Lückner *et al.* (Phytochemistry (2004) 65: 2649-2659). Aunque se ha descrito la expresión de estas valenceno sintasas en un organismo hospedador, la actividad enzimática real solamente se muestra en condiciones *in vitro*.
- 50 En el documento US2008/318292, se describe una secuencia de sintasa de *Picea abies* que tiene 41 % de identidad sobre 524 restos con SEQ ID NO: 2.
- 55 Martin *et al.* se refiere a longifoleno sintasa de *Picea abies* que tiene 56,3 % de identidad sobre 1557 nucleótidos con SEQ ID NO: 1 y 44,7 % de identidad sobre 573 aminoácidos con SEQ ID NO: 2 en Plant Physiology (2004); 135:1908-1927.
- 60 Sharan-Asa *et al.* informa del aislamiento, la expresión funcional y la regulación del desarrollo de Cstps1, un gen que codifica sesquiterpeno sintasa, implicado en la formación de aroma de cítricos en The Plant Journal (2003); 36: 664 - 674.
- Varios artículos también describen la actividad de valenceno sintasas *in vivo*. Takahashi *et al.* (Biotechnol. Bioeng. (2007) 97: 17-181), por ejemplo, presentan la expresión de un gen de valenceno sintasa de *Citrus x paradisi* (número de referencia AF411120) en cepas de *Saccharomyces cerevisiae* que se han optimizado para potenciar
- 65

niveles del intermedio clave FPP entre otras cosas inactivando el gen *ERG9* mediante una mutación de desactivación. El cultivo de la mejor cepa en un medio mínimo definido que contiene ergosterol para complementar la mutación de *ERG9* durante 216 h condujo a la producción de valenceno 20 mg/l. Asadollahi *et al.* (Biotechnol. Bioeng. (2008) 99: 666-677) describen un sistema de producción de valenceno más o menos similar, que se basa en la expresión de un gen de valenceno sintasa de *Citrus x paradisi* (número de referencia CQ813508; diferencia de 3 de 548 aminoácidos en comparación con AF411120) en una cepa de *S. cerevisiae* en la que la expresión del gen *ERG9* estaba regulada negativamente mediante reemplazo del promotor de *ERG9* nativo con el promotor de *MET3* regulable. El cultivo de esta cepa en un medio mínimo aplicando una fermentación de dos fases líquidas con dodecano como el disolvente orgánico dio como resultado la formación de valenceno 3 mg/l en 60 h.

Las valenceno sintasas conocidas en la actualidad tienen varias desventajas definidas que son en particular indeseables cuando se aplican en un proceso de producción de valenceno industrial en el que el valenceno se prepara a partir de FPP, bien en una reacción aislada (*in vitro*), por ejemplo usando una valenceno sintasa aislada o células completas (permeabilizadas) o de otro modo, por ejemplo, en un proceso fermentativo que es parte de una ruta metabólica más larga que conduce con el tiempo a la producción de valenceno a partir de azúcar (*in vivo*). La investigación interna por los presentes inventores reveló, por ejemplo, que la sobreexpresión de la valenceno sintasa de *Citrus x paradisi* CQ813508) o de *Citrus sinensis* (AF441124) en microorganismos diferentes (*E. coli*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Saccharomyces cerevisiae*) en forma activa es problemática, dando como resultado una tasa de producción de valenceno gravemente deteriorada. De forma similar, Asadollahi *et al.* (Biotechnol. Bioeng. (2008) 99: 666-677) descubrieron que la baja síntesis de valenceno en una cepa de *S. cerevisiae* recombinante estaba provocada por escasa expresión heteróloga del gen de la valenceno sintasa de *Citrus x paradisi*.

Además, se ha descubierto que la valenceno sintasa de *C. x paradisi*, que es casi idéntica a la enzima de *C. sinensis*, cataliza la conversión de FPP no solamente en valenceno sino también en cantidades significativas de germacreno A (documento US 7.442.785 B2), a pH neutro o levemente alcalino.

Una incubación de esta enzima con FPP a pH 7,5, por ejemplo, dio como resultado la formación de dos compuestos que representaban más del 95 % de los productos de reacción totales formados, 30 % de los cuales eran beta-elemento (un producto de reordenación térmica de germacreno A) y 65 % de los cuales eran valenceno. Los inventores descubrieron además que también en condiciones *in vivo*, se forman cantidades significativas del producto lateral de germacreno A por esta enzima; el cultivo de una cepa de *Rhodobacter sphaeroides* optimizada para producción de isoprenoides y que portaba el gen de valenceno sintasa de *C. x paradisi* (número de referencia CQ813508) condujo a la formación de valenceno y beta-elemento en 48 % y 25 % de la cantidad total de sesquiterpenos formados, respectivamente.

La valenceno sintasa de la vid *Vitis vinifera* (número de referencia AAS66358) presenta una falta de especificidad similar. La expresión en *E. coli* seguida de un ensayo enzimático *in vitro* mostró que esta síntesis convierte FPP en (+)-valenceno (49,5 % del producto total) y (-)-7-epi-alfa-selineno (35,5 % del producto total) junto con cinco productos menores (Lücker *et al.* Phytochemistry (2004) 65: 2649-2659).

Además de las enzimas anteriores con actividad valenceno sintasa bioquímicamente demostrada, la base de datos de secuencias de ácido nucleico de GenBank contiene otra entrada más anotada como una valenceno sintasa, es decir, el gen de la valenceno sintasa de *Perilla frutescens* var. *Frutescens* (número de referencia AY917195). En la bibliografía, sin embargo, no se ha indicado nada sobre esta valenceno sintasa potencial específica, de modo que falta una prueba bioquímica de su actividad y especificidad.

Por lo tanto, existe la necesidad de una valenceno sintasa alternativa que puede usarse en la preparación de valenceno. En particular existe una necesidad de una valenceno sintasa alternativa que presente expresión mejorada, al menos en células hospedadoras seleccionadas; una valenceno sintasa alternativa que tiene una actividad enzimática alta al menos en condiciones específicas, tal como a pH neutro o alcalino y/o intracelularmente en la célula en la que se ha producido; y/o una valenceno sintasa alternativa es altamente específica, en particular que tiene especificidad mejorada en comparación con valenceno sintasa de *Citrus x paradisi*, con respecto a catalizar la conversión de FPP a valenceno, al menos en condiciones específicas, tal como a pH aproximadamente neutro o alcalino y/o intracelularmente en la célula en la que se ha producido.

Se ha descubierto que un polipéptido específico que se desconocía hasta la fecha tiene actividad valenceno sintasa y que este polipéptido puede usarse como un catalizador que puede actuar como una alternativa a valenceno sintasas conocidas.

En consecuencia, la presente invención se refiere a una valenceno sintasa que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, o un homólogo funcional de la misma, siendo dicho homólogo funcional una valenceno sintasa que comprende una secuencia de aminoácido que tiene una identidad de secuencia de al menos 60 % con SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4. Dicho homólogo puede ser en particular una valenceno sintasa que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos

70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % con SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4.

5 Además, la invención se refiere a un anticuerpo que tiene afinidad de unión por una valenceno sintasa de acuerdo con la invención. Un anticuerpo de acuerdo con la invención se une por tanto específicamente con una valenceno sintasa de acuerdo con la invención.

10 Además, se describe una proteína que presenta reactividad cruzada inmunológica con un anticuerpo inducido contra un fragmento de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4, en particular dicha proteína que tiene actividad valenceno sintasa.

15 La reactividad cruzada inmunológica puede ensayarse usando un anticuerpo inducido contra, o reactivo con, al menos un epítipo de un polipéptido aislado de acuerdo con la presente invención que tiene actividad valenceno sintasa. El anticuerpo, que puede ser monoclonal o policlonal, puede producirse por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo como se describe en Hudson *et al.*, Practical Immunology, Tercera Edición (1989), Blackwell Scientific Publications. La reactividad cruzada inmunológica puede determinarse usando ensayos conocidos en la técnica, un ejemplo de los cuales es transferencia de Western, por ejemplo, como se describe en Hudson *et al.*, Practical Immunology, Tercera Edición (1989), Blackwell Scientific Publications.

20 La invención se refiere además a un ácido nucleico, que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una valenceno sintasa de acuerdo con la invención, o que comprende una secuencia de ácido nucleico complementaria de dicha secuencia codificante. En particular, el ácido nucleico puede seleccionarse de ácidos nucleicos que comprenden una secuencia de ácido nucleico como se muestra en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 y otras secuencias de ácido nucleico que codifican una valenceno sintasa de  
25 acuerdo con la invención, comprendiendo dichas otras secuencias una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia de al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % con la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19, respectivamente ácidos nucleicos complementarios de las mismas. Dicha otra secuencia de ácido nucleico que codifica una valenceno sintasa de acuerdo con la invención puede en el presente  
30 documento denominarse después análogo funcional.

35 Se describe en el presente documento un ácido nucleico, que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una valenceno sintasa de acuerdo con la invención, que hibride en condiciones de baja rigurosidad, preferentemente en condiciones de rigurosidad media, más preferentemente en condiciones de alta rigurosidad, y más preferentemente en condiciones de muy alta rigurosidad con la secuencia de ácido nucleico mostrada en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19, respectivamente ácidos nucleicos complementarios de las mismas.

40 Pueden realizarse experimentos de hibridación por una diversidad de métodos, que están bien disponibles para los expertos en la materia. Pueden encontrarse directrices generales para seleccionar entre estos diversos métodos en, por ejemplo, Sambrook, J., y Russell, D.W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (2001).

45 Con rigurosidad de las condiciones de hibridación se entiende las condiciones en las que se realiza la hibridación, que consiste en las etapas de hibridación real y lavado. Las etapas de lavado se usan para retirar por lavado los ácidos nucleicos, que no hibridan con el ácido nucleico diana inmovilizado, por ejemplo en un filtro de nitrocelulosa. La rigurosidad de las condiciones de hibridación puede cambiarse, por ejemplo, cambiando la concentración salina de la solución de lavado y/o cambiando la temperatura a la que se realiza la etapa de lavado (temperatura de lavado). La rigurosidad de la hibridación aumenta reduciendo la concentración salina en la solución de lavado o elevando la temperatura de lavado. Para fines de la presente solicitud, las condiciones de rigurosidad baja, media, alta y muy alta son en particular las siguientes condiciones y equivalentes de las mismas: la hibridación se realiza en una solución acuosa que comprende SSC 6 X (solución de reserva SSC 20 X es NaCl 3,0 M y citrato trisódico 0,3 M en agua), reactivo de Denhardt 5 X (reactivo de Denhardt 100 X es Fracción V de BSA 2 % (p/v), Ficoll 400 20 % (p/v) y polivinilpirrolidona 2 % (p/v) en agua), SDS 0,5 % y ADN de esperma de salmón fragmentado,  
50 desnaturalizado 100 µg/ml, a aproximadamente 45 °C durante aproximadamente 12 horas. Después de retirada de sonda de ácido nucleico no unida por dos etapas de lavado de 5 minutos consecutivas en SSC 2 X, SDS 0,1 % a temperatura ambiente, la ejecución de dos etapas de lavado de 5 minutos consecutivas en SSC 0,2 X, SDS 0,1 % a temperatura ambiente es un ejemplo de baja rigurosidad, de dos etapas de lavado de 15 minutos consecutivas en SSC 0,2 X, SDS 0,1 % a 42 °C un ejemplo de rigurosidad media, de dos etapas de lavado de 15 minutos consecutivas en SSC 0,1 X, SDS 0,1 % a 55 °C un ejemplo de rigurosidad alta y dos etapas de lavado de 30 minutos consecutivas en SSC 0,1 X, SDS 0,1 % a 68 °C un ejemplo de muy alta rigurosidad.  
60

Una valenceno sintasa o ácido nucleico de acuerdo con la invención puede ser un compuesto natural o fragmento de un compuesto aislado de su fuente natural (por ejemplo *Chamaecyparis nootkatensis*), ser un compuesto sintetizado

química o enzimáticamente o fragmento de un compuesto o un compuesto o fragmento de un compuesto producido en una célula recombinante, en la que puede estar presente o de la que puede haberse aislado.

5 La invención se refiere además a un vector de expresión que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la invención.

La invención se refiere además a una célula hospedadora, que comprende un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico heteróloga de acuerdo con la invención.

10 La invención se refiere además a un método para preparar valenceno, que comprende convertir FPP a valenceno en presencia de una valenceno sintasa de acuerdo con la invención, en el que el valenceno se prepara en una célula hospedadora de acuerdo con la invención. Pueden existir cuatro isómeros geométricos diferentes de FPP, es decir, 2E,6E-FPP, 2Z,6E-FPP, 2E,6Z-FPP y 2Z,6Z-FPP. Se han obtenido buenos resultados con 2E,6E-FPP, aunque en principio cualquier otro isómero de FPP puede ser un sustrato adecuado para una enzima de acuerdo con la invención.

15 La invención se refiere además a un método para preparar nootkatona, en el que el valenceno preparado en un método de acuerdo con la invención se convierte en nootkatona.

20 La invención se dirige además a un método para producir una valenceno sintasa de acuerdo con la invención, que comprende cultivar una célula hospedadora de acuerdo con la invención en condiciones que conducen a la producción de la valenceno sintasa y recuperar la valenceno sintasa de la célula hospedadora.

25 De una valenceno sintasa de acuerdo con la invención se ha descubierto que es más específica para síntesis de valenceno que una valenceno sintasa de cítricos, en particular en o alrededor de pH neutro en un ensayo *in vitro* o en un método en el que se sintetiza valenceno intracelularmente en una célula hospedadora modificada genéticamente para producir una valenceno sintasa de acuerdo con la invención y una valenceno sintasa de cítrico, respectivamente. Los resultados iniciales muestran que en condiciones idénticas, la cantidad de producto secundario importante (germacreno A) formada con la enzima nueva de la invención es significativamente menor, concretamente una relación molar de valenceno:germacreno A de 4:1 en comparación con 2:1 con la valenceno sintasa de cítricos.

30 De acuerdo con la invención se ha descubierto que es posible llevar a cabo expresión de valenceno sintasa con buen rendimiento en distintos organismos. Por ejemplo, se ha descubierto que la valenceno sintasa se expresa bien en *E. coli* y en *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de panadero). También se ha descubierto que en un método de acuerdo con la invención en el que se expresa una valenceno sintasa de acuerdo con la invención en un organismo hospedador que produce isoprenoides (*Rhodobacter sphaeroides*) la producción de valenceno es mayor que en un método comparativo en el que se expresa una valenceno sintasa de cítrico.

40 Por lo tanto, en una realización ventajosa, la presente invención proporciona una valenceno sintasa con especificidad mejorada hacia la catálisis de síntesis de valenceno y una velocidad de producción mejorada, cuando se usa en un método para preparar valenceno, en particular en comparación con valenceno sintasa de cítrico u otra valenceno sintasa de acuerdo con la técnica anterior, citada en el presente documento.

45 Sin quedar ligado a la teoría, se cree que una alta especificidad hacia la catálisis de síntesis de valenceno a pH neutro o levemente alcalino se considera en particular deseable para métodos en los que el valenceno se prepara de forma intracelular, porque se cree que diversas células hospedadoras tienen un pH intracelular neutro o ligeramente alcalino, tal como un pH de 7,0-8,5 (para valores de pH intracelulares de bacterias, véase por ejemplo: Booth, Microbiological Reviews (1985) 49: 359-378). Cuando, por ejemplo, las células de *E. coli* se expusieron a valores de pH que variaban de 5,5 a 8,0, el pH intracelular era de entre 7,1 y 7,9 (Olsen *et al.*, Appl. Environ. Microbiol. (2002) 68: 4145-4147). Esto puede explicar una especificidad mejorada hacia la síntesis de valenceno de una valenceno sintasa de acuerdo con la invención, también intracelularmente.

50 El término "o" como se usa en el presente documento se define como "y/o" a no ser que se especifique de otro modo.

55 El término "un" como se usa en el presente documento se define como "al menos uno", a no ser que se especifique de otro modo.

60 Cuando se hace referencia a una sustancia (por ejemplo un compuesto, un aditivo, etc.) en singular, se entiende que se incluye el plural.

Las expresiones farnesil difosfato y farnesilpirofosfato (ambas abreviadas como FPP) como se usan indistintamente en el presente documento se refieren al compuesto 3,7,11-trimetil-2,6,10-dodecatrien-1-il pirofosfato e incluyen todos los isómeros conocidos de este compuesto.

65

El término “recombinante” en relación con una relación recombinante, vector, ácido nucleico o similares como se usa en el presente documento, se refiere a una célula, vector, ácido nucleico o similares, que contiene ácido nucleico que no aparece de forma natural en esa célula, vector, ácido nucleico o similares y/o no aparece de forma natural en esa misma localización. En general, dicho ácido nucleico se ha introducido en esa cepa (célula) usando técnicas de ADN recombinante.

El término “heterólogo” cuando se usa con respecto a un ácido nucleico (ADN o ARN) o proteína se refiere a un ácido nucleico o a una proteína que no aparece de forma natural como parte del organismo, célula, genoma o secuencia de ADN o ARN en el que está presente, o que se encuentra en una célula o localización o localizaciones en el genoma o secuencia de ADN o ARN que difiere de aquella en la que se localiza en la naturaleza. Los ácidos nucleicos o proteínas heterólogos no son endógenos de la célula en la que se introducen, sino que se han obtenido de otra célula o se han producido de forma sintética o recombinante. En general, aunque no necesariamente, dichos ácidos nucleicos codifican proteínas que no se producen normalmente por la célula en la que se expresa el ADN.

Un gen que es endógeno de una célula hospedadora particular pero que se ha modificado de su forma natural, mediante, por ejemplo, el uso de redistribución de ADN, también se denomina heterólogo. El término “heterólogo” también incluye múltiples copias de origen no natural de una secuencia de ADN de origen natural. Por lo tanto, el término “heterólogo” puede hacer referencia a un segmento de ADN que es ajeno o heterólogo de la célula, u homólogo de la célula pero en una posición y/o un número dentro del ácido nucleico de la célula hospedadora en el que el segmento no se encuentra habitualmente. Se expresan segmentos de ADN exógenos para producir polipéptidos exógenos. Una secuencia de ADN “homóloga” es una secuencia de ADN que se asocia de forma natural con una célula hospedadora en la que se introduce.

Cualquier ácido nucleico o proteína que un experto en la materia reconocería como heterólogo o ajeno de la célula en la que se expresa está abarcado en el presente documento por la expresión ácido nucleico o proteína heterólogo.

El término “mutado” o “mutación” como se usa en el presente documento con respecto a proteínas o polipéptidos significa que al menos un aminoácido en la secuencia proteica o polipeptídica de origen natural o de tipo silvestre se ha reemplazado con un aminoácido diferente, o se ha suprimido de, o insertado en la secuencia mediante mutagénesis de ácidos nucleicos que codifican estos aminoácidos. La mutagénesis es un método bien conocido en la técnica, e incluye, por ejemplo, mutagénesis dirigida por medio de PCR o mediante mutagénesis mediada por oligonucleótidos como se describe en Sambrook, J., y Russell, D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (2001). El término “mutado” o “mutación” como se usa en el presente documento con respecto a genes significa que al menos un nucleótido en la secuencia de nucleótidos de ese gen o una secuencia reguladora del mismo, se ha reemplazado con un nucleótido diferente, o se ha suprimido de o insertado en la secuencia mediante mutagénesis.

Las expresiones “fase abierta de lectura” y “ORF” se refieren a la secuencia de aminoácidos codificada entre codones de inicio y de terminación de la traducción de una secuencia codificante. Las expresiones “codón de inicio” y “codón de terminación” se refieren a una unidad de tres nucleótidos adyacentes (“codón”) en una secuencia codificante que especifica el inicio y la terminación de cadena, respectivamente, de síntesis proteica (traducción de ARNm).

El término “gen” se usa ampliamente para referirse a cualquier segmento de ácido nucleico asociado con una función biológica. Por lo tanto, los genes incluyen secuencias codificantes y/o secuencias regulatorias requeridas para su expresión. Por ejemplo, el gen se refiere a un fragmento de ácido nucleico que expresa ARNm o ARN funcional, o codifica una proteína específica, y que incluye secuencias reguladoras. Los genes también incluyen segmentos de ADN no expresados que, por ejemplo, forman secuencias de reconocimiento para otras proteínas. Pueden obtenerse genes de una diversidad de fuentes, incluyendo clonación de una fuente de interés o sintetizando a partir de información de secuencia conocida o predicha, y pueden incluir secuencias diseñadas para tener parámetros deseados.

La expresión “gen quimérico” se refiere a cualquier gen que contenga 1) secuencias de ADN, incluyendo secuencias reguladoras y codificantes, que no se encuentran juntas en la naturaleza, o 2) secuencias que codifican partes de proteínas que no se unen de forma natural, o 3) partes de promotores que no se unen de forma natural. En consecuencia, un gen quimérico puede comprender secuencias reguladoras y secuencias codificantes que derivan de diferentes fuentes, o comprender secuencias reguladoras y secuencias codificantes derivadas de la misma fuente, pero dispuestas de una manera diferente a la hallada en la naturaleza.

El término “transgénico” para una célula u organismo transgénico como se usa en el presente documento, se refiere a un organismo o una célula (pudiendo dicha célula ser un organismo en sí misma o una célula de un organismo multicelular del que se ha aislado) que contiene un ácido nucleico que no aparece de forma natural en ese organismo o esa célula y habiéndose introducido dicho ácido nucleico en ese organismo o célula (es decir, habiéndose introducido en el organismo o célula en sí mismo o en un ancestro del organismo o un organismo ancestral de un organismo del que se ha aislado la célula) usando técnicas de ADN recombinante.

Un “transgén” se refiere a un gen que se ha introducido en el genoma por transformación y preferentemente se mantiene de forma estable. Los transgenes pueden incluir, por ejemplo, genes que son heterólogos u homólogos de los genes de una planta particular para transformar. Adicionalmente, los transgenes pueden comprender genes nativos insertados en un organismo no nativo, o genes quiméricos. La expresión “gen endógeno” se refiere a un gen nativo en su localización natural en el genoma de un organismo. Un gen “ajeno” se refiere a un gen que no se encuentra normalmente en el organismo hospedador pero que se introduce por transferencia génica.

“Transformación” y “transformar”, como se usa en el presente documento, se refiere a la introducción de una secuencia de nucleótidos heteróloga en una célula hospedadora, independientemente del método usado para la inserción, por ejemplo, captación directa, transducción, conjugación, acoplamiento f o electroporación. El polinucleótido exógeno puede mantenerse como un vector no integrado, por ejemplo, un plásmido, o como alternativa, puede integrarse en el genoma de la célula hospedadora.

“Secuencia codificante” se refiere a una secuencia de ADN o ARN que codifica una secuencia de aminoácidos específica y excluye las secuencias no codificantes. Puede constituir una “secuencia codificante ininterrumpida”, es decir, que carece de un intrón, tal como en un ADNc o puede incluir uno o más intrones unidos por uniones de corte y empalme apropiadas. Un “intrón” es una secuencia de ARN que está contenida en el transcrito primario pero que se retira mediante escisión y religamiento del ARN dentro de la célula para crear el ARNm maduro que puede traducirse a una proteína.

“Secuencias reguladoras” se refiere a secuencias de nucleótidos localizadas cadena arriba (secuencias no codificantes 5’), dentro de, o cadena abajo (secuencias no codificantes 3’) de una secuencia codificante, y que influyen en la transcripción, procesamiento o estabilidad de ARN, o traducción de la secuencia codificante asociada. Las secuencias reguladoras incluyen potenciadores, promotores, secuencias líderes de traducción, intrones, y secuencias de señales de poliadenilación. Incluyen secuencias naturales y sintéticas así como secuencias que pueden ser una combinación de secuencias sintéticas y naturales. Como se ha observado anteriormente, la expresión “secuencias reguladoras adecuadas” no está limitada a promotores.

Los ejemplos de secuencias reguladoras incluyen promotores (tales como promotores de la transcripción, promotores constitutivos, promotores inducibles), operadores o potenciadores, sitios de unión ribosómicos de ARNm, y secuencias apropiadas que controlan el inicio y la terminación de la transcripción y la traducción. Las secuencias de ácido nucleico están “unidas operativamente” cuando la secuencia reguladora se relaciona funcionalmente con la secuencia de ADNc de la invención.

Cada una de las secuencias reguladoras puede seleccionarse independientemente de secuencias reguladoras heterólogas y homólogas.

“Promotor” se refiere a una secuencia de nucleótidos, habitualmente cadena arriba (5’) de su secuencia codificante, que controla la expresión de dicha secuencia codificante proporcionando el reconocimiento de ARN polimerasa y otros factores requeridos para la transcripción apropiada. “Promotor” incluye un promotor mínimo que es una secuencia de ADN corta constituida por una caja TATA y otras secuencias que sirven para especificar el sitio de inicio de la transcripción, al que se añaden elementos reguladores para control de la expresión. “Promotor” también se refiere a una secuencia de nucleótidos que incluye un promotor mínimo más elementos reguladores que son capaces de controlar la expresión de una secuencia codificante o ARN funcional. Este tipo de secuencia promotora consiste en elementos cadena arriba próximos y más distantes, denominados con frecuencia estos últimos elementos potenciadores. En consecuencia, un “potenciador” es una secuencia de ADN que puede estimular la actividad del promotor y puede ser un elemento innato del promotor o un elemento heterólogo insertado para potenciar el nivel o especificidad de tejido de un promotor. Es capaz de actuar en ambas orientaciones (normal o invertida), y es capaz de actuar incluso cuando se mueve cadena arriba o cadena abajo del promotor. Tanto los potenciadores como otros elementos promotores cadena arriba se unen con proteínas de unión a ADN específicas de secuencia que median en sus efectos. Los promotores pueden derivar en su totalidad de un gen nativo, o pueden estar compuestos de diferentes elementos derivados de diferentes promotores hallados en la naturaleza, o incluso estar constituidos por segmentos de ADN sintético. Un promotor también puede contener secuencias de ADN que están implicadas en la unión de factores proteicos que controlan la eficacia del inicio de la transcripción en respuesta a condiciones fisiológicas o de desarrollo.

La expresión “ácido nucleico” como se usa en el presente documento, incluye referencia a un polímero desoxirribonucleotídico o ribonucleotídico, es decir, un polinucleótido, en forma mono o bicatenaria, y a no ser que se limite de otro modo, abarca análogos conocidos que tienen la naturaleza esencial de nucleótidos naturales porque hibridan con ácidos nucleicos monocatenarios de una manera similar a nucleótidos de origen natural (por ejemplo, ácidos nucleicos peptídicos). Un polinucleótido puede ser de longitud completa o una subsecuencia de un gen estructural o regulador nativo o heterólogo. A no ser que se indique de otro modo, el término incluye referencia a la secuencia especificada así como la secuencia complementaria de la misma. Por lo tanto, ADN o ARN con cadenas principales modificadas para estabilidad o por otras razones son “polinucleótidos” como se entiende en el presente documento ese término. Además, los ADN o ARN que comprenden bases poco habituales, tales como

inosina, o bases modificadas, tales como bases tritiladas, por nombrar solamente dos ejemplos, son "polinucleótidos" como se usa el término en el presente documento. Se apreciará que se han realizado una gran diversidad de modificaciones a ADN y ARN que cumplen muchos fines útiles conocidos por los expertos en la materia. El término "polinucleótido" como se emplea en el presente documento abarca dichas formas modificadas química, enzimática o metabólicamente de polinucleótidos, así como las formas químicas de ADN y ARN características de virus y células, incluyendo entre otras cosas, células sencillas y complejas.

Cada secuencia de ácido nucleico en el presente documento que codifica un polipéptido también describe, por referencia al código genético, cada posible variación silenciosa del ácido nucleico. La expresión "variantes modificadas de forma conservativa" se aplica a secuencias tanto de aminoácidos como de ácido nucleico. Con respecto a secuencias de ácido nucleico particulares, la expresión "variantes modificadas de forma conservativa" se refiere a los ácidos nucleicos que codifican variantes idénticas o modificadas de forma conservativa de las secuencias de aminoácidos debido a la degeneración del código genético. La expresión "degeneración del código genético" se refiere al hecho de que un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican todos el aminoácido alanina. Por lo tanto, en cada posición en la que una alanina se especifique por un codón, el codón puede alterarse a cualquiera de los codones descritos sin alterar el polipéptido codificado. Dichas variaciones de ácido nucleico son "variaciones silenciosas" y representan una especie de variación modificada de forma conservativa. Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en el presente documento para hacer referencia a un polímero de restos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácidos son un análogo químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural. La naturaleza esencial de dichos análogos de aminoácidos de origen natural es que, cuando se incorporan en una proteína, esa proteína es específicamente reactiva a anticuerpos inducidos para la misma proteína pero que consiste totalmente en aminoácidos de origen natural. Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" también incluyen modificaciones incluyendo, pero sin limitación, glucosilación, unión de lípidos, sulfatación, gamma-carboxilación de restos de ácido glutámico, hidroxilación y ADP-ribosilación.

Dentro del contexto de la presente solicitud, los oligómeros (tales como oligonucleótidos, oligopéptidos) se consideran una especie del grupo de polímeros. Los oligómeros tienen un número relativamente bajo de unidades monoméricas, en general 2-100, en particular 6-100.

"Casete de expresión" como se usa en el presente documento significa una secuencia de ADN capaz de dirigir la expresión de una secuencia de nucleótidos particular en una célula hospedadora apropiada, que comprende un promotor unido operativamente con la secuencia de nucleótidos de interés que está unida operativamente con señales de terminación. También comprende típicamente secuencias requeridas para traducción apropiada de la secuencia de nucleótidos. La región codificante habitualmente codifica una proteína de interés, pero también puede codificar un ARN de interés funcional, por ejemplo, ARN antisentido o un ARN no traducido, en la dirección con sentido o antisentido. El casete de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos de interés puede ser quimérico, lo que significa que al menos uno de sus componentes es heterólogo con respecto a al menos uno de sus otros componentes. El casete de expresión también puede ser uno que es de origen natural pero que se ha obtenido en una forma recombinante útil para expresión heteróloga. La expresión de la secuencia de nucleótidos en el casete de expresión puede estar bajo el control de un promotor constitutivo o de un promotor inducible que inicia la transcripción solamente cuando la célula hospedadora se expone a algún estímulo externo particular. En el caso de un organismo multicelular, el promotor también puede ser específico para un tejido u órgano o estadio de desarrollo particular.

El término "vector" como se usa en el presente documento se refiere a una construcción consistente en material genético diseñado para dirigir la transformación de una célula diana. Un vector contiene múltiples elementos genéticos orientados posicional y secuencialmente, es decir, unidos operativamente con otros elementos necesarios de modo que el ácido nucleico en un casete de ácido nucleico puede transcribirse y, cuando sea necesario, traducirse en las células transformadas.

En particular, el vector puede seleccionarse del grupo de vectores virales, (bacterio) fagos, cósmidos o plásmidos. El vector también puede ser un cromosoma artificial de levadura (YAC), un cromosoma artificial bacteriano (BAC) o vector binario de *Agrobacterium*. El vector puede estar en una forma lineal o circular bi o monocatenaria que puede ser o no autotransmisible o movilizable, y que puede transformar un hospedador procarionta o eucariota por integración en el genoma celular o existir extracromosómicamente (por ejemplo plásmido de replicación autónoma con un origen de replicación). Específicamente se incluyen vectores lanzadera por lo que se entiende un vehículo de ADN con capacidad, de forma natural o por diseño, de replicación en dos organismos hospedadores diferentes, que pueden seleccionarse de actinomicetos y especies relacionadas, bacterias y eucariotas (por ejemplo células de plantas superiores, mamíferos, levadura u hongos). Preferentemente el ácido nucleico en el vector está bajo el control de, y unido operativamente con, un promotor apropiado u otros elementos reguladores para transcripción en una célula hospedadora tal como una célula microbiana, por ejemplo, bacteriana o vegetal. El vector puede ser un vector de expresión bifuncional que actúa en múltiples hospedadores. En el caso de ADN genómico, este puede



contener su propio promotor u otros elementos reguladores y en el caso de ADNc este puede estar bajo el control de un promotor apropiado u otros elementos reguladores para expresión en la célula hospedadora.

5 Pueden prepararse vectores que contienen un ácido polinucleico de acuerdo con la invención basándose en metodología conocida en la técnica en sí misma. Por ejemplo, se puede usar una secuencia de ADNc que codifica el polipéptido de acuerdo con la invención unida operativamente con elementos reguladores adecuados, tales como secuencias de ácido nucleico reguladores de la transcripción o la traducción.

10 El término "vector" como se usa en el presente documento, incluye referencia a un vector para trabajo de clonación convencional ("vector de clonación") así como para un tipo de vectores más especializado, como un vector de expresión (autosómico) y un vector de clonación usado para integración en el cromosoma de la célula hospedadora ("vector de integración").

15 Los "vectores de clonación" típicamente contienen uno o un número pequeño de sitios de reconocimiento de endonucleasas de restricción en los que pueden insertarse secuencias de ADN ajeno de una manera determinable sin pérdida de función biológica esencial del vector, así como un gen marcador que es adecuado para su uso en la identificación y selección de células transformadas con el vector de clonación.

20 La expresión "vector de expresión" se refiere a una molécula de ADN, lineal o circular, que comprende un segmento que codifica un polipéptido de interés bajo el control de (es decir unido operativamente con) segmentos de ácido nucleico adicionales que posibilitan su transcripción. Dichos segmentos adicionales pueden incluir secuencias promotoras y terminadoras, y pueden incluir opcionalmente uno o más orígenes de replicación, uno o más marcadores seleccionables, un potenciador, una señal de poliadenilación y similares. Los vectores de expresión generalmente derivan de ADN plasmídico o viral, o pueden contener elementos de ambos. En particular un vector de expresión comprende una secuencia de nucleótidos que comprende en la dirección 5' a 3' y unidos operativamente: 25 (a) una región de inicio de la transcripción y de la traducción que se reconoce por el organismo hospedador, (b) una secuencia codificante de un polipéptido de interés, y (c) una región de terminación de la transcripción y la traducción que se reconoce por el organismo hospedador. "Plásmido" se refiere a ADN extracromosómico de replicación autónoma que no está integrado en el genoma de un microorganismo y es habitualmente de naturaleza circular.

30 Un "vector de integración" se refiere a una molécula de ADN, lineal o circular, que puede incorporarse en el genoma de un microorganismo y posibilita una herencia estable de un gen que codifica un polipéptido de interés. El vector de integración comprende en general uno o más segmentos que comprenden una secuencia génica que codifica un polipéptido de interés bajo el control de (es decir, unido operativamente con) segmentos de ácido nucleico 35 adicionales que posibilitan su transcripción. Dichos segmentos adicionales pueden incluir secuencias promotoras y terminadoras, y uno o más segmentos que conducen la incorporación del gen de interés en el genoma de la célula diana, habitualmente por el proceso de recombinación homóloga. Típicamente, el vector de integración será uno que pueda transferirse a la célula diana, pero que tiene un replicón que no es funcional en ese organismo. La integración del segmento que comprende el gen de interés puede seleccionarse si se incluye un marcador apropiado dentro de ese segmento.

40 Como se usa en el presente documento, la expresión "unido operativamente" o "unido de forma operativa" se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes descritos en este modo están en una relación que les permite actuar de su manera pretendida. Una secuencia de control "unida operativamente" con otra secuencia de control y/o con una secuencia codificante se liga de tal manera que se consiga transcripción y/o expresión de la secuencia codificante en condiciones compatibles con la secuencia de control. En general, unido operativamente significa que las secuencias de ácido nucleico que se unen son continuas y, cuando sea necesario unir dos regiones codificantes de proteínas, contiguas y en la misma fase de lectura.

50 La expresión "valenceno sintasa" se usa en el presente documento para polipéptidos que tengan actividad catalítica en la formación de valenceno a partir de farnesil difosfato, y para otros restos que comprenden dicho polipéptidos. Los ejemplos de dichos otros restos incluyen complejos de dicho polipéptido con uno o más polipéptidos adicionales, otros complejos de dichos polipéptidos (por ejemplo complejos de metaloproteína), compuestos macromoleculares que comprenden dicho polipéptido y otro resto orgánico, dicho polipéptido unido a un material de soporte, etc. La valenceno sintasa puede proporcionarse en su ambiente natural, es decir, dentro de una célula en la que se ha producido, o en el medio al que se ha excretado por la célula que la produce. También puede proporcionarse separada de la fuente que ha producido el polipéptido y puede manipularse por unión con un vehículo, marcarse con un resto de marcaje y similares.

60 La expresión "homólogo funcional" de una secuencia, o abreviado "homólogo", como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido que comprende dicha secuencia específica a condición de que uno o más aminoácidos se sustituyan, supriman, añadan y/o inserten, y cuyo polipéptido tiene (cualitativamente) la misma funcionalidad enzimática para conversión de sustrato en caso de que se use la expresión "homólogo funcional" para una enzima, es decir, un homólogo de la secuencia con SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4 que tiene actividad catalítica 65 en la formación de valenceno a partir de farnesil difosfato. En los ejemplos se describe un ensayo que es adecuado

para verificar si un polipéptido o un resto que comprende un polipéptido es una valenceno sintasa (“ensayo de actividad valenceno sintasa”). Además, el experto en la materia reconoce que también pueden definirse secuencias de nucleótidos equivalentes abarcadas por la presente invención por su capacidad para hibridar, en condiciones bajas, moderadas y/o rigurosas, con las secuencias de nucleótidos que están dentro del alcance literal de las reivindicaciones presentes.

Un homólogo preferido para SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4 de acuerdo con la invención tiene una especificidad hacia catálisis de formación de valenceno, expresada como la relación molar de valenceno con respecto a germacreno A (un producto secundario conocido, formado en reacciones catalizadas por valenceno sintasa conocidas) de al menos 3:1, en particular de al menos 4:1, cuando se determina pH 7, usando el ensayo de actividad valenceno sintasa descrito posteriormente en el presente documento en los Ejemplos (usando un polipéptido purificado). Dicha relación puede ser infinita (1:0, es decir, sin cantidad detectable de germacreno A formada), o hasta 100:1, o hasta 10:1 o hasta 5:1.

La identidad o similitud de secuencia se define en el presente documento como una relación entre dos o más secuencias polipeptídicas o dos o más secuencias de ácido nucleico, como se determina comparando esas secuencias. Habitualmente, las identidades o similitudes de secuencia se comparan sobre la longitud completa de las secuencias, pero también puede, sin embargo, compararse solamente para una parte de las secuencias que se alinean entre sí. En la técnica, “identidad” o “similitud” también significan el grado de relación de secuencia entre secuencias polipeptídicas o secuencias de ácido nucleico, según sea el caso, como se determina por la coincidencia entre dichas secuencias. La identidad de secuencia como se usa en el presente documento es el valor determinado por el Algoritmo de Alineamiento por Pares de EMBOSS “Needle”, por ejemplo, en el servidor del Instituto de Bioinformática Europeo (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align/>). Para el alineamiento de secuencias de aminoácidos los parámetros por defecto son: Matriz = Blosum62; Penalización de Apertura de Hueco = 10,0; Penalización de Extensión de Hueco = 0,5. Para alineamiento de secuencias de ácido nucleico los parámetros por defecto son: Matriz = DNFull; Penalización de Apertura de Hueco = 10,0; Penalización de Extensión de Hueco = 0,5.

Las discrepancias entre una valenceno sintasa de acuerdo con SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4 o un ácido nucleico de acuerdo con SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3 disponible y un homólogo funcional de dicha valenceno sintasa puede ser en particular el resultado de modificaciones realizadas, por ejemplo para mejorar una propiedad de la valenceno sintasa o ácido polinucleico (por ejemplo, expresión mejorada) por una técnica biológica conocida por los expertos en la materia, tal como por ejemplo evolución molecular o diseño racional o usando una técnica de mutagénesis conocida en este campo (mutagénesis aleatoria, mutagénesis dirigida, evolución dirigida, recombinación génica, etc.). La secuencia de la valenceno sintasa o de ácido nucleico puede alterarse en comparación con las secuencias de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 3, respectivamente, como resultado de una o más variaciones de origen natural. Son ejemplos de dichas modificaciones/variaciones naturales diferencias en glucosilación (más ampliamente definidas como “modificaciones postraduccionales”), diferencias debidas a corte y empalme alternativo, y polimorfismos de un único ácido nucleico (SNP). El ácido nucleico puede modificarse de modo que codifique un polipéptido que difiera en al menos un aminoácido del polipéptido de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4, de modo que codifique un polipéptido que comprenda una o más sustituciones, supresiones y/o inserciones de aminoácidos en comparación con SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4, cuyo polipéptido aún tiene actividad valenceno sintasa. Además, puede usarse optimización de codones u optimización de pares de codones, por ejemplo, basándose en un método descrito en el documento WO 2008/000632 o como se proporciona por compañías de síntesis de ADN comerciales como DNA2.0, Geneart y GenScript. Los ejemplos de secuencias de codones optimizados incluyen SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19.

Una o más secuencias que codifican péptidos señal apropiados que no se asocian de forma natural con los polipéptidos de la invención pueden incorporarse en vectores (de expresión). Por ejemplo, una secuencia de ADN para un líder de péptido señal pueden fusionarse en fase con una secuencia de ácido nucleico de la invención de modo que el polipéptido de la invención se traduzca inicialmente como una proteína de fusión que comprende el péptido señal. Dependiendo de la naturaleza del péptido señal, el polipéptido expresado se dirigirá de forma diferente. Un péptido señal secretor que es funcional en las células hospedadoras pretendidas, por ejemplo, potencia la secreción extracelular del polipéptido expresado. Otros péptidos señal dirigen los polipéptidos expresados a ciertos orgánulos, como los cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas. El péptido señal puede escindirse del polipéptido tras su transporte al orgánulo pretendido o de la célula. Es posible proporcionar una fusión de una secuencia peptídica adicional en el extremo amino o carboxilo terminal de un polipéptido de acuerdo con SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4 u homólogo del mismo.

Como se ha mencionado anteriormente la invención se refiere además a una célula hospedadora que comprende un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico heteróloga de acuerdo con la invención. Por “célula hospedadora” se entiende una célula que contiene un vector y soporta la replicación y/o expresión del vector.

El ácido nucleico de la invención es heterólogo para la célula hospedadora. La célula hospedadora puede ser una célula procariota, una célula eucariota o una célula de un miembro de las *Archaea*. La célula hospedadora puede ser

de cualquier organismo, en particular cualquier organismo no humano. En particular la célula hospedadora puede seleccionarse de células bacterianas, células fúngicas, arqueas, protistas, células vegetales (incluyendo algas), células que se originan de un animal (en particular aisladas de dicho animal). La célula hospedadora puede formar parte de un organismo multicelular, distinto del ser humano o del organismo del que se origina de forma natural la enzima (tal como *Chamaecyparis nootkatensis* en caso de la valenceno sintasa de SEQ ID NO: 4). En una realización específica, las células hospedadoras de la invención están en un cultivo de células que se originan de un organismo multicelular, pero aisladas del mismo.

En general, la célula hospedadora es un organismo que comprende genes para expresar las enzimas para catalizar las etapas de reacción de la ruta del mevalonato u otra ruta metabólica (tal como la ruta de desoxixilulosa-5-fosfato (DXP)) lo que permite la producción de los C5 prenil difosfatos isopentenil difosfato (IPP) y dimetilalil difosfato (DMAPP), que son los componentes básicos de isoprenoides universales. Hasta donde se conoce, a no ser que se hayan inactivado genes específicos, todos los organismos conocidos comprenden dicha ruta. Los eucariotas son en general capaces de forma natural de preparar IPP mediante la ruta de mevalonato. Este IPP se isomeriza después a DMAPP mediante la acción de la enzima isopentenil difosfato isomerasa (Idi). La ruta de DXP, que facilita IPP y DMAPP en una relación 5:1, es habitual para procariotas, aunque varios procariotas son capaces de forma natural de preparar IPP mediante la ruta de mevalonato. Estas rutas se conocen en la técnica, y se han descrito, por ejemplo, en Withers y Keasling en Appl. Microbiol. Biotechnol. (2007) 73: 980-990, cuyos contenidos con respecto a la descripción de estas rutas, y en particular la Figura 1 y las enzimas mencionadas en dicha publicación que desempeñan un papel en una o ambas de dichas rutas, se incluyen por referencia. Los genes de estas rutas pueden cada uno de forma independiente ser homólogos o heterólogos de la célula.

Las células hospedadoras comprenderán además, bien de forma endógena o bien de fuentes heterólogas, uno o más genes para expresar enzimas con actividad prenil transferasa que cataliza la condensación de cabeza a cola de los C5 prenil difosfatos que producen prenil difosfatos más largos. El precursor de sesquiterpeno universal farnesil difosfato (FPP), por ejemplo, se forma por la acción de estas enzimas mediante la adición de cabeza a cola sucesiva de 2 moléculas de IPP a 1 molécula de DMAPP.

En una realización, la célula hospedadora es una bacteria. La bacteria puede ser gram positiva o gram negativa. Pueden seleccionarse bacterias gram positivas de los géneros de *Bacillus* y *Lactobacillus*, en particular de las especies de *Bacillus subtilis* y *Lactobacillus casei*.

En una realización preferida, las bacterias se seleccionan del grupo de bacterias gram negativas, en particular del grupo de *Rhodobacter*, *Paracoccus* y *Escherichia*, más en particular del grupo de *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Paracoccus carotinifaciens*, *Paracoccus zeaxanthinifaciens* y *Escherichia coli*. *Rhodobacter sphaeroides* es un ejemplo de un organismo que contiene de forma natural todos los genes necesarios para expresar enzimas que catalizan las diversas etapas de reacción en la ruta DXP, permitiendo la producción intracelular de IPP y DMAPP.

En una realización, la célula hospedadora es una célula fúngica, en particular una célula fúngica seleccionada del grupo de *Aspergillus*, *Blakeslea*, *Penicillium*, *Phaffia* (*Xanthophyllomyces*), *Pichia*, *Saccharomyces* y *Yarrowia*, más en particular del grupo de *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Blakeslea trispora*, *Penicillium chrysogenum*, *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*), *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Yarrowia lipolytica*.

También es posible expresar los ácidos nucleicos de la invención en células derivadas de organismos eucariotas superiores, tales como células vegetales y células animales, tales como células de insecto, o células de ratón, rata o ser humano. Dichas células pueden mantenerse en un cultivo celular o tisular y usarse para producción *in vitro* de valenceno sintasa.

Puede seleccionarse en particular un organismo multicelular que comprende células hospedadoras de acuerdo con la invención a partir del grupo de plantas multicelulares y hongos (*Basidiomycetes*).

Por lo tanto, en una realización específica, la invención se refiere a una planta transgénica o cultivo celular o tisular vegetal que comprende células vegetales transgénicas, comprendiendo dicha planta o dicho cultivo células hospedadoras vegetales de acuerdo con la invención. La planta transgénica o el cultivo de células vegetales transgénicas pueden seleccionarse en particular de *Nicotiana* spp., *Solanum* spp., *Cichorium intybus*, *Lactuca sativa*, *Mentha* spp., *Artemisia annua*, plantas formadoras de tubérculos, tales como *Helianthus tuberosus*, yuca y *Beta vulgaris*, cultivos oleaginosos tales como *Brassica* spp., *Elaeis* spp. (palma aceitera), *Helianthus annuus*, *Glycine max* y *Arachis hypogaea*, plantas de cultivo líquido tales como lenteja de agua *Lemna* spp., células BY2 de tabaco y *Physcomitrella patens*, árboles, tales como pino y chopo, respectivamente un cultivo celular o un cultivo tisular de cualquiera de dichas plantas. En una realización específica, el cultivo tisular es un cultivo de raíces pilosas.

En una realización específica la invención se refiere a un hongo transgénico o cultivo que comprende células de hongos transgénicos. El hongo transgénico o cultivo que comprende células hospedadoras transgénicas, puede en

particular seleccionarse del grupo de *Schizophyllum*, *Agaricus* y *Pleurotus*, más en particular de *Schizophyllum commune*, el champiñón común (*Agaricus bisporus*), el champiñón ostra (*Pleurotus ostreotus* y *Pleurotus sapidus*), respectivamente un cultivo que comprende células de cualquiera de dichos hongos. Una ventaja adicional para usar hongos para expresar la valenceno sintasa es que al menos algunos hongos pueden convertir valenceno en nootkatona (Fraatz, M.A. *et al.*, J. Mol. Catal. B: Enzym. (2009) 61: 202-207).

Junto a la producción de valenceno en sí misma, la expresión de valenceno sintasa de acuerdo con la invención y producción de valenceno en plantas u hongos también proporciona resistencia en estos organismos. En primer lugar, se sabe que el valenceno actúa como un repelente de insecto y es activo contra insectos tales como mosquitos, cucarachas, garrapatas, pulgas, termitas y *Drosophila*. Además, se ha mostrado que el valenceno hace a las plantas resistentes a patógenos, tales como el hongo *Phytophthora*, especialmente *P. ramorum* (agente de muerte repentina del roble) (Manter, D.K. *et al.*, Forest Pathology (2006) 36: 297-308).

Una célula hospedadora de acuerdo con la invención puede producirse basándose en técnicas de biología molecular y genética convencionales que se conocen en general en este campo, por ejemplo, como se describe en Sambrook, J., y Russell, D.W. "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" 3ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (2001); y F.M. Ausubel *et al.*, eds., "Current protocols in molecular biology", John Wiley and Sons, Inc., Nueva York (1987), y suplementos posteriores de las mismas.

Se conocen métodos para transformar *Basidiomycetes*, por ejemplo, de Alves *et al.* (Appl. Environ. Microbiol. (2004) 70: 6379-6384), Godio *et al.* (Curr. Genet. (2004) 46: 287-294), Schuurs *et al.* (Genetics (1997) 147: 589-596), y documento WO 06/096050. Para conseguir expresión de un gen de valenceno sintasa adecuado en basidiomicetos, su fase abierta de lectura completa se clona típicamente en un vector de expresión adecuado para transformación de basidiomicetos. El vector de expresión preferentemente también comprende secuencias de ácido nucleico que regula el inicio y la terminación de la transcripción. También se prefiere incorporar al menos un gen marcador seleccionable para permitir la selección de transformantes. Puede conseguir expresión de una valenceno sintasa usando un promotor de basidiomiceto, por ejemplo, un promotor constitutivo o un promotor inducible. Un ejemplo de un promotor constitutivo fuerte es el promotor de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (gpdA). Este promotor se prefiere para expresión constitutiva cuando se expresa material de ADN recombinante en un hospedador basidiomiceto. Otros ejemplos son el promotor de fosfoglicerato quinasa (pgk), el promotor de piruvato quinasa (pki), TPI, el promotor de triosa fosfato isomerasa (tpi), el promotor de la subunidad g de APC sintetasa (oliC), el promotor de sc3 y el promotor de acetamidasa (amdS) de un basidiomiceto (documento WO 96/41882).

Si es necesario, la secuencia de nucleótidos primaria del gen de la valenceno sintasa puede adaptarse al uso codónico del hospedador basidiomiceto.

Además, la expresión puede dirigirse especialmente al micelio (monocariota) o a los cuerpos fructíferos (dicariotas). En el último caso, el promotor de Fbh1 de *Pleurotis* es especialmente útil (Penas, M.M. *et al.*, Mycologia (2004) 96: 75-82).

Se describen en la técnica metodologías para la construcción de construcciones de transformación de plantas. Puede conseguirse sobreexpresión mediante inserción de una o más de una copia extra del gen seleccionado. No es desconocido que plantas o su descendencia, originalmente transformadas con una o más de una copias extra de una secuencia de nucleótidos, muestren sobreexpresión.

La obtención de niveles suficientes de expresión transgénica en los tejidos vegetales apropiados es un aspecto importante en la producción de cultivos modificados por ingeniería genética. La expresión de secuencias de ADN heterólogo en un hospedador vegetal depende de la presencia de un promotor unido operativamente que es funcional dentro del hospedador vegetal. La elección de la secuencia promotora determinará cuándo y dónde dentro del organismo se expresa la secuencia de ADN heterólogo. Aunque se ha mostrado que muchos promotores de dicotiledóneas son operativos en monocotiledóneas y viceversa, idealmente se seleccionan promotores dicotiledóneos para expresión en dicotiledóneas, y promotores monocotiledóneos para expresión en monocotiledóneas. Sin embargo, no hay ninguna restricción para la procedencia de promotores seleccionados; es suficiente con que sean operativos en la conducción de la expresión de las secuencias de nucleótidos en la célula o el tejido deseados. En algunos casos, es deseable la expresión en múltiples tejidos, y pueden usarse a este respecto promotores constitutivos tales como la serie de promotores 35S. Sin embargo, en algunas realizaciones de la presente invención se prefiere que la expresión en plantas transgénicas sea específica de hoja, más preferentemente la expresión del gen se produce en los plastidios de hojas. El promotor del gen de isopreno sintasa de *Populus alba* (PalspS) (Sasaki *et al.*, FEBS Letters (2005) 579: 2514-2518) parece conducir la expresión específica de plastidios. Por lo tanto, este promotor es un promotor muy adecuado para su uso en un vector de expresión de la presente invención.

Otros promotores específicos de hojas adecuados son el promotor de rbsC (Rubisco) (por ejemplo del café, véase documento WO 02/092822); de *Brassica*, véase el documento US 7.115.733; de soja (véase Dhanker, O., *et al.*, Nature Biotechnol. (2002) 20: 1140-1145), el promotor de cy-FBPasa (véase documento US 6.229.067), la

secuencia de promotor de la proteína de unión a clorofila a/b de fotocaptación de palma aceitera (véase documento US 2006/0288409), el promotor de STP3 de *Arabidopsis thaliana* (véase, Büttner, M. *et al.*, Plant cell & Environ. (2001) 23: 175-184), el promotor del gen de PAL2 de judía (véase Sablowski, R.W. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92: 6901-6905), secuencias potenciadoras del promotor ST-LS1 de la patata (véase Stockhaus, J. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 84: 7943-7947), el promotor CAB1 del trigo (véase Gotor, C. *et al.*, Plant J. (1993) 3: 509-518), el promotor específico de estromas del gen de la ADP-glucosa-fosforilasa de la patata (véase documento US 5.538.879), el elemento LPSE1 del gen P(D540) del arroz (véase documento CN 2007/10051443), y el promotor específico de estromas *pGC1*(At1g22690) de *Arabidopsis thaliana* (véase Yang, Y. *et al.*, Plant Methods (2008) 4: 6).

Las especies vegetales pueden transformarse, por ejemplo, por la transformación mediada por ADN de protoplastos de células vegetales y posterior regeneración de la planta a partir de los protoplastos transformados de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica.

Los ejemplos adicionales de métodos de transformación de células vegetales incluyen microinyección (Crossway *et al.*, Mol. Gen. Genet. (1986) 202: 179-185), electroporación (Riggs, C.D. y Bates, G.W., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1986), 83: 5602-5606), transformación mediada por *Agrobacterium* (Hinchey *et al.*, Bio/Technol. (1988) 6: 915-922), transferencia génica directa (Paszowski, J. *et al.*, EMBO J. (1984) 3: 2717-2722), y aceleración de partículas balística usando dispositivos disponibles de Agracetus, Inc., Madison, Wisconsin y BioRad, Hercules, California (véase, por ejemplo, Sanford *et al.*, Patente de Estados Unidos n.º 4.945.050 y Solicitud de Patente Europea EP 0 332 581).

También es posible emplear el método de transformación de protoplastos para maíz (Solicitud de Patente Europea 0 292 435, Patente de Estados Unidos n.º 5.350.689).

Se prefiere en particular usar los vectores de tipo binario de plásmidos Ti y Ri de *Agrobacterium* spp. Los vectores derivados de Ti transforman una amplia diversidad de plantas superiores, incluyendo plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, tales como soja, algodón, colza, tabaco y arroz (Pacciotti *et al.*, Bio/technol. (1985) 3: 241; Byrne M.C. *et al.*, Plant Cell Tissue and Organ Culture (1987) 8: 3-15; Sukhapinda, K. *et al.*, Plant Mol. Biol. (1987) 8: 209-217; Hiei, Y. *et al.*, The Plant J. (1994) 6: 271-282). El uso de ADN-T para transformar células vegetales ha recibido estudio exhaustivo y se describe ampliamente (por ejemplo, documento EP-A 120 516). Para introducción en plantas, los genes quiméricos de la invención pueden insertarse en vectores binarios como se describe en los ejemplos.

Otros métodos de transformación están disponibles para los expertos en la materia, tales como captación directa de construcciones de ADN ajeno (véase documento EP-A 295 959), técnicas de electroporación (Fromm, M.E. *et al.*, Nature (1986), 319: 791-793) o bombardeo balístico de alta velocidad con partículas metálicas recubiertas con las construcciones de ácido nucleico (por ejemplo documento US 4.945.050). Una vez transformadas, las células pueden regenerarse por los expertos en la materia. Son de particular relevancia los métodos para transformar genes ajenos en cultivos comercialmente importantes, tales como colza (De Block, M. *et al.*, Plant Physiol. (1989) 91: 694-701), girasol (Everett, N.P. *et al.*, Bio/Technology (1987) 5: 1201-1204), soja (documento EP-A 301 749), arroz (Hiei, Y. *et al.*, The Plant J. (1994) 6: 271-282) y maíz (Fromm *et al.*, 1990, Bio/Technology 8: 833-839).

Los expertos en la materia apreciarán que la elección del método podría depender del tipo de planta, es decir, monocotiledónea o dicotiledónea.

En otra realización, el vector como se describe en el presente documento puede transformarse directamente en el genoma del plastidio. La tecnología de transformación de plastidio se describe exhaustivamente, por ejemplo, en los documentos US 5.451.513, US 5.545.817, US 5.545.818 y WO 95/16783. La técnica básica para transformación de cloroplastos implica introducir regiones de ADN de plastidio clonado que flanquea un marcador seleccionable junto con el gen de interés en un tejido diana adecuado, por ejemplo, usando biolística o transformación de protoplastos (por ejemplo, transformación mediada por cloruro cálcico o PEG).

Las células de *Agrobacterium tumefaciens* que contienen un vector de acuerdo con la presente invención, en las que el vector comprende un plásmido Ti, son útiles en métodos para preparar plantas transformadas. Las células vegetales se infectan con una *Agrobacterium tumefaciens* como se ha descrito anteriormente para producir una célula vegetal transformada, y después se regenera una planta a partir de la célula vegetal transformada. Se conocen numerosos sistemas de vectores *Agrobacterium* útiles para llevar a cabo la presente invención. Estos portan típicamente al menos una secuencia límite de ADN-T e incluyen vectores tales como pBIN19 (Bevan, Nucl. Acids Res. (1984) 12: 8711-8720).

Se realizan métodos que usan una forma de transferencia génica directa o transferencia mediada por *Agrobacterium* habitualmente, pero no necesariamente, con un marcador seleccionable que puede proporcionar resistencia a un antibiótico (por ejemplo, kanamicina, higromicina o metotrexato) o un herbicida (por ejemplo, fosfinotricina). La elección de marcador seleccionable para transformación vegetal no es, sin embargo, crítica para la invención.

Se proporcionan métodos generales para cultivar tejidos vegetales por ejemplo en Maki, K.Y. *et al.*, Plant Physiol. (1993) 15: 473-497; y en Phillips, R.I. *et al.* En: Sprague GF, Dudley JW, eds. Corn and corn improvement. 3ª edn. Madison (1988) 345-387.

Después de la transformación las células vegetales transgénicas se colocan en un medio selectivo apropiado para selección de células transgénicas que después se cultivan para generar callos. Se dejan crecer brotes a partir de callos y se generan plántulas a partir de los brotes dejando crecer en medio de enraizamiento. El marcador particular usado permitirá la selección de células transformadas en comparación con células que carecen del ADN que se ha introducido.

Para confirmar la presencia de los transgenes en células y plantas transgénicas, puede realizarse una diversidad de ensayos. Dichos ensayos incluyen, por ejemplo, ensayos "biológicos moleculares" bien conocidos por los expertos en la materia, tales como transferencia de Southern y Northern, hibridación *in situ* y métodos de amplificación basados en ácidos nucleicos tales como PCR o RT-PCR y ensayos "bioquímicos" tales como detectar la presencia de un producto proteico, por ejemplo, mediante medios inmunológicos (ELISA y transferencias de Western) o mediante función enzimática. La presencia de valenceno sintasa enzimáticamente activa puede establecerse por análisis químico de productos volátiles (valenceno) de la planta.

Puede usarse una valenceno sintasa de acuerdo con la invención para la producción industrial de valenceno, pudiéndose usarse dicho valenceno en sí mismo como un saporífero o aroma, por ejemplo, en un producto alimentario, o como una fragancia, por ejemplo, en un producto doméstico, o como un intermedio para la producción de otro isoprenoide, por ejemplo nootkatona.

Un método para producir valenceno de acuerdo con la invención comprende preparar valenceno en presencia de valenceno sintasa. En principio dicho método puede basarse en cualquier técnica para emplear una enzima en la preparación de un compuesto de interés.

El método puede ser un método en el que FPP o cualquiera de sus precursores (tales como farnesol, IPP, isopentenil fosfato, 3-metilbut-3-en-1-ol e incluso mevalonato) se proporciona como sustrato a células que comprenden la valenceno sintasa. Como alternativa el método puede ser también un método en el que se usa un organismo vivo que comprende un sistema enzimático capaz de formar FPP a partir de una fuente de carbono adecuada, estableciendo de este modo una vía fermentativa completa a valenceno. Debería observarse que el término "fermentativo" se usa en el presente documento en un sentido amplio para procesos en los que se usa un cultivo de un organismo para sintetizar un compuesto a partir de una materia prima adecuada (por ejemplo, un carbohidrato, una fuente de aminoácidos, una fuente de ácidos grasos). Por lo tanto, se entiende en el presente documento que los procesos fermentativos no están limitados a condiciones anaerobias, y se extienden a procesos en condiciones aerobias. Se conocen en general para especies de (micro)organismos materias primas adecuadas.

También se puede usar la valenceno sintasa aislada de la célula en la que se ha producido, por ejemplo, en un sistema de reacción en el que el sustrato (FPP) y la valenceno sintasa se ponen en contacto en condiciones adecuadas (pH, disolvente, temperatura), pudiendo basarse dichas condiciones en la técnica anterior a la que se hace referencia en el presente documento y la presente divulgación, opcionalmente en combinación con algunos ensayos rutinarios. La valenceno sintasa puede solubilizarse, por ejemplo, en un medio acuoso en el que también está presente el FPP o la valenceno sintasa puede inmovilizarse en un material de soporte de una manera conocida en la técnica y después ponerse en contacto con un líquido que comprende el FPP. Ya que la enzima tiene una actividad y/o selectividad alta para la catálisis de FPP a valenceno, la presente invención también es ventajosa para dicho método *in vitro*, no solamente en condiciones ácidas, sino también en el caso de que el pH sea aproximadamente neutro o alcalino. Las condiciones adecuadas pueden basarse en metodología conocida para valenceno sintasas conocidas, por ejemplo referidas en la bibliografía a la que se hace referencia en el presente documento, la información desvelada en el presente documento, el conocimiento general común y opcionalmente alguna experimentación rutinaria.

En un método particularmente ventajoso de la invención, el valenceno se prepara de forma fermentativa, es decir, cultivando células que expresen valenceno sintasa en un medio de cultivo. La reacción real catalizada por la valenceno sintasa puede tener lugar intracelularmente o, si la valenceno sintasa se excreta al medio de cultivo, extracelularmente en el medio del cultivo.

Las células usadas en un método para preparar valenceno de acuerdo con la invención pueden ser en particular células hospedadoras de acuerdo con la invención. Si se desea, estas células hospedadoras pueden modificarse técnicamente para proporcionar el FPP a la valenceno sintasa en cantidades mayores. Esto puede realizarse, por ejemplo, potenciando el flujo de carbono hacia FPP, que a su vez puede realizarse de diferentes maneras. En células hospedadoras con una ruta de DXP endógena (como *E. coli* y *R. sphaeroides*) la desregulación de la expresión de estas enzimas de la ruta puede tener un efecto positivo claro en la formación de isoprenoides. La sobreexpresión de *dxs* que codifica 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa (DXP sintasas), la primera enzima de la

ruta de DXP y por lo tanto uno de los principales objetivos para ingeniería metabólica, ha dado como resultado biosíntesis aumentada de varios isoprenoides (por ejemplo, Matthews y Wurtzel, Appl. Microbiol. Biotechnol. (2000) 53: 396-400; Huang *et al.*, Bioorg. Med. Chem. (2001) 9: 2237-2242; Harker y Bramley, FEBS Lett (1999) 448: 115-119; Jones *et al.* Metab. Eng. (2000) 2: 328-338; y Yuan *et al.* Metab. Eng. (2006) 8: 79-90). Además de la sobreexpresión de *dxr* que codifica DXO isomerorreductasa (también conocida como 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa), catalizando la enzima la etapa segunda y comprometida en la ruta de DXP, puede conducir a producción de isoprenoides aumentada (Albrecht *et al.*, Biotechnol. Lett. (1999) 21: 791-795), cuyo efecto puede aumentarse adicionalmente por co-sobreexpresión de *dxs* al mismo tiempo (Kim & Keasling, Biotechnol Bioeng (2001) 72: 408-415). Se obtuvo adicionalmente un efecto positivo en la biosíntesis de isoprenoides mediante sobreexpresión de isopentenil difosfato isomerasa (IPP isomerasa, Idi), la enzima que cataliza la interconversión de IPP a dimetilalil difosfato, DMAPP (por ejemplo, Kajiwara *et al.* Biochem. J. (1997) 324: 421-426); Misawa y Shimada, J. Biotech. (1998) 59: 169-181; y Yuan *et al.* Metab. Eng. (2006) 8: 79-90) y las enzimas MEP citidililtransferasa (también conocida como 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol sintasa, IspD) y 2C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato sintasa (IspF), que se transcriben como un operón *ispDF* en *E. coli* (Yuan *et al.* Metab. Eng. (2006) 8: 79-90).

Un enfoque alternativo y más eficaz para modificar cepas con una ruta de DXP endógena para producción de alto nivel de isoprenoides es la introducción de una ruta de mevalonato heteróloga. La coexpresión en *E. coli* de la ruta de mevalonato de *Saccharomyces cerevisiae* con un gen de amorfa-4,11-dieno sintasa sintético dio como resultado la formación del sesquiterpeno amorfadieno en títulos de más de 110 mg/l cuando se cultivó la cepa de *E. coli* recombinante en un medio de glicerol LB+ (Martin *et al.* Nat. Biotechnol. (2003) 21: 796-802). Esta cepa de *E. coli* se mejoró posteriormente por la introducción de copias extra del gen *tHMG1* que codificaba el dominio catalítico C terminal de la enzima de levadura 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa. Aumentando la formación y por lo tanto la actividad de esta enzima, se redujo el nivel intracelular del intermedio de la ruta de mevalonato tóxico HMG-CoA superando de este modo la inhibición del crecimiento y conduciendo a una producción aumentada de mevalonato (Pitera *et al.* Metab. Eng. (2007) 9: 193-207). Se obtuvo mejora adicional del flujo a través de la ruta de mevalonato heteróloga mediante optimización de codones de los tres primeros genes de esta ruta en combinación con reemplazo del promotor de *lac* de tipo silvestre con el promotor de *lac UV5* dos veces más fuerte (Anthony *et al.* Met. Eng. (2009) 11: 13-19). La producción de amorfadieno pudo aumentarse aún más reemplazando los genes de levadura para HMG-CoA sintasa y HMG-CoA reductasa con los genes equivalentes para la bacteria gram positiva *Staphylococcus aureus*. En combinación con un protocolo de fermentación optimizado, el cultivo de esta nueva cepa de *E. coli* modificada técnicamente produjo un título de amorfadieno de 27,4 g/l (Tsuruta *et al.* PLoS ONE (2009) 4(2): e4489. doi:10.1371/journal.pone.0004489). De forma similar, una cepa de *E. coli* modificada técnicamente con la ruta de mevalonato de *Streptococcus pneumoniae* en combinación con el gen de la decaprenil difosfato sintasa (*ddsA*) de *Agrobacterium tumefaciens* produjo la coenzima Q<sub>10</sub> (CoQ<sub>10</sub>) en más de 2400 µg/g en peso seco celular (Zahiri *et al.* Met. Eng. (2006) 8: 406-416). También se obtuvo producción aumentada de CoQ<sub>10</sub> modificando técnicamente una cepa de *Rhodobacter sphaeroides* con la ruta de mevalonato de *Paracoccus zeaxanthinifaciens* en su forma nativa (documento WO 2005/005650) y una mutada (documento WO 2006/018211).

También células hospedadoras con una ruta de MEV endógena (como *S. cerevisiae*) han sido objeto de múltiples estudios de modificación técnica para obtener cepas hiperproductoras de isoprenoides. La introducción en *S. cerevisiae* de la ruta de DXP derivada de *E. coli* heteróloga en combinación con el gen que codifica la valenceno sintasa de cítrico dio como resultado una acumulación de cepa de aproximadamente 10 veces más valenceno en comparación con la cepa que expresaba solamente la valenceno sintasa (documento WO 2007/093962). La mayoría de mejoras en las levaduras importantes para la industria *Candida utilis* y *S. cerevisiae*, sin embargo, se han centrado en la modificación técnica de la ruta de MEV homóloga. Especialmente, la sobreexpresión de la enzima HMG-CoA reductasa, que se cree que es la principal enzima reguladora en la ruta de DXP, en su versión de longitud completa o truncada, ha parecido ser un método eficaz para aumentar la producción de isoprenoides. Este efecto estimulante de sobreexpresión de la HMG-CoA reductasa truncada en el extremo N terminal se ha observado, por ejemplo, en el caso de producción de licopenos en *C. utilis* (Shimada *et al.* Appl. Env. Microbiol. (1998) 64: 2676-2680) y producción de epi-cedrol en *S. cerevisiae* (Jackson *et al.* Org. Lett. (2003) 5: 1629-1632). En el último caso la producción del sesquiterpeno podría potenciarse adicionalmente por introducción de *upc2-1*, un alelo que induce un aumento en el flujo metabólico para biosíntesis de esteroles. Otro método para aumentar el flujo a través de la ruta de MEV es el empleo de una variante de la mevalonato quinasa que es menos sensible para la inhibición por retroalimentación por FPP y otros precursores de isoprenoides. El documento WO 2006/063752, por ejemplo, muestra que *Paracoccus zeaxanthinifaciens* R114, una bacteria con una ruta de MEV endógena, después de introducción del mutante de mevalonato quinasa N66K/I152M de *S. cerevisiae* y el gen *ddsA* de *P. zeaxanthinifaciens* ATCC 21588 produce significativamente más coenzimas Q<sub>10</sub> que la cepa de *P. zeaxanthinifaciens* correspondiente que expresa la mevalonato quinasa de *S. cerevisiae* de tipo silvestre. También se han obtenido resultados positivos similares en producción CoQ<sub>10</sub> con *P. zeaxanthinifaciens* R114 con la variante resistente a retroalimentación K93E de la mevalonato quinasa de *P. zeaxanthinifaciens* (documento WO 2004/111214).

Un segundo enfoque para aumentar las cantidades de FPP se basa en la reducción o eliminación de actividades secundarias enzimáticas en FPP. En levadura el gen *ERG9* codifica la enzima farnesil difosfato farnesil transferasa

(escualeno sintasa), que cataliza la condensación de dos restos de farnesil difosfato para formar escualeno. Debido a que esta es la primera etapa después de FPP en la biosíntesis de esterol y por lo tanto regula el flujo de unidades de isopreno a la ruta de esterol, *ERG9* es una diana frecuente en la modificación metabólica de levadura para aumentar la producción de sesquiterpeno y de carotenoides. La alteración de *ERG9* en combinación con sobreexpresión de la tHMG-CoA reductasa en la levadura *C. utilis* condujo a aumento de la producción de licopeno (Shimada *et al.* Appl. Env. Microbiol. (1998) 64: 2676-2680). Una combinación similar de la sobreexpresión de tHMG-CoA reductasa y regulación negativa de *ERG9* usando un promotor reprimible por metionina aumentó la producción de sesquiterpeno amorfadieno en levadura en aprox. 10 veces en comparación con la cepa de levadura que solamente expresa el gen de amorfadieno sintasa (Ro *et al.* Nature (2006) 440: 940-943; Lenihan *et al.* Biotechnol. Prog. (2008) 24: 1026-1032). Ya que el ergosterol es vital para crecimiento de levaduras y las células de levadura no pueden asimilar ergosterol alimentado de forma externa durante el crecimiento aeróbico, la regulación negativa/inactivación de *ERG9* se combina frecuentemente con mutaciones que equipan la cepa de levadura con captación aeróbica eficaz de ergosterol del medio de cultivo. Son ejemplos el alelo *sue* (Takahishi *et al.* Biotechnol. Bioeng. (2007) 97: 170-181) y el alelo *upc2-1* (Jackson *et al.* Org. Lett. (2003) 5: 1629-1632). Takahashi *et al.* (Biotechnol. Bioeng. (2007) 97: 170-181) también investigaron el efecto de limitar la actividad fosfatasa endógena inactivando el gen de fosfatasa *dpp1* en levadura. Aunque esta anulación claramente limitó la desfosforilación de FPP reflejada por acumulación de mucho menos farnesol, no mejoró la producción de sesquiterpeno más allá de la de las mutaciones *erg9/sue* combinadas en las condiciones de crecimiento aplicadas.

Pueden seleccionarse condiciones de reacción para preparar de forma fermentativa valenceno dependiendo de condiciones conocidas para la especie de la célula hospedadora usada (por ejemplo, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Paracoccus zeaxanthinifaciens*, *Escherichia coli*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Penicillium chrysogenum*, *Phaffia rhodozyma* y *Pichia pastoris*), la información desvelada en el presente documento, el conocimiento general habitual y opcionalmente alguna experimentación rutinaria.

En principio, el pH del medio de reacción (medio de cultivo) usado en un método de acuerdo con la invención puede elegirse dentro de límites amplios, siempre que la valenceno sintasa (en la célula hospedadora) esté activa y presente una especificidad deseada en las condiciones de pH. En caso de que el método incluya el uso de células, para expresar la valenceno sintasa, el pH se selecciona de modo que las células sean capaces de realizar su función o sus funciones pretendidas. El pH puede elegirse en particular dentro del intervalo de cuatro unidades de pH por debajo del pH neutro y dos unidades de pH por encima del pH neutro, es decir entre pH 3 y pH 9 en el caso de un sistema esencialmente acuoso a 25 °C. Se han conseguido buenos resultados, por ejemplo en un medio de reacción acuoso que tiene un pH en el intervalo de 6,8 a 7,5.

Un sistema se considera acuoso si el agua es el único disolvente o el disolvente predominante (> 50 % p, en particular, > 90 % p, basándose en líquidos totales), en el por ejemplo una cantidad menor de alcohol u otro disolvente (< 50 % p, en particular < 10 % p, basándose en líquidos totales) puede disolverse (por ejemplo como una fuente de carbono, en caso de un enfoque fermentativo completo) en una concentración tal que los microorganismos que están presentes permanezcan activos.

En particular en caso de que se usa una levadura y/o un hongo, pueden preferirse condiciones ácidas, en particular el pH puede estar en el intervalo de pH 3 a pH 8, basándose en un sistema esencialmente acuoso a 25 °C. Si se desea, el pH puede ajustarse usando un ácido y/o una base o tamponarse con una combinación adecuada de un ácido y una base.

Las condiciones anaerobias se definen en el presente documento como condiciones sin ningún oxígeno o en las que no se consume sustancialmente ningún oxígeno por las células cultivadas, en particular un microorganismo, y habitualmente corresponde a un consumo de oxígeno de menos de 5 mmol/l.h, preferentemente a un consumo de oxígeno de menos de 2,5 mmol/l.h., o más preferentemente menos de 1 mmol/l.h. Las condiciones aerobias son condiciones en las que un nivel suficiente de oxígeno para crecimiento sin restricciones se disuelve en el medio, capaz de soportar una velocidad de consumo de oxígeno de al menos 10 mmol/l.h, más preferentemente más de 20 mmol/l.h., aún más preferentemente más de 50 mmol/l.h., y más preferentemente más de 100 mmol/l.h.

Las condiciones de oxígeno limitado se definen como condiciones en las que el consumo de oxígeno está limitado por la transferencia de oxígeno del gas al líquido. El límite inferior para condiciones de oxígeno limitado se determina por el límite superior para condiciones anaerobias, es decir, habitualmente al menos 1 mmol/l.h. y en particular al menos 2,5 mmol/l.h., o al menos 5 mmol/l.h. El límite superior para condiciones de oxígeno limitado se determina por el límite inferior para condiciones aerobias, es decir menos de 100 mmol/l.h., menos de 50 mmol/l.h., menos de 20 mmol/l.h. o menos de 10 mmol/l.h.

Si las condiciones son aerobias, anaerobias o de oxígeno limitado depende de las condiciones en las que se lleva a cabo el método, en particular por la cantidad y composición de flujo de gas entrante, las propiedades de transferencia de mezcla/masa reales del equipamiento usado, el tipo de microorganismo y la densidad de microorganismos.



En principio, la temperatura usada no es crítica, siempre que la valenceno sintasa (en las células), muestre actividad sustancial. En general, la temperatura puede ser de al menos 0 °C, en particular al menos 15 °C, más en particular al menos 20 °C. Una temperatura máxima deseada depende de la valenceno sintasa y las células, en caso de un método en el que se usen células para expresar la valenceno sintasa. La temperatura es 70 °C o menos, preferentemente 50 °C o menos, más preferentemente 40 °C o menos, en particular 35 °C o menos.

En el caso de un proceso fermentativo, las condiciones de incubación pueden elegirse dentro de límites amplios siempre que las células muestren suficiente actividad y/o crecimiento. Esto incluye condiciones aerobias, de oxígeno limitado y anaerobias.

En particular si la reacción catalítica por la que se forma valenceno se lleva a cabo fuera de una célula hospedadora, un medio de reacción que comprende un disolvente orgánico puede usarse en una alta concentración (por ejemplo más del 50 %, o más del 90 % p, basándose en líquidos totales), en caso de que la valenceno sintasa que se usa conserve suficiente actividad y especificidad en dicho medio.

Si se desea, el valenceno producido en un método de acuerdo con la invención, o un compuesto adicional en el que se ha convertido valenceno después de su preparación (tal como nootkatona), se recupera del medio de reacción, en el que se ha preparado. Un método adecuado es extracción de líquido-líquido con un líquido de extracción que no es miscible con el medio de reacción.

En particular es adecuada (para extracción de un medio de reacción acuoso) la extracción con un disolvente orgánico líquido, tal como un hidrocarburo líquido. A partir de los resultados iniciales resulta evidente que este método también es adecuado para extraer el valenceno (o un producto adicional) de un medio de reacción que comprende células de acuerdo con la invención usadas para su producción, sin necesidad de lisar las células para recuperar el valenceno (o producto adicional). En particular, el disolvente orgánico puede seleccionarse de alcanos líquidos, alcoholes de cadena larga líquidos (alcoholes que tienen al menos 12 átomos de carbono), y ésteres líquidos de ácidos grasos de cadena larga (ácidos que tienen al menos 12 átomos de carbono). Los alcanos líquidos adecuados en particular incluyen alcanos C6-C16, tales como hexano, octano, decano, dodecano, isododecano y hexadecano. El alcohol alifático de cadena larga adecuado en particular incluye alcoholes alifáticos C12-C18, como alcohol oleílico y alcohol palmitoleílico. Los ésteres adecuados de ácidos grasos de cadena larga en particular incluyen ésteres de alcoholes C1-C4 de ácidos grasos C12-C18, como isopropil miristato, y etil oleato.

En una realización ventajosa, se produce valenceno (o un producto adicional) en un reactor que comprende una primera fase líquida (la fase de reacción), conteniendo dicha primera fase líquida células de acuerdo con la invención en cuyas células se produce el valenceno (o un producto adicional), y una segunda fase líquida (fase orgánica que permanece esencialmente separada en fase de la primera fase cuando se pone en contacto), siendo dicha segunda fase líquida la fase de extracción, para la que el producto formado tiene una mayor afinidad. Este método es ventajoso porque permite la recuperación del producto *in situ*. Además, contribuye a prevenir o a al menos reducir los efectos tóxicos potenciales del valenceno (o un producto adicional) a las células, porque debido a la presencia de la segunda fase, la concentración de valenceno (o un producto adicional) en la fase de reacción puede mantenerse relativamente baja a lo largo del proceso. Finalmente, hay fuertes indicaciones de que la fase de extracción contribuye a extraer el valenceno (o producto adicional) de la fase de reacción.

En un método preferido de la invención la fase de extracción forma una capa sobre la fase de reacción o se mezcla con la fase de reacción para formar una dispersión de la fase de reacción en la fase de extracción o una dispersión de la fase de extracción en la fase de reacción. Por lo tanto, la fase de extracción no solamente extrae producto de la fase de reacción, sino que también ayuda a reducir o a evitar completamente pérdidas del producto formado del reactor a través del gas de escape, que puede suceder si se produce valenceno en la fase de reacción (acuosa) o si se excreta a la fase de reacción (acuosa). El valenceno es escasamente soluble en agua y por lo tanto se volatiliza fácilmente del agua. Se contempla que se evita al menos sustancialmente la volatilización del valenceno solvatado en la fase orgánica (como una capa o dispersión).

Los líquidos adecuados para uso como fase de extracción combinan una densidad menor que la fase de reacción con una buena biocompatibilidad (sin interferencia con la viabilidad de células vivas), volatilidad baja, e inmiscibilidad casi absoluta con la fase de reacción acuosa. Son ejemplos de líquidos adecuados para esta aplicación alcanos líquidos como decano, dodecano, isododecano, tetradecano y hexadecano o alcoholes alifáticos de cadena larga como alcohol oleílico y alcohol palmitoleílico, o ésteres de ácidos grasos de cadena larga como isopropil miristato y etil oleato (véase por ejemplo Asadollahi *et al.* (Biotechnol. Bioeng. (2008) 99: 666-677), Newman *et al.* (Biotechnol. Bioeng. (2006) 95: 684-691) y documento WO 2009/042070).

El valenceno producido de acuerdo con la invención puede usarse tal cual, por ejemplo para uso como un saporífero o una fragancia, o como un repelente de insectos, o puede usarse como un material de partida para otro compuesto, en particular otro saporífero o fragancia. En particular, el valenceno puede convertirse en nootkatona. La conversión de valenceno en nootkatona puede llevarse a cabo intracelularmente, o extracelularmente. Si esta preparación se

lleva a cabo dentro de una célula, la nootkatona se aísla habitualmente de la célula hospedadora después de su producción.

5 Se conoce en la técnica modos adecuados para convertir valenceno a nootkatona, por ejemplo como se describe en Antecedentes de la invención Fraatz *et al.* Appl.Microbiol.Biotechnol (2009) 83: 35-41, cuyos contenidos se incorporan por referencia, o las referencias citadas en la misma.

10 En general, los métodos adecuados para preparar nootkatona a partir de valenceno pueden dividirse en: i. métodos puramente químicos, ii. métodos biocatalíticos (por ejemplo los que usan lacasas en combinación con un mediador), iii. bioconversión (es decir métodos que aplican células vivas completas) y iv. fermentación completa. En los métodos i-iii se convierte valenceno introducido de forma externa, mientras que en el método iv el valenceno se produce *in situ*.

15 En una realización específica, la conversión comprende una hidroxilación regioespecífica de valenceno en la posición 2 a alfa y/o beta-nootkatol, seguido de oxidación del mismo formando nootkatona.

20 En una realización adicional, el valenceno se convierte en el hidroperóxido de valenceno, que a continuación se convierte en nootkatona. La Patente de Estados Unidos n.º 5.847.226 describe la conversión química de (+)-valenceno en nootkatona en una atmósfera que contiene oxígeno en presencia de un hidroperóxido de un ácido graso insaturado. Este hidroperóxido de ácido graso se genera *in situ* mediante, por ejemplo, autooxidación, fotooxidación u oxidación enzimática usando una lipoxigenasa, después de lo cual este hidroperóxido cataliza la autooxidación de valenceno.

25 (+)-Valenceno puede convertirse en alto rendimiento en nootkatona para diferentes especies del alga verde *Chlorella* o el hongo *Botryosphaeria* (Furusawa *et al.* Chem. Pharm. Bull. (2005) 53: 1513-1514, y el documento JP 2003-070492).

30 El documento EP-A 1 083 233 describe la preparación de nootkatona aplicando sistemas sin células (biocatalíticos) basados en la conversión catalizada por lacasa de valenceno en hidroperóxido de valenceno, que se degrada posteriormente para formar nootkatona. Opcionalmente, puede incluirse un mediador y/o un disolvente a una concentración que mantiene la actividad lacasa.

35 El documento 2006/079020 describe entre otras cosas una nueva enzima de citocromo P450 derivada de planta, la Premnaspirodieno oxigenasa (HPO) de *Hyoscyamus muticus* que cataliza la mono-hidroxilación de (+)-valenceno a principalmente beta-nootkatol. Solamente se observó formación de nootkatona a concentraciones muy altas de nootkatol (>30 µM) pero solamente a una velocidad de reacción muy baja (Takahashi *et al.* J.Biol.Chem. (2007) 282: 31744-31754). En el mismo artículo, Takahashi *et al.* informan de un mutante de HPO con una mejora de 5 veces de su eficacia catalítica para biosíntesis de nootkatol sin cambiar significativamente los perfiles de producto de reacción generales. Este nootkatol podría oxidarse adicionalmente a nootkatona mediante co-expresión de una enzima alcohol deshidrogenasa en la misma célula hospedadora.

45 Además de enzimas de citocromo P450 derivadas de planta, también se ha informado de que las citocromo 450 monooxigenasas bacterianas P450cam y P450BM-3 y mutantes de las mismas oxidan (+)-valenceno (Sowden *et al.* Org. Biomol. Chem. (2005) 3: 57-64). Mientras que P450cam de tipo silvestre no catalizó esta reacción de oxidación, los mutantes mostraron regioselectividad relativamente alta para la posición C2 deseada en (+)-valenceno, (+)-trans-nootkatol y (+)-nootkatona que constituyen >85 % de los productos formados. La actividad de estos mutantes fue más bien baja. Los mutantes P450BM-3, por otro lado, presentaron una mayor actividad pero fueron no selectivos debido a las múltiples orientaciones de unión de (+)-valenceno en el sitio activo. Recientemente, se han presentado mutantes de BM-3 mucho más selectivos, el mejor de los cuales tiene una regioselectividad C2 de 95 % (Seifert *et al.* ChemBioChem (2009) 10: 853-861).

50 Se contempla que uno o más genes que codifican una enzima o pluralidad de enzimas para catalizar la conversión de valenceno en nootkatona pueden incorporarse en una célula hospedadora de acuerdo con la invención. Dichas enzimas pueden seleccionarse por ejemplo de las enzimas de *Chlorella* o *Botryosphaeria*, o Premnaspirodieno oxidasa de *Hyoscyamus muticus*, o los mutantes P450cam o P450BM-3 a los que se ha hecho referencia anteriormente en el presente documento.

60 Como se ha indicado anteriormente, la invención se refiere a un anticuerpo que tiene afinidad de unión con una valenceno sintasa de acuerdo con la invención. El término "anticuerpo" incluye referencia a formas de unión a antígeno de anticuerpos (por ejemplo, Fab, F(ab) 2). El término "anticuerpo" se refiere frecuentemente a un polipéptido sustancialmente codificado por un gen de inmunoglobulina o genes de inmunoglobulina, o fragmentos de los mismos que se unen específicamente y reconocen un analito (antígeno). Sin embargo, aunque pueden definirse diversos fragmentos de anticuerpo con respecto a la digestión de un anticuerpo intacto, un experto apreciará que dichos fragmentos pueden sintetizarse de novo bien químicamente o bien utilizando metodología de ADN recombinante. Por lo tanto, el término anticuerpo, como se usa en el presente documento, también incluye

65

fragmentos de anticuerpo tales como Fv monocatenarios, anticuerpos quiméricos (es decir, que comprenden regiones constantes y variables de diferentes especies), anticuerpos humanizados (es decir, que comprenden una región determinante de complementariedad (CDR) de una fuente no humana) y anticuerpos heteroconjugados (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos).

5 Los anticuerpos o fragmentos de los mismos pueden producirse por cualquier método conocido en la técnica para la síntesis de anticuerpos, en particular, por síntesis química o preferentemente, por técnicas de expresión recombinantes.

10 Pueden producirse anticuerpos policlonales para valenceno sintasa por diversos procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede administrarse una valenceno sintasa heteróloga a diversos animales hospedadores incluyendo, pero sin limitación, conejos, ratones, ratas, etc. para inducir la producción de sueros que contienen anticuerpos policlonales específicos para valenceno sintasa. Pueden usarse diversos adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de la especie hospedadora, e incluyen pero sin limitación, Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianinas de lapa californiana, dinitrofenol y adyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (bacilo de Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*. Dichos adyuvantes también se conocen bien en la técnica.

20 Pueden prepararse anticuerpos monoclonales usando una amplia diversidad de técnicas conocidas en este campo incluyendo el uso de tecnologías de hibridoma, recombinantes y de presentación en fagos, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, pueden producirse anticuerpos monoclonales usando técnicas de hibridoma incluyendo las conocidas en la técnica y enseñadas, por ejemplo, en Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling, *et al.*, en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981). La expresión "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento no se limita a anticuerpos producidos mediante tecnología de hibridoma. La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que deriva de un único clon, incluyendo cualquier clon eucariota, procarriota o de fago, y no al método por el que se produce.

30 Son rutinarios y se conocen bien en la técnica métodos para producir y explorar con respecto a anticuerpos específicos usando tecnología de hibridoma. Brevemente, pueden inmunizarse ratones con valenceno sintasa y una vez que se detecta una respuesta inmunitaria, por ejemplo, se detectan anticuerpos específicos para la valenceno sintasa en el suero de ratón, el bazo de ratón se recoge y se aíslan esplenocitos. Los esplenocitos se fusionan después por técnicas bien conocidas con cualquier célula de mieloma adecuada, por ejemplo células de la línea celular SP20 disponible de ATCC. Se seleccionan y clonan hibridomas por dilución limitante. Los clones de hibridoma se ensayan después por métodos conocidos en la técnica para células que secretan anticuerpos capaces de unirse con un polipéptido de la invención. Puede generarse líquido ascético, que generalmente contiene altos niveles de anticuerpos, inmunizando ratones con clones de hibridoma positivos.

40 En ciertas realizaciones, un método para generar anticuerpos monoclonales que comprende cultivar una célula de hibridoma que secreta un anticuerpo de la invención en el que, preferentemente, el hibridoma se genera fusionando esplenocitos aislados de un ratón inmunizado con valenceno sintasa con células de mieloma y después explorando los hibridomas resultantes de la fusión para clones de hibridoma que secretan un anticuerpo capaz de unirse con valenceno sintasa. Un anticuerpo de acuerdo con la invención puede usarse por ejemplo en un método para aislar una valenceno sintasa producida de acuerdo con la invención, por ejemplo, usando el anticuerpo inmovilizado en un material de soporte cromatográfico.

50 Además, la presente divulgación se dirige a un método para preparar un terpenoide o un terpeno, comprendiendo el método convertir un sustrato de poliprenil difosfato en el terpenoide o terpeno en presencia de una enzima, comprendiendo la enzima un primer segmento que comprende un péptido marcador y un segundo segmento que comprende un polipéptido que tienen actividad enzimática para convertir un poliprenil difosfato en ese terpeno o terpenoide. Una enzima que comprende dicho primer y dicho segundo segmento puede denominarse en el presente documento "enzima marcada".

55 En particular, el terpeno que se prepara puede ser valenceno, en cuyo caso la enzima marcada tiene actividad valenceno sintasa, o amorfadieno, en cuyo caso la enzima marcada tiene actividad amorfadieno sintasa. Para preparación de valenceno en particular se puede usar un método, una secuencia de aminoácidos, una secuencia de ácido nucleico o una célula hospedadora como se describen en el presente documento.

60 Además, el terpeno o terpenoide puede entre otros seleccionarse del grupo de nootkatona y ácido artemisinico. El ácido artemisinico puede prepararse por oxigenación/oxidación de amorfadieno de una manera conocida en sí misma.

65 El péptido marcador se selecciona preferentemente del grupo de proteínas de utilización de nitrógeno (NusA), tioredoxinas (Trx), proteínas de unión a maltosa (MBP), un péptido que tiene la secuencia:

EEASVTSTEETLTPAQEAARTRAANKARKEAELAAATAEQ (el denominado marcador SET, SEQ ID NO: 34), y homólogos funcionales de la misma. Como se usa en el presente documento un homólogo funcional de un péptido marcador es un péptido marcador que tiene al menos aproximadamente el mismo efecto en la solubilidad de la enzima marcada, en comparación con la enzima no marcada. Típicamente el homólogo difiere en que uno o más aminoácidos se han insertado, sustituido, suprimido de o usado para extender el péptido del que es un homólogo. El homólogo puede en particular comprender una o más sustituciones de un aminoácido hidrófilo por otro aminoácido hidrófilo o de un aminoácido hidrófobo por otro. El homólogo puede en particular una identidad de secuencia de al menos 40 %, más en particular de al menos 50 %, preferentemente de al menos 55 %, más preferentemente de al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % o al menos 99 % con la secuencia de una NusA, Trx, MBP o SET.

SEQ ID NO: 25 y 24 muestran una valenceno sintasa provista de un marcador SET respectivamente, una secuencia de ácido nucleico que codifica dicha valenceno sintasa.

Es particularmente adecuada la proteína de unión a maltosa de *Escherichia coli*, o un homólogo funcional de la misma.

El uso de una enzima marcada de acuerdo con la invención es en particular ventajoso porque puede contribuir a una producción aumentada, especialmente producción celular aumentada de un terpenoide o un terpeno, tal como valenceno o amorfadieno.

Para solubilidad mejorada de la enzima marcada (en comparación con la enzima sin el marcador), el primer segmento de la enzima está preferentemente unido en su extremo C terminal con el extremo N terminal del segundo segmento. Como alternativa, el primer segmento de la enzima marcada está unido en su extremo N terminal con el extremo C terminal del segundo segmento.

Además, la presente divulgación se dirige a un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido, comprendiendo el polipéptido un primer segmento que comprende un péptido marcador, preferentemente un MPB, un NusA, un Trx, un marcador SET o un homólogo funcional de cualquiera de estos, y comprendiendo un segundo segmento una terpenoide sintasa o terpeno sintasa, preferentemente una valenceno sintasa o una amorfadieno sintasa. El segundo segmento puede comprender por ejemplo una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 27 o un homólogo funcional de cualquiera de estas secuencias con SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 27.

Además, la presente divulgación se dirige a una célula hospedadora que comprende dicho ácido nucleico que codifica dicha terpenoide sintasa marcada o terpeno sintasa marcada. Se muestran ácidos nucleicos específicos de acuerdo con la invención que codifican una enzima marcada en SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 28. La célula hospedadora puede comprender en particular un gen que comprende cualquiera de estas secuencias o un análogo funcional del mismo.

SEQ ID NO: 28 muestra una secuencia de nucleótidos que codifica una amorfadieno sintasa con un marcador MBP N terminal (MBP-AaaS).

Además, la presente divulgación se dirige a una enzima, que comprende un primer segmento que comprende un primer segmento que comprende un péptido marcador y un segundo segmento que comprende un polipéptido que tiene actividad enzimática para convertir un poliprenil disfosfato en un terpeno, en particular una valenceno sintasa o una amorfadieno sintasa, seleccionándose preferentemente el péptido marcador del grupo de MBP, NusA, Trx o SET. Se muestran enzimas específicas que comprenden una enzima marcada de acuerdo con la invención en SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 29 (MBP-AaaS).

La invención se ilustrará ahora por los siguientes ejemplos.

## Ejemplos

Parte general

Ensayo de actividad valenceno sintasa

Para verificar si un polipéptido tiene actividad valenceno sintasa puede usarse el siguiente ensayo.

En un tubo de vidrio, realizar una mezcla de 800  $\mu$ l de tampón MOPSO (MOPSO (ácido 3-[N-morfolino]-2-hidroxiopropano sulfónico) 15 mM pH = 7,0,  $MgCl_2$  1 mM, Tween 20 0,1 %, ácido ascórbico 1 mM, ditiotreitól 1 mM), 175  $\mu$ l de la solución de polipéptido purificada (que proporciona como norma general aproximadamente 100 ng del

polipéptido) y 5 µl de farnesil difosfato (FPP de Sigma 10 mM secado por evaporación y disuelto en carbamato de amonio 0,2 M y etanol 50 %). Cubrir cuidadosamente la mezcla con 500 µl de pentano, e incubar a 30 °C con agitación suave durante 2 horas. Posteriormente, recoger el pentano. Después, someter la fase acuosa restante a extracción con 1 ml de etilacetato. Combinar las fases de etilacetato y el pentano y centrifugar la combinación a 1.200 x g. Secar sobre una columna de sulfato sódico y analizar una muestra del producto secado por GC-MS. Convenientemente para el análisis de GC-MS, puede usarse un sistema Agilent Technologies, que comprende un sistema de GC de 7980 A, un detector de MSD inerte 597C (70 eV), un auto-muestreador 7683 e inyector y una columna Phenomenex Zebron ZB-5 ms de 30 mm de longitud x 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 µm de fase estacionaria, con una precolumna Guardian (5 m). En este sistema, inyectar 1 µl de la muestra, en las siguientes condiciones: orificio de inyección a 250 °C, inyección sin fraccionamiento, la columna ZB5 mantenida a 45 °C durante 2 minutos después de lo que se inicia un gradiente de 10 °C por minuto, hasta 300 °C. Se detectan picos de sesquiterpeno a 204 m/z. Los compuestos pueden identificarse por su índice de retención y por su espectro de masas en combinación con comparación del espectro de masas con bibliotecas (NIST o desarrolladas de forma interna). En este sistema, se detecta valenceno a (aproximadamente) 14,125 minutos. Si detecta valenceno, el polipéptido es una valenceno sintasa.

#### Bacterias y condiciones de cultivo

Se obtuvo cepa de *Rhodobacter sphaeroides* Rs265-9c de la cepa de *Rhodobacter sphaeroides* ATCC 35053 [obtenida de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC - Manassas, VA, Estados Unidos - www.atcc.org); número 35053; *Rhodobacter sphaeroides* (van Niel) Imhoff *et al.*, aislada de una charca de captación de aguas residuales en Indiana y depositada como *Rhodopseudomonas sphaeroides* van Niel] después de dos ciclos de mutagénesis y se usó como el hospedador básico para construcción de cepas recombinantes que tienen producción mejorada de valenceno. Todas las cepas de *R. sphaeroides* se cultivaron a 30 °C en medio RS102 a no ser que se indique de otro modo. La composición y preparación de medio RS102 se resume en la Tabla 1.

Se cultivaron cepas de *E. coli* a 37 °C en medio LB (Becton Dickinson, Sparks, MD, Estados Unidos). Para mantenimiento de plásmidos en cepas de *E. coli* y *R. sphaeroides* recombinantes, se añadieron ampicilina (100 mg/l), cloranfenicol (30 mg/l) y/o kanamicina (25-50 mg/l, dependiendo del plásmido) al medio de cultivo. Los cultivos líquidos se dejaron crecer rutinariamente de forma aeróbica en un agitador rotatorio a 220 rpm (véase posteriormente). Cuando se requirió medio sólido, se añadió agar (concentración final de 1,5 %).

Tabla 1. Composición y preparación de medio RS102

Componente	Cantidad por litro de agua destilada
1. Extracto de levadura	20 g
2. NaCl	0,5 g
3. MgSO <sub>4</sub> – 7H <sub>2</sub> O	0,5 g
4. D-glucosa monohidrato	33 g
5. Solución de microelementos	2 ml
6. Solución de café	2 ml
Los componentes 1-4 se mezclan entre sí, el volumen final se ajusta a 1 litro. El pH se ajusta a 7,4 con NaOH 0,5 M. El medio básico resultante se esteriliza después por filtración a través de una membrana de 0,22 micrómetros; se añaden 2 ml de cada uno de solución de microelementos estéril y solución de CaFe estéril (véase posteriormente) para proporcionar el medio final RS102. Para medio sólido, se mezclan entre sí en primer lugar 1 litro de medio básico mencionado anteriormente más 15 g de agar y se esteriliza por autoclave. Después el medio se enfría a aproximadamente 60 °C, las soluciones estériles de microelementos y CaFe (2 ml de cada una) se añaden y el medio fundido se distribuye en placas de Petri estériles.	
Solución de microelementos	
Componente	Cantidad por litro de agua destilada
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Fe(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	80 g
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	6 g
MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	2 g
NiSO <sub>4</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0,2 g
Vitamina C	2 g
- Esterilizar por filtración a través de una membrana de 0,22 micrómetros, almacenar a 4 °C.	
Solución de CaFe	
Componente	Cantidad por litro de agua destilada
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	75 g
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	5 g
HCl (37 %)	3,75 ml
- Esterilizar por filtración a través de una membrana de 0,22 micrómetros, almacenar a 4 °C.	

Ejemplo 1: Construcción de vectores de expresión de *E. coli*

Se obtuvo *Chamaecyparis nootkatensis pendula* de "Plantentuin Esveld" en Boskoop (NL). Se extrajo ARN de tejido leñoso de las ramas. Se calentaron 15 ml de tampón de extracción (bromuro de hexadeciltrimetilamonio 2 %, polivinilpirrolidona K 30 2 %, Tris-HCl 100 mM (pH 8,0), EDTA 25 mM, NaCl 2,0 M, espermidina 0,5 g/l y  $\beta$ -mercaptoetanol 2 % (añadido justo antes de uso)) a 65 °C en un baño de agua, después de lo cual se añadieron 2 g de tejido molido y se mezcló completamente invirtiendo el tubo. La mezcla se extrajo dos veces con un volumen igual de cloroformo; alcohol isoamílico (24:1). Se añadió 1/4 de LiCl 10 M a la capa superior acuosa y se mezcló. El ARN se precipitó durante una noche a 4 °C y se recogió por centrifugación a 10.000 x g durante 20 min. El sedimento se disolvió en 500  $\mu$ l de SSTE (NaCl 1,0 M, SDS 0,5 %, Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM (pH 8,0)), y se extrajo una vez con un volumen igual de cloroformo: alcohol isoamílico. Se añadieron dos volúmenes de etanol a la capa superior acuosa, se incubaron durante al menos 2 horas a -20 °C, se centrifugaron a 13.000 x g, después de lo cual se retiró el sobrenadante. El sedimento se secó al aire, y se resuspendió en agua. Este procedimiento dio como resultado el aislamiento de aprox. 60  $\mu$ g de ARN total por 2 g de tejido molido.

Partiendo de 133  $\mu$ g de ARN total de madera de *Chamaecyparis nootkatensis*, se aislaron 2,7  $\mu$ g de ARN de PolyA+ usando el Kit de Purificación de ARNm (GE Healthcare Life Sciences, Diegem, Bélgica) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este ARN de polyA+ se usó para generar ADNc 3'RACE, usando el Kit de Amplificación de ADNc SMART RACE (Clontech, Mountain View, CA, Estados Unidos), de acuerdo con las descripciones del Kit.

La fase abierta de lectura de longitud completa que codifica la valenceno sintasa de *Chamaecyparis nootkatensis* de acuerdo con la invención (en lo sucesivo en el presente documento también denominada "valC") se amplificó después a partir de la biblioteca de ADNc de *C. nootkatensis* usando "polimerasa de corrección" Phusion (Finnzymes, Espoo, Finlandia) y los siguientes cebadores:

5'-atataggatccGGCTGAAATGTTTAATGGAAATCCAGC-3' [SEQ ID NO: 5] (sitio de reconocimiento de *Bam*HI subrayado),

y

5'-atatactcagCTCTGGATCTATGGAATGATTGGTTCCAC-3' [SEQ ID NO: 6]

(sitio de restricción de *Pst*I subrayado).

El fragmento amplificado y vector pACYCDuet-1 (Novagen, Merck4Biosciences, Nottingham, Reino Unido) se digirieron con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Pst*I, seguido de purificación de los fragmentos de ADN requeridos, su ligamiento posterior y finalmente transformación en *E. coli* XL1-Blue (Stratagene, La Jolla, CA, Estados Unidos) usando procedimientos convencionales. Se seleccionaron bacterias recombinantes en placas de LB que contenía cloranfenicol 30  $\mu$ g/ml. Después de cultivo durante una noche de colonias recombinantes en cultivo líquido (3 ml de caldo de cultivo LB con cloranfenicol 30  $\mu$ g/ml, 250 rpm, 37 °C), se aisló ADN plasmídico usando el Kit de Miniprep de centrifugación Qiaprep (Qiagen, Hilden, Alemania). Se ensayó un material plasmídico aislado por análisis de restricción usando las enzimas *Bam*HI y *Pst*I. Finalmente, se comprobó el inserto de un vector correcto, que se denominó pAC-65-3, por secuenciación de DETT con cebadores de vector. Esta estrategia de clonación condujo a la expresión de ValC con un marcador His<sub>6</sub> N terminal.

Para expresión de la valenceno sintasa de *Citrus x paradisi* (ValF, número de referencia CAG29905), se preparó la fase abierta de lectura de longitud completa por síntesis de ADN adaptada por una tercera compañía. Para mejorar su expresión heteróloga en *Rhodobacter sphaeroides*, esta secuencia génica sintética se optimizó con respecto a uso codónico (SEQ ID NO: 7). Además, el gen sintético comprendía un sitio de restricción *Nde*I en su extremo 5', que también proporcionó el codón de inicio ATG, y un sitio de restricción de *Bam*HI en su extremo 3' cadena abajo de un codón de terminación. Después de digestión de este gen sintético y vector pET-16b (Novagen) con enzimas de restricción *Nde*I y *Bam*HI, los fragmentos correctos de purificaron y se ligaron, seguido de transformación de *E. coli* TOP 10 (Invitrogen, Breda, Países Bajos) usando protocolos convencionales. Se seleccionaron bacterias recombinantes en placas LB que contenían ampicilina 100  $\mu$ g/ml. Después de cultivo durante una noche de colonias recombinantes en 5 ml de caldo de cultivo LB con ampicilina 100  $\mu$ g/ml, 250 rpm, 37 °C, se aisló ADN plasmídico usando el kit de Miniprep de Centrifugación Qiaprep (Qiagen). Finalmente, se seleccionó un plásmido recombinante correcto ensayando con respecto a la presencia del fragmento de inserto deseado por análisis de restricción usando las enzimas *Nde*I y *Bam*HI. Este plásmido se denominó pET-16b-ValF.

Debido a esta estrategia de clonación, también la enzima ValF expresada contiene un marcador His<sub>6</sub> N terminal.

Ejemplo 2: Comparación *in vitro* de valenceno sintasa de *C. nootkatensis* (invención) y valenceno sintasa de cítrico (referencia)

El plásmido de control pACYCDuet-1, la construcción pAC-65-3 (que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una valenceno sintasa de acuerdo con la invención) y la construcción pET-16b-ValF se transformaron en *E. coli* BL21 AI (Invitrogen). Para expresión, se preparó 1 ml de cultivo de una noche de las cepas de *E. coli*

recombinantes (medio LB con antibiótico apropiado; 30 µg de cloranfenicol/ml en el caso de pAC-65-3 y pACYCDuet-1; 100 µg de ampicilina/ml en el caso de pET-16b-ValF). Se transfirieron 500 µl de ese cultivo a 50 ml de medio LB con el antibiótico apropiado en un matraz de Erlenmeyer de 250 ml, y se incubó a 37 °C, 250 rpm hasta que la densidad óptica a 600 nm (DO600 o A600) fue de 0,4 a 0,6. Posteriormente, se añadió arabinosa 0,02 % y los cultivos se incubaron durante una noche a 18 °C y 250 rpm. Al día siguiente, las células se recogieron por centrifugación (10 min a 8.000 x g), se retiró el medio, y las células se resuspendieron en 1 ml de tampón de resuspensión (Tris-HCl 50 mM pH = 8,0, NaCl 300 mM, 2-mercaptoetanol 1,4 mM; 4 °C). Las células se rompieron por sonicarón (en hielo, 5 minutos 10 segundos con descanso de 10 segundos, MSE Soniprep 150, amplitud de 14 µm). Las partículas insolubles se retiraron posteriormente por centrifugación (10 min a 13.000 x g, 4 °C) produciendo el extracto sin células.

La proteína soluble se purificó adicionalmente por IMAC (cromatografía de afinidad metálica inmovilizada) en columnas de centrifugación Ni-NTA (Qiagen). El extracto sin células (600 µl) se cargó en estas columnas, que se habían pre-aclarado con tampón de Resuspensión, y las columnas se centrifugaron a 700 x g durante 2 min, después de lo cual se descartó el flujo continuo. Posteriormente las columnas se lavaron dos veces con 600 µl de tampón de Resuspensión (flujo continuo descargado) seguido de transferencia de las columnas a un tubo nuevo. Se cargaron 100 µl de tampón de Elución de Imidazol (tampón de resuspensión con imidazol 175 mM) en la columna, se dejaron durante 2 minutos y se recogieron por centrifugación. Este procedimiento de elución se repitió una vez. Para cada construcción, se transfirieron en total 200 µl de eluato a una Mini Unidad de Diálisis Slide-A-Lyzer (10.000 de PCPM; Pierce, Rockford, IL, Estados Unidos) y se dializó durante 3 horas a 1 l de tampón de almacenamiento (Tris-HCl 50 mM, pH = 7,5, glicerol 12,5 %, 2-mercaptoetanol 1,4 mM) a 4 °C. Después de la diálisis, las preparaciones enzimáticas purificadas se usaron inmediatamente en ensayos enzimáticos, que esencialmente se ejecutaron como el ensayo de actividad valenceno sintasa descrito anteriormente. En este caso, sin embargo, todos los picos en los cromatogramas se detectaron aplicando el modo de recuento de iones total. Los compuestos se identificaron por su índice de retención y por su espectro de masas en combinación con la comparación del espectro de masas con bibliotecas (NIST e internas). Para cuantificar los compuestos producidos, el área de superficie pico para cada pico relevante se midió a partir de los cromatogramas de recuentos iónicos totales.

Los resultados de estos ensayos *in vitro* se proporcionan en la Tabla 2.

Tabla 2. Compuestos terpenoides detectados en los ensayos enzimáticos *in vitro* con valenceno sintasa purificada de células *E. coli* BL21 AI que contienen pAC-65-3 (que expresan por lo tanto ValC), pET-16b-ValF (que expresan por lo tanto ValF) o pACYCDuet-1 (blanco negativo).

	Rf (min)	Área de pAC-65-3 (invención)	Área de pET-16b-ValF (referencia)	Área de pACYCDuet-1 (blanco)
β-elemento / germacreno A sesquiterpeno I (chamigreno)	12,75	495079 (22 %)	509223 (42 %)	nd
valenceno	14,028	168400 (8 %)	118789 (10 %)	nd
sesquiterpeno III (selineno)	14,126	2228164 (100 %)	1207259 (100 %)	nd
sesquiterpeno IV (panasinseno)	14,103	164722 (7 %)	nd	nd
alcohol de sesquiterpeno I (germacreno-D-ol)	14,479	69696 (3 %)	115944 (10 %)	nd
alcohol de sesquiterpeno II (eudesmadienol)	15,155	203027 (9 %)	nd	nd
farnesol	16,225	63561 (3 %)	275093 (23 %)	nd
	16,79	530588 (24 %)	809363 (67 %)	798326

Rf: tiempo de retención; área: área de superficie pico en cromatograma de GC-MS; el porcentaje indica el porcentaje del área en relación con el área del valenceno; nd: no detectado. Los nombres de los compuestos entre paréntesis indican identificación provisional.

El área de valenceno de la preparación que expresa ValC corresponde a 2,7 µg/ml (como se calcula por comparación con un patrón de valenceno), mientras que el área de valenceno para la preparación de ValF corresponde a 1,5 µg/ml. Por lo tanto, la preparación de acuerdo con la invención produjo 1,8 veces más valenceno que la preparación de ValF. Para verificar si esto se debía a las cantidades de valenceno sintasa en ambas preparaciones o a una diferencia en la actividad específica de ambas valenceno sintasas, se comparó el contenido de proteína total de ambas preparaciones enzimáticas basándose en la absorción a 280 nm (A280) en una dilución décupla en tampón de resuspensión. Para la preparación que comprende el ValC, A280 fue de 0,12; en el caso de ValF, A280 fue de 0,14; y en el caso del blanco, A280 fue de 0,18. Las proteínas purificadas también se analizaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida 12,5 % con SDS, junto con un marcador proteico (Fermentas, escalera de proteína preteñida PAGE Ruler). Después de tinción con Azul Brillante de Coomassie, en cada carril se pudieron observar varias bandas proteicas. Se observaron bandas de diversa movilidad en la muestra en blanco así como en las otras dos muestras. Entre 55 kilodalton y 72 kilodalton, se observaron bandas que eran específicas para ValC y ValF (no presentes en la muestra en blanco). Estas bandas probablemente reflejan las sesquiterpenos sintasas

producidas. En la muestra de ValC, la banda específica contenía aproximadamente el 5 % de la proteína total, mientras que en la muestra de ValF, la banda específica contenía aproximadamente 20 % de la proteína total, como se estima por inspección visual. Esto indicó que la concentración de sesquiterpeno sintasa en la preparación de ValF era considerablemente mayor, posiblemente más de dos veces mayor, que en la preparación de ValC. A pesar de la menor cantidad de enzima, la preparación que comprendía ValC produjo considerablemente más valenceno (véase anteriormente). Por lo tanto, este ejemplo muestra que una valenceno sintasa de acuerdo con la invención tiene una actividad enzimática específica considerablemente mayor con respecto a síntesis de valenceno que una valenceno sintasa conocida de cítrico.

Además de valenceno también se formaron otros sesquiterpenos por las dos valenceno sintasas. La cantidad relativa (en comparación con el área de valenceno) de germacreno-A (observado como beta-elemento debido a reordenación térmica en el orificio de inyección de GC-MS), el producto secundario principal formado por ambas sintasas, parecía ser de 22 % con la preparación que expresaba ValC mientras que era del 42 % con la preparación que contenía ValF. Además la cantidad relativa total de los alcoholes de sesquiterpeno I y II con la preparación que expresaba ValC es aproximadamente dos veces menor que con la preparación que expresaba ValF que era de 12 % y 23 %, respectivamente. Debido a que la cantidad relativa total de los otros tres sesquiterpenos formados (I, III y IV) son similares con ambas terpeno sintasas (ValC: 18 %, ValF: 20 %), este ejemplo también muestra que un valenceno de acuerdo con la invención es significativamente más específico con respecto a la formación de valenceno en comparación con otros terpenoides.

Ejemplo 3: Construcción de cepas de *R. sphaeroides* que producen valenceno o amorfadieno

Clonación de valenceno sintasa de *Citrus x paradisi* y fusiones N terminales correspondientes

Construcción de plásmidos pBBR-K-PcrtE-valF-op, pBBR-K-PcrtE-valFpoR, pBBR-K-PcrtE-mbp-valFpoR, pBBR-K-PcrtE-nusA-valFpoR, pBBR-K-PcrtE-set-valFpoR y pBBR-K-PcrtE-trx-valFpoR

Los siguientes fragmentos de nucleótidos se prepararon por síntesis adaptada por DNA 2.0 Inc. (Menlo Park, CA, Estados Unidos: *valF* (SEQ ID NO: 7) que codifica valenceno sintasa ValF de *Citrus x paradisi* (número de referencia: CAG29905), *ValFpoR* (SEQ ID NO: 8) que codifica valenceno sintasa ValF de *Citrus x paradisi* con una extensión C terminal de dos aminoácidos (denominada ValFpoR) (SEQ ID NO: 9), *mbp-valFpoR* (SEQ ID NO: 10) que codifica una fusión de proteína de unión a maltosa (MBP) de *Escherichia coli* en su extremo C terminal con el extremo N terminal de valenceno sintasa ValFpoR (SEQ ID NO: 11), *nusA-ValFpoR* (SEQ ID NO: 12) que codifica una fusión de proteína de utilización de nitrógeno (NusA) de *Escherichia coli* en su extremo C terminal con el extremo N terminal de valenceno sintasa ValFpoR (SEQ ID NO: 13), *set-valFpoR* (SEQ ID NO: 24) que codifica una fusión de marcador potenciador de la solubilidad (SET) en su extremo C terminal con el extremo N terminal de valenceno sintasa ValFpoR (SEQ ID NO: 25), y *trx-valFpoR* (SEQ ID NO: 14) que codifica una fusión de tioredoxina (Trx) de *Escherichia coli* en su extremo C terminal con el extremo N terminal de valenceno sintasa ValFpoR (SEQ ID NO: 15). Todas las secuencias génicas sintéticas se optimizaron con respecto a uso codónico para expresión de proteínas heterólogas mejorada en *Rhodobacter sphaeroides*, y comprendían un sitio de restricción *NdeI* en su extremo 5', que también proporcionó el codón de partida ATG, y un sitio de restricción *BamHI* en su extremo 3' cadena abajo de codones de terminación. Además se introdujo un sitio de restricción *Asel*, que proporciona extremos cohesivos compatibles con *NdeI* tras digestión, en la región de enlace entre el extremo 3' de los genes que codifican las proteínas de fusión MBP, NusA, SET y Trx, y el extremo 5' del gen que codifica ValFpoR. Se digirieron nucleótidos sintéticos *valF*, *ValFpoR*, *mbpvalFpoR*, *nusA-valFpoR*, *set-valFpoR*, y *trx-valFpoR* con *NdeI* y *BamHI* y los fragmentos de ADN resultantes se ligaron con vector plasmídico digerido con *NdeI* / *BamHI* pBBR-K-PcrtE, produciendo los plásmidos pBBR-K-PcrtE-valFop, pBBR-K-PcrtE-valFpoR, pBBR-K-PcrtE-mbp-valFpoR, pBBR-K-PcrtE-nusA-valFpoR, pBBR-K-PcrtE-set-valFpoR, y pBBR-K-PcrtE-trx-ValFpoR. En todos estos plásmidos el gen de resistencia a kanamicina y el gen que codifica valenceno sintasa se transcriben en direcciones opuestas. La construcción de vector plasmídico pBBR-K-PcrtE se describe en detalle en el Ejemplo 6 (página 91, líneas 12-27) del documento WO 02/099095.

Construcción of plásmidos pBBR-K-PcrtE-valF, pBBR-K-PcrtE-valFpoR-rev, pBBR-K-PcrtE-mbp-valFpoR-rev, pBBR-K-PcrtE-nusA-valFpoR-rev, pBBR-K-PcrtE-set-valFpoR-rev, y pBBR-K-PcrtE-trx-valFpoR-rev

Se escindieron insertos génicos que portaban los genes de valenceno sintasa fusionados de forma traduccional o nativos de plásmidos parentales pBBR-K-PcrtE-valF-op, pBBR-K-PcrtE-valFpoR, pBBR-K-PcrtE-mbp-valFpoR, pBBR-K-PcrtE-nusA-ValFpoR, pBBR-K-PcrtE-set-valFpoR y pBBR-K-PcrtE-trx-valFpoR como fragmentos de extremos romos por *MlyI* / *PshAI* con longitudes respectivas de 2,4 kilobases, 2,4 kilobases, 3,5 kilobases, 3,9 kilobases, 2,5 kilobases y 2,7 kilobases. El vector plasmídico pBBR-K-PcrtE se digirió con *EcoRI* y *BamHI*, los salientes 5' resultantes se hicieron romos usando ADN polimerasa I, fragmento grande (Klenow), el fragmento de ADN de 4,2 kilobases mayor se purificó en gel y se ligó con cada uno de los fragmentos de nucleótidos anteriores que codifican *PcrtE-valF*, *PcrtE-valFpoR*, *PcrtE-mbp-valFpoR*, *PcrtE-nusA-valFpoR*, *PcrtE-set-valFpoR* y *PcrtE-trx-valFpoR*. La orientación del inserto se comprobó y los plásmidos que portaban el gen codificante de valenceno sintasa en la misma orientación que el gen de resistencia a kanamicina se designaron pBBR-K-P crtEvalF, pBBR-K-



*PcrtE-valFpoR-rev*, *pBBR-K-PcrtE-mbp-valFpoR-rev*, *pBBR-K-PcrtE-nusA-valFpoR-rev*, *pBBR-K-PcrtEset-valFpoR-rev*, y *pBBR-K-PcrtE-trx-valFpoR-rev*.

Construcción del plásmido *pBBR-K-PcrtE-mbp-valF-op*

5 El plásmido *pBBR-K-PcrtE-valF* se digirió con *NdeI* y *BamHI* y el fragmento de ADN de 1,7 kilobases menor que codificaba *ValF* se ligó con el mayor de los dos fragmentos generados tras digestión con *Asel* / *BamHI* de vector plasmídico *pBBR-K-PcrtE-mbp-valFpoR*, dando como resultado *pBBR-K-PcrtE-mbp-valFop*, el que la valenceno sintasa de *Citrus ValF* se expresa como una fusión traduccional con el extremo C terminal de proteína de unión a maltosa (MBP) de *Escherichia coli*. En este plásmido de nueva construcción, el gen de resistencia a kanamicina y el gen codificante de valenceno sintasa se transcriben en la orientación opuesta.

Construcción de plásmido *pBBR-K-PcrtE-mbp-valF*

15 El plásmido *pBBR-K-PcrtE-valF* se digirió con *NdeI* y *BamHI* y el fragmento de ADN de 1,7 kilobases menor que codificaba *ValF* se ligó con el mayor de los dos fragmentos generados tras digestión con *Asel* / *BamHI* del vector plasmídico *pBBR-K-PcrtE-mbp-valFpoR-rev*, dando como resultado el plásmido *pBBR-K-PcrtE-mbp-valF* que contenía el gen *mbp-valF* (SEQ ID NO: 16) que codificaba la valenceno sintasa de *Citrus ValF* fusionada traduccionalmente con el extremo C terminal de la proteína de unión a maltosa (MBP) de *Escherichia coli* (SEQ ID NO: 17). En este plásmido de nueva construcción, el gen de resistencia a kanamicina y el gen codificante de valenceno sintasa se transcriben en la misma orientación.

Clonación de operón de mevalonato (*mev*) de *Paracoccus zeaxanthinifaciens*

25 Construcción de plásmidos *pBBR-K-mev-op-4-89-PcrtE-valF-op*, *pBBR-K-mev-op-4-89-PcrtE-valFpoR*, *pBBR-K-mev-op-4-89-PcrtE-mbp-valF-op*, *pBBR-K-mev-op-4-89-PcrtE-mbp-valFpoR*, *pBBR-K-mev-op-4-89-PcrtE-nusA-valFpoR*, *pBBR-K-mev-op-4-89-PcrtE-set-valFpoR* y *pBBR-K-mev-op-4-89-PcrtE-trx-valFpoR*

30 El plásmido *pBBR-K-mev-op-4-89-PcrtE-ddsA<sub>wt</sub>* se usó como la fuente del operón de mevalonato mutado de *Paracoccus zeaxanthinifaciens*. La construcción del plásmido *pBBR-K-mev-op-4-89-PcrtE-ddsA<sub>wt</sub>* se describe en detalle en el Ejemplo 3 (página 15, líneas 4-31) del documento WO 06/018211.

35 El inserto de operón *mev* se escindió del plásmido parental *pBBR-K-mev-op-4-89-PcrtE-ddsA<sub>wt</sub>* como un fragmento *RsrII* / *XbaI*, el saliente 5' generado por *XbaI* se hizo romo usando un fragmento grande de ADN polimerasa I (Klenow) antes del tratamiento con *RsrII*. El fragmento de nucleótidos de 7,0 kilobases resultante se ligó con los vectores plasmídicos digeridos con *RsrII* / *MlyI* *pBBR-K-PcrtE-valF-op*, *pBBR-K-PcrtE-valFpoR*, *pBBR-K-PcrtE-mbp-valF-op*, *pBBR-K-PcrtE-mbp-valFpoR*, *pBBR-K-PcrtE-nusA-valFpoR*, *pBBR-K-PcrtE-set-valFpoR* y *pBBR-K-PcrtE-trx-valFpoR*, produciendo los plásmidos *pBBR-K-mev-op-4-89-PcrtE-valF-op*, *pBBR-K-mev-op-4-89-PcrtE-valFpoR*, *pBBR-K-mev-op-4-89-PcrtE-mbp-valF-op*, *pBBR-K-mev-op-4-89-PcrtE-mbp-valFpoR*, *pBBR-K-mev-op-4-89-PcrtE-nusA-valFpoR*, *pBBR-K-mev-op-4-89-PcrtE-set-valFpoR* y *pBBR-K-mev-op-4-89-PcrtE-trx-valFpoR*, respectivamente. En esos plásmidos de nueva construcción, el inserto de operón *mev* y el gen codificante de valenceno sintasa se transcriben en orientaciones opuestas.

45 Construcción de plásmidos *pBBR-K-mev-op-4-89-PcrtE-valF*, *pBBR-K-mev-op-4-89-PcrtE-valFpoR-rev*, *pBBR-K-mev-op-4-89-PcrtE-mbp-valF*, *pBBR-K-mev-op-4-89-PcrtE-mbp-valFpoR-rev*, *pBBR-K-mev-op-4-89-PcrtE-nusA-valFpoR-rev*, *pBBR-K-mev-op-4-89-PcrtE-set-valFpoR-rev* y *pBBR-K-mev-op-4-89-PcrtE-trx-valFpoR-rev*

50 El inserto de operón *mev* se escindió del plásmido parental *pBBR-K-mev-op-4-89-PcrtE-ddsA<sub>wt</sub>* como un fragmento *RsrII* / *BlnI*, y el fragmento de nucleótidos de 7,3 kilobases resultante se ligó con los vectores plasmídicos digeridos con *RsrII* / *BlnI* *pBBR-K-PcrtE-valF*, *pBBR-K-PcrtE-valFpoR-rev*, *pBBR-K-PcrtE-mbp-valF*, *pBBR-K-PcrtE-mbp-valFpoR-rev*, *pBBR-K-PcrtE-nusA-valFpoR-rev*, *pBBR-K-PcrtE-set-valFpoR-rev*, y *pBBR-K-PcrtE-trx-valFpoR-rev*, produciendo los plásmidos *pBBR-K-mev-op-4-89-PcrtE-valF*, *pBBR-K-mev-op-4-89-PcrtE-valFpoR-rev*, *pBBR-K-mev-op-4-89-PcrtE-mbp-valF*, *pBBR-K-mev-op-4-89-PcrtE-mbp-valFpoR-rev*, *pBBR-K-mev-op-4-89-PcrtE-nusA-valFpoR-rev*, *pBBR-K-mev-op-4-89-PcrtEset-valFpoR-rev*, y *pBBR-K-mev-op-4-89-PcrtE-trx-valFpoR-rev*, respectivamente.

55 En esos plásmidos de nueva construcción, el agente de resistencia a kanamicina, el inserto de operón *mev* y el gen codificante de valenceno sintasa se transcriben en la misma orientación.

Clonación de valenceno sintasa de *Chamaecyparis nootkatensis* y fusiones N terminales correspondientes

60 Construcción de plásmidos *pBBR-K-PcrtE-valC-opt*, *pBBR-K-PcrtE-valC-opt-short*, *pBBR-K-PcrtE-mbp-valC-opt* y *pBBR-K-PcrtE-mbp-valC-opt-short*

65 Se prepararon dos fragmentos de ácido nucleico que codifican la valenceno sintasa de *Chamaecyparis nootkatensis* (*ValC*) por síntesis adaptada por DNA 2.0 Inc. Ambas secuencias génicas sintéticas se optimizaron con respecto a uso codónico para expresión de proteína heteróloga mejorada en *Rhodobacter sphaeroides*, y comprendían un sitio

de restricción *NdeI* en su extremo 5', que también proporcionó el codón de inicio ATG, y un sitio de restricción *BamHI* en su extremo 5' cadena abajo de codones de terminación. El primer fragmento de ácido nucleico contenía una ORF correspondiente al gen *valC* de longitud completa (*valC-opt*) (SEQ ID NO: 18) que codificaba la versión de longitud completa de valenceno sintasa ValC de *C. nootkatensis* (SEQ ID NO: 4). El segundo fragmento de ácido nucleico contenía una ORF correspondiente a una versión truncada del gen *valC* (*valC-opt-short*) (SEQ ID NO: 19) que codificaba una variante más corta de la valenceno sintasa de *C. nootkatensis* que carecía de 16 aminoácidos de su extremo N terminal, ValC-short (SEQ ID NO: 2).

Los fragmentos de ácido nucleico sintéticos que contienen *valC-opt* y *valC-opt-short* se digirieron con *NdeI* y *BamHI*. Los fragmentos de ADN resultantes se ligaron con el mayor de los dos fragmentos generados tras digestión con *NdeI* / *BamHI* del vector plasmídico BBR-K-*PcrtE-valFpoR-rev*, dando como resultado pBBR-K-*PcrtE-valC-opt* y pBBR-K-*PcrtE-valCopt-short*, respectivamente. En estos dos plásmidos de nueva construcción, el gen de resistencia a kanamicina y el gen codificante de valenceno sintasa se transcriben en la misma orientación.

Los fragmentos de ácido nucleico sintético que contienen *valC-opt* y *valC-opt-short* se dirigieron de nuevo con *NdeI* y *BamHI*. Posteriormente, los fragmentos de ADN resultantes se ligaron con el mayor de los dos fragmentos generados tras digestión con *Asel* / *BamHI* del vector plasmídico pBBR-K-*PcrtE-mbp-valFpoR-rev*, dando como resultado pBBR-K-*PcrtE-mbp-valC-opt* que contiene el gen *mbp-valC-opt* (SEQ ID NO: 20) y pBBR-K-*PcrtE-mbp-valC-opt-short* que contiene el gen *mbp-valCopt-short* (SEQ ID NO: 22), respectivamente. En el plásmido pBBR-K-*PcrtE-mbp-valC-opt* la versión de longitud completa de ValC se expresa como fusión de la traducción en el extremo C terminal de la proteína de unión a maltosa (MBP) de *Escherichia coli* (SEQ ID NO: 21), mientras que en el plásmido pBBR-K-*PcrtE-mbp-valC-opt-short* la versión truncada de ValC se expresa como fusión de la traducción en el extremo C terminal de la proteína de unión a maltosa (MBP) de *Escherichia coli* (SEQ ID NO: 23). En estos dos plásmidos de nueva construcción, el gen de resistencia a kanamicina y el gen codificante de valenceno sintasa se transcriben en la misma orientación.

Clonación de operón de mevalonato (*mev*) de *Paracoccus zeaxanthinifaciens* en plásmidos que codifican valenceno sintasa de *Chamaecypris nothatisensis*

Construcción de plásmidos pBBR-K-*mev-op-4-89-PcrtE-mbp-valC-opt* y pBBR-K-*mev-op-4-89-PcrtE-mbp-valC-opt-short*

El inserto de operón *mev* se escindió del plásmido parental pBBR-K-*mev-op-4-89-PcrtE-ddsA<sub>wt</sub>* como un fragmento de *RsrII* / *BlnI*, y el fragmento de nucleótidos de 7,3 kilobases resultante se ligó con los vectores plasmídicos digeridos con *RsrII* / *BlnI* pBBR-K-*PcrtE-mbp-valC-opt* y pBBR-K-*PcrtE-mbp-valC-opt-short*, dando como resultado los plásmidos pBBR-K-*mev-op-4-89-PcrtE-mbp-valC-opt* y pBBR-K-*mev-op-4-89-PcrtE-mbp-valC-opt-short*, respectivamente. En estos plásmidos de nueva construcción, el gen de resistencia a kanamicina, el inserto de operón *mev* y el gen codificante de valenceno sintasa se transcriben en la misma orientación.

Clonación de amorfadieno sintasa de *Artemisia annua* y fusión N terminal correspondiente

#### Construcción de plásmidos pBBR-K-*PcrtE-aaas* y pBBR-K-*PcrtE-mbp-aaas*

Se preparó un fragmento de ácido nucleico sintético que portaba un gen (*aaas*) (SEQ ID NO: 26) que codificaba la amorfadieno sintasa Aaas de *Artemisia annua* (SEQ ID NO: 27) por síntesis adaptada por DNA 2.0 Inc. La secuencia génica sintética se optimizó con respecto a uso codónico para expresión de proteína heteróloga mejorada en *Rhodobacter sphaeroides* y comprendía un sitio de restricción *NdeI* en su extremo 5', que también proporcionaba el codón de inicio ATG, y un sitio de restricción *BamHI* en su extremo 3' cadena abajo de codones de terminación.

El fragmento de ácido nucleico sintético que contenía *aaas* se digirió con *NdeI* y *BamHI*. El fragmento de ADN resultante se ligó con el mayor de los dos fragmentos generado tras digestión con *NdeI* / *BamHI* del vector plasmídico pBBR-K-*PcrtE-valFpoR-rev*, dando como resultado pBBR-K-*PcrtE-aaas*. En este plásmido de nueva construcción, el gen de resistencia a kanamicina y el gen codificante de amorfadieno sintasa se transcriben en la misma orientación.

El fragmento de ácido nucleico sintético que contenía *aaas* se digirió de nuevo con *NdeI* y *BamHI*. Posteriormente, el fragmento de ADN resultante se ligó con el mayor de los dos fragmentos generados tras digestión con *Asel* / *BamHI* del vector plasmídico pBBR-K-*PcrtE-mbp-valFpoR-rev*, dando como resultado pBBR-K-*PcrtE-mbp-aaas* que contenía el gen *mbp-aaas* (SEQ ID NO: 28). En el plásmido pBBR-K-*PcrtE-mbp-aaas*, Aaas se expresa como fusión traduccional en el extremo C terminal de la proteína de unión a maltosa (MBP) de *Escherichia coli* (SEQ ID NO: 29). En este plásmido de nueva construcción, el gen de resistencia a kanamicina y el gen codificante de amorfadieno sintasa se transcriben en la misma orientación.

Transformación de *Rhodobacter sphaeroides*

65

Se analizaron transformación de *E. coli* S17-1 con plásmidos y posterior transferencia de plásmidos de S17-1 a *R. sphaeroides* por conjugación usando procedimientos convencionales (Nishimura *et al.*, Nucl. Acids Res. (1990) 18, 6169; Parke, Gene (1990) 93, 135-137). Se cultivó cepa receptora de *R. sphaeroides* Rs265-9c en medio RÄ. La composición y preparación de medio RÄ se resume en la Tabla 3. En paralelo, se cultivó cepa donante de *E. coli* S17-1 que porta el plásmido para transferir en caldo de cultivo LB que contenía el antibiótico apropiado. Para la conjugación, se mezclaron entre sí 450 µl de alícuotas de cultivo de la cepa receptora de *R. sphaeroides* Rs265-9c y la cepa donante de *E. coli* S17-1, y después se sedimentaron por centrifugación. El sobrenadante se descartó. Las células se lavaron dos veces con medio RÄ nuevo para retirar los antibióticos, y después se resuspendieron en 0,05 ml de medio RÄ nuevo y se aplicaron puntualmente en una placa PY. La composición y preparación de medio PY se resumen en la Tabla 4. Después de 4-5 días de incubación a 30 °C las células se recogieron con un asa de inoculación y se resuspendieron en 0,3 ml de medio RÄ. Las diluciones de esta suspensión se dispersaron en placas RÄ que contenían el antibiótico apropiado y se incubaron a 30 °C durante 2-3 días. Las colonias se seleccionaron de las placas, se aplicaron en estrías en placas RS102 que contenían el antibiótico apropiado, y se incubaron a 30 °C durante 2-3 días para obtener colonias individuales. Se cultivó de nuevo una única colonia de cada clon (células transformadas potencialmente de *R. sphaeroides* Rs265-9c) en medio RS102 líquido que contenía el antibiótico apropiado y se confirmó la presencia de plásmido esperado por PCR usando cebadores apropiados. Los transformantes finales se conservaron añadiendo glicerol al cultivo (15 % v/v) y congelando a -80 °C.

Tabla 3. Composición y preparación de medio RÄ

Medio RÄ	
Componente	Cantidad por litro de agua destilada
1. Ácido málico	3 g
2. MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2 g
3. (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,2 g
4. CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,07 g
5. Solución de microelementos	1.5 ml
6. Solución de vitaminas	8 ml
7. Solución de tampón fosfato	20 ml
Los componentes 1-5 se mezclan entre sí, el volumen final se ajusta a 1 litro, y el pH se ajusta a 6,9 con NaOH 0,5 M. El medio básico resultante se esteriliza después por filtración a través de una membrana de 0,22 micrómetros; se añaden 8 ml de solución de vitaminas estéril y 20 ml de solución de tampón fosfato estéril (véase posteriormente) para proporcionar el medio RÄ final. Para medio sólido, el litro de medio básico mencionado anteriormente más 20 g de agar se mezclan en primer lugar entre sí y se esterilizan por autoclave. Después el medio se enfría hasta aproximadamente 60 °C, las vitaminas estériles y las soluciones de tampón fosfato se añaden y el medio fundido se distribuye en placas de Petri estériles.	
Solución de microelementos	
Componente	Cantidad por litro de agua destilada
Citrato de Fe(II)	500 mg
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	20 mg
ZnCl <sub>2</sub>	5 mg
LiCl	5 mg
KBr	2,5 mg
KI	2,5 mg
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,23 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,851 mg
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	5 mg
SnCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,5 mg
BaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,59 mg
AlCl <sub>3</sub>	1 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	10 mg
EDTA	20 mg
- Esterilizar por filtración a través de una membrana de 0,22 micrómetros, almacenar a 4 °C.	
Solución de vitaminas	
Componente	Cantidad por litro de agua destilada
Niacina	200 mg
Tiamina-HCl	400 mg
Nicotinamida	200 mg
Biotina	8 mg
- Esterilizar por filtración a través de una membrana de 0,22 micrómetros, almacenar a 4 °C.	
Solución de tampón de fosfato	
Componente	Cantidad por litro de agua destilada
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	600 mg
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	900 mg
- Esterilizar por filtración a través de una membrana de 0,22 micrómetros, almacenar a 4 °C.	

Tabla 4. Composición y preparación de placas de medio PY

Medio PY	
Componente	Cantidad por litro de agua destilada
1. Bacto peptona	10 g
2. Extracto de levadura	0,5 g
3. CaCl <sub>2</sub> (0,4 M)	5 ml
4. MgCl <sub>2</sub> (0,4 M)	5 ml
5. FeSO <sub>4</sub> (0,5 %)	2,4 ml
6. Agar	20 g
7. H <sub>2</sub> O	990 ml
Los componentes 1-7 se mezclan entre sí, el pH se ajusta a 7,0 con NaOH 0,5 M, y la mezcla se esteriliza por autoclave. Después el medio se enfría hasta aproximadamente 60 °C, el medio fundido se distribuye en placas de Petri estériles.	

Ejemplo 4: Cultivo de cepas de *Rhodobacter sphaeroides* en condiciones de matraz de agitación convencionales y evaluación de la producción de valenceno.

#### Preparación de reservas celulares congeladas

Se prepararon reservas celulares congeladas de cepas de *R. sphaeroides* introduciendo un asa completa de células congeladas en 2 ml de medio RS102 que contenía kanamicina 50 mg/l (si fue aplicable para mantenimiento de plásmidos). El precultivo se dejó crecer a 30 °C con agitación a 220 rpm durante 24 h. Se transfirió una alícuota de 250 µl de precultivo a 25 ml de medio RS102 que contenía kanamicina 50 mg/l para iniciar el crecimiento (t = 0). El cultivo principal de 25 ml se dejó crecer en un matraz de Erlenmeyer con deflectores de 250 ml a 30 °C con agitación a 220 rpm durante aproximadamente 24 h. Los cultivos de células bacterianas se mezclaron con glicerol anhidrido estéril y agua estéril para alcanzar un contenido de glicerol final de 25 % y una densidad óptica final a 660 nanómetros (DO<sub>660</sub>) de 12. La suspensión celular resultante se distribuyó de forma aséptica en alícuotas de 1,2 ml en crioviales de 2 ml y después se congelaron a -80 °C hasta su uso.

#### Procedimiento de matraz de agitación

Se iniciaron inoculantes de cepas de *R. sphaeroides* introduciendo 250 µl de una reserva celular descongelada y congelada homogeneizada en 25 ml de medio RS102 que contenía kanamicina 50 mg/l (si fue aplicable para mantenimiento de plásmidos). Los precultivos se dejaron crecer en matraces de Erlenmeyer con deflectores de 250 ml durante 24-48 h a 30 °C con agitación a 220 rpm. Se transfirió una alícuota adecuada de precultivo a 22,5 ml de medio RS102 que contenía kanamicina 50 mg/l (si fue aplicable para mantenimiento de plásmidos) para iniciar (t = 0) experimentos de matraz de agitación con una densidad óptica inicial a 660 nm (DO<sub>660</sub>) de 0,16. Los cultivos principales se dejaron crecer en matraces de Erlenmeyer con deflectores de 250 ml a 30 °C con agitación a 220 rpm. Después de 8 h de cultivo, se añadieron 2,5 ml de n-dodecano al cultivo bacteriano. El cultivo en matraz de agitación continuó a 30 °C con agitación a 220 rpm durante 72 h desde la inoculación. Cada cultivo de siembra sirvió para inocular dos matraces de agitación duplicados con un volumen final de 25 ml de caldo de cultivo completo, compuesto de medio de cultivo y n-dodecano para recuperación de producto *in situ*. Se retiraron muestras (0,5 ml) de caldo de cultivo bifásico a intervalos de 24 h y se analizó con respecto a crecimiento (DO<sub>660</sub>), pH y glucosa en sobrenadante. Al final de los experimentos (t = 72 h), el caldo de cultivo bifásico se analizó con respecto a la presencia de valenceno (véase métodos analíticos posteriormente). Al final de los experimentos, se sembraron 10 µl de caldo de cultivo de forma aséptica en placas de agar de recuento de cultivo general (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Alemania) y se incubaron a 37 °C durante 24 h para ensayar con respecto a contaminación.

#### Métodos analíticos

##### Preparación de muestras para análisis de contenido de isoprenoides en fase orgánica

En un procedimiento típico, se transfirieron 10 ml de muestras de caldo de cultivo completo a un tubo cónico de polipropileno de 15 ml estéril desechable. Las fases orgánica y acuosa se separaron tras ultracentrifugación durante 30 min. La fase orgánica se transfirió a viales de cromatografía ámbar para análisis por cromatografía de gases (véase posteriormente). Los rendimientos del producto se determinaron basándose en curvas de calibración establecidas tras análisis de tres soluciones patrón de valenceno auténtico disueltas en n-dodecano de uso analítico.

##### Preparación de muestras para análisis de contenido de isoprenoides en caldo de cultivo completo

En un procedimiento típico, se transfirieron 400 µl de muestras de caldo de cultivo completo a un tubo cónico de polipropileno de 15 ml estéril desechable, se trataron con 4 ml de acetona, se agitaron vigorosamente en un agitador orbital IKA Vibrax a 1.500 rpm durante 20 minutos, y después se incubaron en un baño ultrasónico de sobremesa durante 30 min a temperatura ambiente. Finalmente las muestras se centrifugaron a velocidad máxima y el sobrenadante se transfirió a viales de cromatografía ámbar para análisis por cromatografía de gases (véase posteriormente). Los rendimientos de producto se determinaron basándose en curvas de calibración establecidas usando una solución patrón de valenceno auténtico preparada de la siguiente manera: se añadieron 5 ml de valenceno auténtico a un matraz volumétrico de 100 ml y se disolvió con n-dodecano de uso analítico. Se transfirieron alícuotas de solución patrón de valenceno (20, 40 y 80 µl) a tubos cónicos de polipropileno de 15 ml estériles desechables, se trataron con agua estéril desionizada (380, 360 y 320 µl, respectivamente) y 4 ml de acetona. Cada mezcla se homogeneizó vigorosamente en un agitador vorticial y después se transfirió a viales de cromatografía ámbar para análisis por cromatografía de gases, de la que se derivó una curva de calibración.

##### Cromatografía de gases

Se realizó cromatografía de gases en un instrumento Hewlett-Packard GC 6890 con una columna capilar Restek Rtx-5 (30,0 m x 0,32 mm x 0,25 µm). Las temperaturas de inyector y detector FID se ajustaron a 300 °C y 250 °C, respectivamente. El flujo de gas a través de la columna se ajustó a 2,7 ml/min. La temperatura inicial del horno se mantuvo a 70 °C durante 2 min, se aumentó a 180 °C a una velocidad de 10 °C/min, se aumentó adicionalmente a

300 °C a una velocidad de 40 °C/min, después se enfrió hasta 60 °C y se mantuvo a esa temperatura durante 3 min hasta la siguiente inyección. El volumen de muestra inyectada fue de 1 µl con una relación de división 4:1. Los rendimientos de producto se determinaron basándose en curvas de calibración establecidas para muestras auténticas.

5 Ejemplo 5: Comparación *in vivo* de valenceno sintasa de *C. nootkatensis* (invención) y valenceno sintasa de Cítrico (referencia).

10 Se cultivaron cepas de *R. sphaeroides* Rs265-9c (cepa en blanco, sin plásmido), Rs265-9c/pBBR-K-*PcrtE-mbp-valF* (cepa de referencia), Rs265-9c/pBBR-K-*mev-op-4-89-PcrtE-mbp-valF* (cepa de referencia que también expresa el operón de mevalonato mutado *mev* de *Paracoccus zeaxanthinifaciens*), y Rs265-9c/pBBR-K-*PcrtE-mbp-valC-opt*, Rs265-9c/pBBR-K-*PcrtEmbp-valC-opt-short*, Rs265-9c/pBBR-K-*mev-op-4-89-PcrtE-mbp-valC-opt* y Rs265-9c/pBBR-K-*mev-op-4-89-PcrtEmbp-valC-opt-short* (cuatro cepas que expresan una secuencia de ácido nucleico que codifica una valenceno sintasa de acuerdo con la invención), en condiciones de cultivo de matraz de agitación convencionales como se ha descrito anteriormente. Se ensayaron varios clones de cada cepa de *R. sphaeroides* transformadas con respecto a producción de valenceno y cada experimento de matraz de agitación se procesó por duplicado, a menos que se indique otra cosa. El título de valenceno se presenta en mg/l de n-dodecano, en el que el n-dodecano de fase orgánica constituyó 10 % (v/v) del caldo de cultivo completo.

20 Los resultados de estos ensayos *in vivo* se proporcionan en la Tabla 5.

Tabla 5. Formación *in vivo* de valenceno y germacreno A en experimentos de matraz de agitación que emplean *R. sphaeroides* que contiene los plásmidos pBBR-K-*PcrtE-mbp-valF*, pBBR-K-*PcrtE-mbp-valC-opt*, pBBR-K-*mev-op-4-89-PcrtE-mbp-valF* o pBBR-K-*mev-op-4-89-PcrtE-mbp-val-opt* y *R. sphaeroides* sin plásmido.

	Cepa de <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Valenceno en n-dodecano (mg/l)		Germacreno A en n-dodecano (mg/l) <sup>a</sup>		Relación V/G <sup>b</sup>
		Título promedio	D.T.	Título promedio	D.T.	
1	Rs265-9c/pBBR-K- <i>PcrtE-mbp-valF</i> <sup>c</sup>	25	1	38	2	0,67
2	Rs265-9c/pBBR-K- <i>PcrtE-mbp-valC-opt</i> <sup>d</sup>	575	35	176	10	3,3
3	Rs265-9c/pBBR-K- <i>mev-op-4-89-PcrtEmbp-valF</i> <sup>e</sup>	249	13	259	28	0,96
4	Rs265-9c/pBBR-K- <i>mev-op-4-89-PcrtEmbp-valC-opt</i> <sup>d</sup>	3519	368	983	111	3,6
5	Rs265-9c	0,0	0,0	0,6	0,1	0

<sup>a</sup> Cuantificado como beta-elemento tras reordenación térmica de Cope de sustrato germacreno A en el inyector GC (300 °C)  
<sup>b</sup> Relación de valenceno (V) con respecto a germacreno A.  
<sup>c</sup> Se ensayó la producción de valenceno para cada cepa en siete clones por duplicado. <sup>d</sup> Se ensayó la producción de valenceno para cada cepa en seis clones por duplicado. <sup>e</sup> Se ensayó la producción de valenceno para cada cepa en cuatro clones por duplicado.

25 Mientras que el cultivo de la cepa de *R. sphaeroides* Rs265-9c vacía no dio como resultado cantidades detectables de valenceno (entrada 5), la cepa transformada con el plásmido pBBR-K-*PcrtE-mbp-valF* que expresaba ValF de *Citrus x paradisi* con la MBP de *E. coli* en su extremo N terminal formó valenceno 25 mg/l (entrada 1). La cepa con el plásmido análogo pBBR-K-*PcrtE-mbp-valC-opt* que expresaba ValC de *Chamaecyparis nootkatensis* con la MBP de *E. coli* en su extremo N terminal dio como resultado un título de valenceno de 575 mg/l (entrada 2), un aumento de 23 veces en comparación con la cepa que expresa MBP-ValF. Además en presencia del operón de mevalonato mutado de *Paracoccus zeaxanthinifaciens* la expresión de MBP-ValC condujo a títulos de valenceno significativamente mayores que MBP-ValF. Aunque *R. sphaeroides* que contenía pBBR-K-*mev-op-4-89-PcrtE-mbp-valF* produjo valenceno 249 mg/l (entrada 3), se formaron 3519 mg/l en el caso de *R. sphaeroides* que contenía pBBR-K-*mev-op-4-89-PcrtE-mbp-valC-opt* (entrada 4), un aumento de 14 veces. Por lo tanto, este ejemplo muestra que una valenceno sintasa de acuerdo con la invención conduce a una producción de valenceno *in vivo* considerablemente mayor que una valenceno sintasa conocida de cítrico.

40 La nueva valenceno sintasa ValC también forma mucho más germacreno-A que la valenceno sintasa ValF de *Citrus x paradisi*. La relación de valenceno con respecto a germacreno A (observada en beta-elemento debido a reordenación térmica en el orificio de inyección del GC-MS) en la capa de n-dodecano parecía ser 0,67 y 0,96 para *R. sphaeroides* Rs265-9c con los plásmidos pBBR-K-*PcrtE-mbp-valF* y pBBR-K-*mev-op-4-89-PcrtE-mbp-valF*, respectivamente, lo que indica que en esas condiciones la expresión de MBP-ValF da como resultado ligeramente más germacreno-A que valenceno (entradas 1 y 3). Esta relación de valenceno con respecto a germacreno A aumentó hasta 3,3 y 3,6 cuando se cultivó *R. sphaeroides* con los plásmidos pBBR-K-*PcrtE-mbp-valC-opt* y pBBR-K-*mev-op-4-89-PcrtE-mbp-valC-opt* (entradas 2 y 4). Por lo tanto, este ejemplo muestra que un valenceno de acuerdo con la invención también es significativamente más específico con respecto a formación de valenceno en comparación con germacreno A que la valenceno sintasa de *Citrus x paradisi*.

Ejemplo 6: Comparación *in vivo* de valenceno sintasa de longitud completa de *C. nootkatensis* (ValC) y valenceno sintasa truncada en el extremo N terminal de *C. nootkatensis* (ValC-short)

Se cultivaron cepas de *C. nootkatensis* Rs265-9c (cepa en blanco, sin plásmido), Rs265-9c/pBBR-K-PcrtE-valC-opt (cepa que expresa el gen de valenceno sintasa de longitud completa valC-opt), y Rs265-9c/pBBR-K-PcrtE-valC-opt-short (cepa que expresa una versión truncada del gen de valenceno sintasa valC-opt-short), así como las cepas de *R. sphaeroides* que expresaban los genes ValC correspondientes pero ahora fusionados traduccionalmente en sus extremos 5' con el extremo 3' del gen de mbp de *E. coli* (Rs265-9c/pBBR-K-PcrtE-mbp-valC-opt y Rs265-9c/pBBR-K-PcrtE-mbp-valC-opt-short), en las condiciones de cultivo de matraz de agitación convencionales como se ha descrito anteriormente. Se ensayaron varios clones de cada una de estas cinco cepas con respecto a producción de valenceno, y cada experimento de matraz de agitación se procesó por duplicado, a no ser que se indique de otro modo. El título de valenceno se presenta en mg/l de n-dodecano, en el que el n-dodecano de fase orgánica constituyó 10 % (v/v) del caldo de cultivo completo.

Los resultados de estos ensayos *in vivo* se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6. Formación *in vivo* de valenceno en experimentos de matraz de agitación que emplean *R. sphaeroides* que contiene los plásmidos pBBR-K-PcrtE-mbp-valC-opt, pBBR-K-PcrtE-mbp-valC-opt-short, pBBR-K-PcrtE-valC-opt y pBBR-K-PcrtE-valC-opt-short, y *R. sphaeroides* sin plásmido.

Cepa de <i>Rhodobacter sphaeroides</i>		Valenceno en n-dodecano (mg/l)	
		Título Promedio	D.T.
1	Rs265-9c/pBBR-K-PcrtE-mbp-valC-opt <sup>a</sup>	575	35
2	Rs265-9c/pBBR-K-PcrtE-mbp-valC-opt-short <sup>b</sup>	592	38
3	Rs265-9c/pBBR-K-PcrtE-valC-opt <sup>c</sup>	299	22
4	Rs265-9c/pBBR-K-PcrtE-valC-opt-short <sup>a</sup>	20	5
5	Rs265-9c	0,0	0,0

<sup>a</sup> Se ensayó la producción de valenceno para cada cepa en seis clones por duplicado.  
<sup>b</sup> Se ensayó la producción de valenceno para cada cepa en cuatro clones por duplicado.  
<sup>c</sup> Se ensayó la producción de valenceno para cada cepa en cinco clones por duplicado.

Los resultados de la Tabla 6 muestran que el cultivo de las cepas de *R. sphaeroides* que expresan la longitud completa y la versión truncada en el extremo N terminal de la valenceno sintasa de *C. nootkatensis* con un marcador de MBP N terminal conduce a títulos de valenceno bastante similares, es decir 575 y 592 mg/l, respectivamente (entradas 1 y 2). Cuando se expresa sin marcador de MBP N terminal, sin embargo se obtienen títulos de valenceno muy diferentes. Aunque el cultivo de la cepa de *R. sphaeroides* que contenía el plásmido pBBR-K-PcrtE-valC-opt, formando de este modo la ValC de longitud completa no marcada, dio como resultado valenceno 299 mg/l, que es un factor 1,9 menor que con la ValC marcada con MBP correspondiente, solamente se obtuvo valenceno 20 mg/l por cultivo de la cepa Rs265-9c/pBBR-K-PcrtE-valC-opt-short que expresaba la ValC no marcada y truncada en el extremo N terminal. Este es un factor 30 veces menor que con el ValC-short marcado con MBP equivalente.

Por lo tanto, este ejemplo demuestra que una valenceno sintasa de acuerdo con la presente invención puede expresarse en forma activa en su forma nativa, es decir, sin el uso de un péptido marcador N terminal. Este ejemplo muestra además que puede obtenerse un título de terpenoides aumentado expresando una valenceno sintasa de acuerdo con la presente invención con un péptido marcador N terminal; el efecto de dicho péptido marcador N terminal es más profundo en el caso de expresión de una versión truncada en el extremo N terminal de una valenceno sintasa de acuerdo con la presente invención.

Ejemplo 7: Comparación *in vivo* de la expresión de una valenceno sintasa con un péptido marcador N terminal (invención) y sin dicho péptido marcador (referencia).

Se cultivaron las cepas de *R. sphaeroides* Rs265-9c (cepa en blanco, sin plásmido), Rs265-9c/pBBR-K-PcrtE-valFpoR, Rs265-9c/pBBR-K-P y Rs265-9c/pBBR-K-mev-op-4-89-PcrtE-valFpoR-rev (tres cepas de referencia, sin péptido marcador N terminal), Rs265-9c/pBBR-K-PcrtE-mbp-valFpoR, Rs265-9c/pBBR-K-PcrtE-mbp-valFpoR-rev y Rs265-9c/pBBR-K-mev-op-4-89-PcrtE-mbp-valFpoR-rev (tres cepas que expresan el gen de valenceno sintasa de *Citrus x paradisi* ValFpoR fusionado traduccionalmente en su extremo 5' con el extremo 3' del gen mbp de *E. coli*), Rs265-9c/pBBR-K-PcrtE-nusA-valFpoR, Rs265-9c/pBBR-K-PcrtE-nusA-valFpoR-rev y Rs265-9c/pBBR-K-mev-op-4-89-PcrtE-nusA-valFpoR-rev (tres cepas que expresan el gen de valenceno sintasa de *Citrus x paradisi* ValFpoR fusionado traduccionalmente en su extremo 5' con el extremo 3' del gen nusA de *E. coli*), Rs265-9c/pBBR-K-PcrtE-set-valFpoR, Rs265-9c/pBBR-K-PcrtE-set-valFpoR-rev y Rs265-9c/pBBR-K-mev-op-4-89-PcrtE-set-valFpoR-rev (tres cepas que expresan el gen de valenceno sintasa de *Citrus x paradisi* ValFpoR fusionado traduccionalmente en su extremo 5' con el extremo 3' del gen set), y Rs265-9c/pBBR-K-PcrtE-trx-valFpoR, Rs265-9c/pBBR-K-PcrtE-trx-valFpoR-rev y Rs265-9c/pBBR-K-mev-op-4-89-PcrtE-trx-valFpoR-rev (tres cepas que expresan el gen de valenceno sintasa de *Citrus x paradisi* ValFpoR fusionado traduccionalmente en su extremo 5' con el extremo 3' del gen trx de *E. coli*) en las condiciones de cultivo de matraz de agitación convencionales como se ha descrito anteriormente. Varios clones de cada cepa de *R. sphaeroides* transformada se ensayaron con respecto a producción de valenceno,

y cada experimento de matraz de agitación se procesó por duplicado, a no ser que se indique de otro modo. El título de valenceno se presenta en mg/l de n-dodecano, en el que el n-dodecano de fase orgánica constituyó 10 % (v/v) del caldo de cultivo completo.

5 Los resultados de este experimento se proporcionan en las Tablas 7 - 9

Tabla 7. Formación *in vivo* de valenceno en experimentos de matraz de agitación que emplean *R. sphaeroides* que contiene los plásmidos pBBR-K-PcrtE-*mbp-valFpoR*, pBBR-K-PcrtE-*nusA-valFpoR*, Rs265-9c/pBBR-K-PcrtE-*set-valFpoR*, pBBR-K-PcrtE-*trx-valFpoR* y pBBR-K-PcrtE-*valFpoR*, y *R. sphaeroides* sin plásmido.

Cepa de <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Valenceno en n-dodecano (mg/l)	
	Título Promedio	Desviación Típica
Rs265-9c/pBBR-K-PcrtE- <i>mbp-valFpoR</i> <sup>a</sup>	26,2	1,6
Rs265-9c/pBBR-K-PcrtE- <i>nusA-valFpoR</i> <sup>a</sup>	7,5	0,9
Rs265-9c/pBBR-K-PcrtE- <i>set-valFpoR</i> <sup>b</sup>	3,5	0,7
Rs265-9c/pBBR-K-PcrtE- <i>trx-valFpoR</i> <sup>a</sup>	16,6	1,7
Rs265-9c/pBBR-K-PcrtE- <i>valFpoR</i> <sup>a</sup>	0,5	0,6
Rs265-9C <sup>a</sup>	0,0	0,0

<sup>a</sup> Se ensayó la producción de valenceno para cada cepa en tres clones diferentes.  
<sup>b</sup> Se ensayó la producción de valenceno para cada cepa en dos clones diferentes.

10

Tabla 8. Formación *in vivo* de valenceno en experimentos de matraz de agitación que emplean *R. sphaeroides* que contiene los plásmidos pBBR-K-PcrtE-*mbp-valFpoR-rev*, pBBR-K-PcrtE-*nusA-valFpoR-rev*, pBBR-K-PcrtE-*set-valFpoR-rev*, pBBR-K-PcrtE-*trx-valFpoR-rev* y pBBR-K-PcrtE-*valFpoR-rev*, y *R. sphaeroides* sin plásmido.

Cepa de <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Valenceno en n-dodecano (mg/l)	
	Título Promedio	Desviación Típica
Rs265-9c/pBBR-K-PcrtE- <i>mbp-valFpoR-rev</i> <sup>a</sup>	22,2	2,8
Rs265-9c/pBBR-K-PcrtE- <i>nusA-valFpoR-rev</i> <sup>b</sup>	5,1	0,7
Rs265-9c/pBBR-K-PcrtE- <i>set-valFpoR-rev</i> <sup>a</sup>	3,0	0,5
Rs265-9c/pBBR-K-PcrtE- <i>trx-valFpoR-rev</i> <sup>c</sup>	6,2	0,8
Rs265-9c/pBBR-K-PcrtE- <i>valFpoR-rev</i> <sup>c</sup>	0,2	0,1
Rs265-9c	0,0	0,0

<sup>a</sup> Se ensayó la producción de valenceno para cada cepa en dos clones diferentes.  
<sup>b</sup> Se ensayó la producción de valenceno para cada cepa en un clon.  
<sup>c</sup> Se ensayó la producción de valenceno para cada cepa en tres clones diferentes.

15 Tabla 9. Formación *in vivo* de valenceno en experimentos de matraz de agitación que emplean *R. sphaeroides* que contiene los plásmidos pBBR-K-*mev-op-4-89-PcrtE-mbp-valFpoR-rev*, pBBR-K-*mev-op-4-89-PcrtE-nusA-valFpoR-rev*, Rs265-9c/pBBR-K-*mev-op-4-89-PcrtE-set-valFpoR-rev*, pBBR-K-*mev-op-4-89-PcrtE-trx-valFpoR-rev* y pBBR-K-*mev-op-4-89-PcrtE-valFpoR-rev*, y *R. sphaeroides* sin plásmido.

Cepa de <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Valenceno en n-dodecano (mg/l)	
	Título Promedio	Desviación Típica
Rs265-9c/pBBR-K- <i>mev-op-4-89-PcrtE-mbpvalFpoR-rev</i> <sup>a</sup>	95,9	9,0
Rs265-9c/pBBR-K- <i>mev-op-4-89-PcrtE-nusAvalFpoR-rev</i> <sup>b</sup>	23,9	3,0
Rs265-9c/pBBR-K- <i>mev-op-4-89-PcrtE-setvalFpoR-rev</i> <sup>c</sup>	12,5	0,9
Rs265-9c/pBBR-K- <i>mev-op-4-89-PcrtE-trxvalFpoR-rev</i> <sup>c</sup>	66,9	5,8
Rs265-9c/pBBR-K- <i>mev-op-4-89-PcrtE-valFpoRrev</i> <sup>d</sup>	0,4	0,1
Rs265-9c	0,0	0,0

<sup>a</sup> Se ensayó la producción de valenceno para cada cepa en seis clones diferentes.  
<sup>b</sup> Se ensayó la producción de valenceno para cada cepa en cuatro clones diferentes.  
<sup>c</sup> Se ensayó la producción de valenceno para cada cepa en tres clones diferentes.  
<sup>d</sup> Se ensayó la producción de valenceno para cada cepa en dos clones diferentes.

20 Los datos de las Tablas 7-8 muestran que las cepas de *R. sphaeroides* en las que se expresa la valenceno sintasa de *Citrus x paradisi* ValF (con una extensión C terminal de dos aminoácidos ValFpoR) con un péptido marcador N terminal, produjeron más de 7 veces más valenceno que las cepas que expresaban ValFpoR en su forma nativa. Este efecto positivo de expresar ValFpoR con un péptido marcador N terminal en la producción de valenceno es más pronunciado cuando se aplica la MBP de *E. coli* como marcador peptídico.

25 Se observa un efecto positivo similar de una fusión traduccional del gen *valFpoR-rev* en su extremo 5' con el extremo 3' de un gen codificante de péptido marcador en la producción de valenceno con cepas de *R. sphaeroides* que co-expresan un operón de mevalonato mutado de *Paracoccus zeaxanthinifaciens* (Tabla 9). También en este caso, este efecto positivo es mayor cuando el gen codificante de *mbp* de *E. coli* se usa como dicho gen codificante de péptido marcador.

30



Por lo tanto, este ejemplo muestra que la expresión de una enzima de terpeno sintasa que comprende un péptido marcador en su extremo N terminal de acuerdo con la invención en un organismo productor de isoprenoides conduce a una mayor producción de isoprenoides que cuando se expresa la terpeno sintasa sin dicho péptido marcador.

5 Ejemplo 8: Comparación *in vivo* de la expresión de una amorfadieno sintasa con un péptido marcador N terminal (invención) y sin dicho péptido marcador (referencia)

10 Se cultivaron cepas de *R. sphaeroides* Rs265-9c (cepa en blanco, sin plásmido), Rs265-9c/pBBR-K-PcrtE-valF y Rs265-9c/pBBR-K-PcrtE-aaas (dos cepas de referencia, sin péptido marcador N terminal), Rs265-9c/pBBR-K-PcrtE-mbp-valF (una cepa que expresa el gen de valenceno sintasa de *Citrus x paradisi valF* fusionado traduccionalmente en su extremo 5' con el extremo 3' del gen *mbp* de *E. coli*) y Rs265-9c/pBBR-K-PcrtE-mbp-aaas (una cepa que expresa el gen de amorfadieno sintasa de *Artemisia annua aaas* fusionado traduccionalmente en su extremo 5' con el extremo 3' del gen *mbp* de *E. coli*) en las condiciones de cultivo de matraz de agitación convencionales como se ha descrito anteriormente. Se ensayaron varios clones en cada cepa de *R. sphaeroides* transformada con respecto a producción de valenceno o amorfadieno, y cada experimento de matraz de agitación se procesó por duplicado, a no ser que se indique de otro modo. El título de valenceno y amorfadieno se presenta en mg/l de n-dodecano, en el que el n-dodecano de fase orgánica constituía 10 % (v/v) del caldo de cultivo completo.

20 Los resultados de este experimento se proporcionan en la Tabla 10.

Tabla 10. Formación *in vivo* de valenceno o amorfadieno en experimentos de matraz de agitación que emplean *R. sphaeroides* que contiene los plásmidos pBBR-K-PcrtE-mbp-valF, pBBR-K-PcrtE-mbp-aaas, pBBR-K-PcrtE-valF y pBBR-K-PcrtE-aaas, y *R. sphaeroides* sin plásmido

Cepa de <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Valenceno o Amorfadieno en n-dodecano (mg/l)	
	Título Promedio	Desviación Típica
Rs265-9c/pBBR-K-PcrtE-mbp-valF <sup>a</sup>	25,4	1,4
Rs265-9c/pBBR-K-PcrtE-mbp-aaas <sup>b</sup>	666	72
Rs265-9c/pBBR-K-PcrtE-valF <sup>c</sup>	2,0	0,1
Rs265-9c/pBBR-K-PcrtE-aaas <sup>d</sup>	361	30
Rs265-9c	0,0	0,0

<sup>a</sup> Se ensayó la producción de valenceno en siete clones diferentes.  
<sup>b</sup> Se ensayó la producción de amorfadieno en siete clones diferentes.  
<sup>c</sup> Se ensayó la producción de valenceno en un clon.  
<sup>d</sup> Se ensayó la producción de amorfadieno en un clon.

25 Los datos de la Tabla 10 muestran que las cepas de *R. sphaeroides* en las que se expresa la valenceno sintasa de *Citrus x paradisi ValF* con un marcador de MBP N terminal, produjeron más de 10 veces valenceno que las cepas que expresaban ValF en su forma nativa y que las cepas de *R. sphaeroides* en las que se expresa la amorfadieno sintasa de *Artemisia annua Aaas* con un marcador de MBP N terminal, producían casi 20 veces más amorfadieno que las cepas que expresaban Aaas en su forma nativa. Este efecto positivo de expresión de una sesquiterpeno sintasa con un marcador de MBP N terminal en producción de sesquiterpeno es por tanto claramente aplicable a enzimas distintas de valenceno sintasa tales como amorfadieno sintasa.

35 Ejemplo 9: Expresión *in vivo* de valenceno sintasa de *C. nootkatensis* en levadura

La fase abierta de lectura de longitud completa que codifica la valenceno sintasa de *C. nootkatensis* (ValC) se amplificó a partir del plásmido pAC-65-3 con los cebadores 65-3ATGDuetFw

40 5'-tatatggatccATGGCTGAAATGTTTAATGGAAATCCAGC-3' [SEQ ID NO: 30]  
 (sitio de reconocimiento de *Bam*HI subrayado), y DuetAS1  
 5'-GATTATGCGGCCGTGTACAA-3' [SEQ ID NO: 31].

45 El sitio de hibridación del cebador 65-3ATGDuetFw estaba al comienzo de la fase abierta de lectura nativa *valC* (SEQ ID NO: 3) y el cebador se diseñó para introducir un codón de inicio y el sitio de *Bam*HI para clonación en el vector de levadura. El cebador inverso DuetAS era complementario a una región del plásmido pAC-65-3 cadena abajo de la fase abierta de lectura de *valC*. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: se siguió desnaturalización inicial de 45 s a 98 °C por treinta ciclos de PCR de 10 s a 98 °C, 20 s a 58 °C y 2 min a 72 °C que se siguió de nuevo por una extensión final de 5 min a 72 °C. La concentración final de reactivos de PCR fue Tampón Phusion HF 1 x (Finnzymes), dNTP 200 μM, cebadores 0,5 μM, DMSO 3 % y ADN polimerasa Phusion 0,02 U/μl (Finnzymes). El fragmento de PCR obtenido se sometió a electroforesis para confirmar la longitud deseada de producto de PCR (1,9 kb) y se escindió posteriormente del gel de agarosa y se purificó mediante técnicas convencionales.

El fragmento de PCR purificado se ligó en el vector pGEM-T Easy (Promega) de acuerdo con el manual del producto y se transformó en *E. coli* XL-1 Blue usando procedimientos convencionales. Las bacterias recombinantes se seleccionaron en placas LB complementadas con ampicilina 100 µg/ml. La presencia del gen *valC* en los clones de *E. coli* recombinantes se confirmó por PCR de colonias usando los cebadores M13(-20) (5'-TTGTAACGACGGCCAGTG-3', SEQ ID NO: 32) y SP6Chip (5'-GTGACTATAGAATACTCAAGC-3', SEQ ID NO: 33) y protocolos convencionales. El plásmido pGEM-*valC* se aisló usando Kit de Miniprep de Centrifugación QIAprep (Qiagen) y la secuencia de *valC* se confirmó por secuenciación de DETT.

El plásmido pGEM-*valC* y el vector de expresión de levadura pYES3/CT (Invitrogen) se digirieron con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Not*I. Los dos fragmentos de restricción requeridos se escindieron posteriormente de un gel de agarosa para purificación. Después los fragmentos se ligaron y se transformaron en *E. coli* XL-1 Blue usando procedimientos convencionales. Por este procedimiento de clonación la fase abierta de lectura de *valC* se situó entre el promotor de *GAL1* que permite inducción de proteínas de alto nivel en levadura por galactosa y el terminador *CYC1*. No se añadió ningún marcador N o C terminal. Se seleccionaron bacterias recombinantes en placas LB complementadas con ampicilina 100 µg/ml. La presencia del gen *valC* en las colonias de *E. coli* recombinantes se verificó por PCR de colonias usando cebadores de vector y condiciones convencionales. El plásmido se aisló usando Kit de Miniprep de Centrifugación QIAprep (Qiagen) y la secuencia de nucleótidos de *valC* se confirmó por secuenciación de DETT.

El plásmido se transformó después en cepa de levadura (Urban, P., Mignotte, C., Kazmaier, M., Delorme, F. y Pompon, D. 1997. *J. Biol. Chem.* 272: 19176-19186) usando protocolos convencionales (Gietz, R.D., Woods R.A. 2002. *Methods in Enzymology* 350: 87-96). Las colonias de levaduras recombinantes se seleccionaron en medio mínimo de dextrosa Sintético sólido (medio básico de nitrógeno de levadura Difco 0,67 % sin aminoácidos, D-glucosa 2 %, adenina sulfato 40 mg/l, L-arginina 20 mg/l, L-ácido aspártico 100 mg/l, L-ácido glutámico 100 mg/l, L-histidina 20 mg/l, L-leucina 60 mg/l, L-lisina 30 mg/l, L-metionina 20 mg/l, L-fenilalanina 50 mg/l, L-serina 375 mg/l, L-treonina 200 mg/l, L-tirosina 30 mg/l, L-valina 150 mg/l, uracilo 20 mg/l, agar 2 %) omitiendo L-triptófano para selección auxotrófica.

Se inoculó una única colonia de levadura que contenía *valC* en 5 ml de medio mínimo de galactosa Sintético líquido (medio básico de nitrógeno de levadura Difco 0,67 % sin aminoácidos, D-galactosa 2 %, sulfato de adenina 40 mg/l, L-arginina 20 mg/l, L-ácido aspártico 100 mg/l, L-ácido glutámico 100 mg/l, L-histidina 20 mg/l, L-leucina 60 mg/l, L-lisina 30 mg/l, L-metionina 20 mg/l, L-fenilalanina 50 mg/l, L-serina 375 mg/l, L-treonina 200 mg/l, L-tirosina 30 mg/l, L-valina 150 mg/l, uracilo 20 mg/l) sin L-triptófano y el cultivo de levadura de partida se cultivó durante una noche a 30 °C. Los cultivos de levadura transformados con el vector pYES3/CT vacío se usaron como controles en experimentos de fermentación de matraces de agitación. Después de incubación durante una noche se midió la densidad óptica (DO<sub>600</sub>) de los cultivos de levadura. Los cultivos se diluyeron posteriormente a DO<sub>600</sub> de 0,05 en 50 ml de medio mínimo de galactosa sintético y se incubaron a 200 rpm y 30 °C. Los cultivos se superpusieron con 5 ml de n-dodecano cuando la DO<sub>600</sub> estaba en el intervalo de 0,8 a 1, y el cultivo se continuó durante 3 días. Después de tres días de fermentación la capa de n-dodecano se separó de los cultivos de levadura por un embudo de separación de vidrio y posteriormente se centrifugó a 1.200 rpm durante 10 min, se diluyó 3 veces en etil acetato, se secó usando Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhídrido y después se analizó por GC-MS, que se operó como se ha descrito en el "ensayo de actividad de valenceno sintasa" en la parte general de la sección experimental.

Se detectó (+)-Valenceno en un tiempo de retención de 14,051 y se identificó por comparación de los espectros y tiempo de retención con el patrón auténtico de (+)-valenceno. No se detectó ningún compuesto en este tiempo de retención en los cultivos de levadura transformados con el vector pYES3/CT vacío. Se formó germacreno A como un producto secundario menor en estas fermentaciones de levadura.

Se realizó cuantificación de la cantidad de (+)-valenceno producido por determinación del área pico de recuento iónico total (TIC) de los picos de (+)-valenceno de tres experimentos de fermentación de matraces de agitación independientes. Se calculó la concentración absoluta de (+)-valenceno a partir del área pico por comparación con una curva patrón preparada midiendo la serie de diluciones de patrones auténticos con una concentración conocida. La cantidad producida de (+)-valenceno fue de 1,36 ± 0,05 mg/l de cultivo de levadura. Este ejemplo muestra por lo tanto la aplicabilidad de *valC* para producir (+)-valenceno en levadura.

#### Ejemplo 10: Expresión de *Valc* en plantas

La fase abierta de lectura de longitud completa que codifica el *valC* se escindió del plásmido pAC-65-3 usando enzimas de restricción *Bam*HI y *Not*I. En paralelo, también se digirió el vector de clonación plmpactVector 1.5 (<http://www.pri.wur.nl/UK/products/ImpactVector/>) con enzimas de restricción *Bam*HI y *Not*I. Se aislaron los fragmentos de restricción de ADN tanto de plmpactVector 1.5 requerido como de *valC* de un gel de agarosa, seguido de purificación de los fragmentos de ADN requeridos, su ligamiento posterior y finalmente transformación en *E. coli* XL-1 blue usando procedimientos convencionales. Se seleccionaron bacterias recombinantes en medio LB sólido (1000 ml de agua desionizada, con 10 g de Bactotripton, 5 g de Bacto levadura, 5 g de NaCl) con 1,5 % de agar técnico, que contenía gentamicina 20 µg/ml para selección de transformantes. Después de cultivo durante una

noche de colonias recombinantes en cultivo líquido (3 ml de caldo de cultivo LB con gentamicina 20 µg/ml, 250 rpm, 37 °C), se aisló ADN plasmídico usando el Kit de Miniprep de Centrifugación Qiaprep (Qiagen). Se ensayó material de plásmido aislado por análisis de restricción usando las enzimas *Bam*HI y *Not*I. Finalmente, se comprobó el inserto de un vector correcto, que se denominó pIV5-ValC, mediante secuenciación de DETT con cebadores de vectores. Dentro de pIV5-ValC, el ADN de ValC está precedido de una secuencia de dirección mitocondrial CoxIV (Köhler RH, Zipfel WR, Webb WW, Hanson MR. *Plant J.* 1997;11:613-21), y se situó entre el promotor de RbcS1 (Prbcs) y el terminador de RbcS1 (Trbcs) de *Chrysanthemum morifolium* (<http://www.pri.wur.nl/UK/products/ImpactVector/>; Outchkourov NS, Peters J, de Jong J, Rademakers W, Jongsma MA. *Planta.* 2003, 216(6):1003-12).

Se digirió ADN de los plásmidos tanto pIV5-ValC como pBINPLUS (van Engelen FA, Molthoff JW, Conner AJ, Nap JP, Pereira A, Stiekema WJ. *Transgenic Res.* Jul 1995; 4(4):288-90.) con enzimas de restricción *As*cl y *Pa*cl en los tampones preestablecidos. Se aislaron los fragmentos de restricción de ADN tanto de pBINPLUS requerido como de *valC* de un gel de agarosa, seguido de purificación de los fragmentos de ADN requeridos, su ligamiento posterior y finalmente transformación en *E. coli* XL-1 blue usando procedimientos convencionales. Se seleccionaron bacterias recombinantes en placas de LB que contenía kanamicina 50 µg/ml. Después de cultivo durante una noche de colonias recombinantes en cultivo líquido (3 ml de caldo de cultivo con kanamicina 50 µg/ml, 250 rpm, 37 °C), se aisló ADN plasmídico usando el Kit de Miniprep de Centrifugación Qiaprep (Qiagen). Se ensayó material plasmídico aislado por análisis de restricción usando las enzimas *As*cl y *Pa*cl. Un plásmido con una inserción correcta del casete de Prbcs, ValC y Trbcs se denominó pBIN-ValC.

El pBIN-ValC y plásmido de control pBINPLUS se usaron para transformar *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. Se prepararon células electrocompetentes de *Agrobacterium* de acuerdo con protocolos convencionales, y se mezclaron 40 µl de células competentes con 1 µl de ADN plasmídico. La mezcla se transfirió después a una cubeta de electroporación pre-enfriada y se mantuvo en hielo hasta la electroporación. Para electroporación, la cubeta se colocó en el soporte de electroporación y se sometió a electroporación en condiciones convencionales (100 ohm, capacitación de 250, 2,50 Kvolts y 25 cap). Inmediatamente después de la electroporación, se añadió 1 ml de medio SOC, y las células se incubaron a 60 minutos a 37 °C con agitación suave. A continuación, las bacterias se sembraron en placas de LB-agar con rifampicilina (100 µg/ml) y kanamicina (50 µg/ml). Se confirmó la presencia de ADN plasmídico correcto en las bacterias transformadas por aislamiento de plásmidos y análisis de restricción usando enzimas de restricción *Bam*HI y *Not*I.

Para transformación de plantas de *Nicotiana benthamiana*, las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 con pBinValC y plásmido de control pBINPLUS se inocularon en 10 ml de caldo de cultivo LB líquido de cultivo de partida con antibióticos con rifampicilina (100 µg/ml) y kanamicina (50 µg/ml) durante una noche a 28 °C y agitación a 250 rpm. Posteriormente, se añadieron 0,25 ml de los cultivos de partida a 25 ml de caldo de cultivo LB líquido con rifampicilina (100 µg/ml) y kanamicina (50 µg/ml) y se incubó durante una noche a 28 °C y agitación a 250 rpm. Al día siguiente, el cultivo de una noche se centrifugó durante 10 minutos a 8000 x g y se descartó el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 20 ml de medio líquido M300 (sales Murachige y Skoog (MS) 4,4 g/l con vitaminas, ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES) 0,5 g/l, sacarosa 30 g/l, pH 6,0) con acetosiringona (100 µM). Todos los productos químicos para preparar el medio fueron de Duchefa. Se centrifugaron células de nuevo en las mismas condiciones, se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron de nuevo en 20 ml de medio M300 con acetosiringona. La resuspensión se diluyó en 980 ml de medio M300 con acetosiringona.

El mismo día, se cortaron plantas de *Nicotiana benthamiana* que se habían sembrado en medio MS estéril con agar 0,6 % seis semanas antes y habían crecido en un ambiente estéril (16 horas de luz al día, 25 °C) en discos de hojas (explantes) de 5-7 mm, y los explantes se pusieron inmediatamente en medio líquido M300 para evitar el secado. Después de haberse cortado todos los explantes (120 por construcción), el medio M300 se reemplazó con suspensión de *Agrobacterium* diluida en una placa de Petri y la placa de Petri se selló y se incubó en oscuridad durante tres días a temperatura ambiente. Posteriormente, los explantes se lavaron en medio M300 con ticarcilina (500 mg/l) y se situaron en M300 sólido con benzilaminopurina (1 mg/l), auxina (0,1 mg/l), ticarcilina (500 mg/l), kanamicina (50 µg/l) y microagar (0,6 %). De esta manera, los explantes se mantuvieron en una cámara de cultivo (16 horas de luz al día, 25 °C) y se transfirieron a medio nuevo cada 14 días. Después de haberse producido formación de callo (después de +/- 4 semanas), los callos se cortaron y se transfirieron a M300 sólido con benzilaminopurina (1 mg/l), ticarcilina (500 mg/l), kanamicina (50 µg/l) y microagar (0,6 %). Cuando se formaron brotes (después de 4 a 8 semanas), estos se cortaron del callo, y se transfirieron a M300 sólido con ticarcilina (500 mg/l), kanamicina (50 µg/l) y microagar (0,6 %) para estimular el enraizamiento. Para cada línea, se transfirieron 12 plantas enraizadas a suelo y se dejaron crecer adicionalmente en un invernadero (16 h de luz a 28 °C y 8 horas de oscuridad a 25 °C) hasta que tenían ± 12 hojas. En este estadio, se iniciaron los experimentos para determinar la producción de valenceno.

Se analizaron adicionalmente tres placas de pBIN-ValC y tres plantas de pBINPLUS. Para cada planta, se pesaron tres hojas de *N. benthamiana* recién cortadas de 0,4 a 1,0 g, y se colocaron los extremos cortados en un vaso de precipitados de 4 ml cubierto con papel de aluminio y que contenía 3 ml de agua. Cada vaso de precipitados con una hoja se colocó en un recipiente de vidrio sellado de 0,5 litros separado. Las hojas se incubaron después a 21 °C en un régimen de luz de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Se usó una bomba de vacío para extraer aire a través

del recipiente de vidrio a aproximadamente 100 ml/min, purificándose el aire entrante a través de cartuchos absorbentes de acero (89 mm x 6,4 mm de D.E.; Markes) que contenía 200 mg de Tenax TA 20/35. En la salida, los volátiles emitidos por las hojas desprendidas se atraparon en un cartucho similar. Se recogieron volátiles durante 24 h. Los cartuchos de salida se eluyeron usando 3 veces 1 ml de pentano:dietil éter (4:1). Las muestras no concentradas se deshidrataron usando Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhídrido, y se analizaron por GC-MS usando un cromatógrafo de gases (5890 series II, Hewlett-Packard) equipado con una columna de 30 m x 0,25 mm, grosor de película de 0,25 mm (5MS, Hewlett-Packard) y un detector selectivo de masas (modelo 5972A, Hewlett-Packard). Para análisis, se inyectó 1 µl, y la temperatura de columna se aumentó de 45 °C a 280 °C en 20 minutos. Se inyectó una serie de soluciones patrón de valenceno en pentano : étil-éter (80:20 v/v) para referencia y cuantificación. Se descubrió que el valenceno se eluía a 13,87 minutos, y se identificó en el espacio vacío de la planta por comparación con el espectro de masas y el tiempo de retención del patrón. La cantidad de valenceno emitido se cuantificó para cada planta promediando los microgramos emitidos de valenceno por g de hoja por cada 24 horas. Aunque las plantas pBINPLUS no emitieron ningún valenceno detectable, las tres plantas pBIN-ValC emitieron (+) valenceno a 0,51, 0,63 o 0,48 µg de valenceno por g de hoja por 24 horas, respectivamente. Esto demostró la capacidad de ValC para mediar en la producción de valenceno en plantas.

## SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1  
*valC-short*  
*Chamaecyparis noothatensis*  
 Secuencia de nucleótidos

ATGCCCGTGAAGGACGCCCTTCGTCGGACTGGAATCATCATCCTAACTTGTGGACTGAT  
 GATTTTCATACAGTCCCTCAATTCTCCATATTCCGATTCTTCATACCATAAACATAGGGAAA  
 TACTAATTGATGAGATTTCGTGATATGTTTTCTAATGGAGAAGGCGATGAGTTCGGTGTACT  
 TGAAAATATTTGGTTTGTGATGTTGTACAACGTTTGGGAATAGATCGACATTTTCAAGAG  
 GAAATCAAACTGCACCTGATTATATCTACAAGTTCTGGAATCATGATAGTATTTTGGCG  
 ATCTCAACATGGTGGCTCTAGGATTTCCGATACTACGACTGAATAGATATGTCGCTTCTTC  
 AGATGTTTTTAAAAAGTTCAAAGGTGAAGAAGGACAATTCTCTGGTTTTGAATCTAGCGAT  
 CAAGATGCAAAATAGAAATGATGTTAAATTTATATAAAGCTTCAGAATTAGATTTTCTCG  
 ATGAAGATATCTTAAAAGAAGCAAGAGCGTTTGGCTTCTATGTACCTGAAACATGTTATCAA  
 AGAATATGGTGACATACAAGAATCAAAAAATCCACTTCTAATGGAGATAGAGTACACTTTT  
 AAATATCCTTGGAGATGTAGGCTTCCAAGGTTGGAGGCTTGGAACTTTATTCATATAATGA  
 GACAACAAGATTGCAATATATACACTTGCCTTCAATAAACCTTTATAAAAATTCAAAAATATAT  
 GAAAAAGATATTGGAAGTACTAGCAATACTGGACTTCAATATTTTGCAGTCAACAACATCAACAT  
 GAAATGAAATTAATATCCACATGGTGGAAAAATTCAAGTGCAATTCAAATTGGATTTCTTTC  
 GGCATCGTCCATAGAAAAGTTATTTTTGGTGGGCTAGTCCATTATTTGAACCTGAGTTCAG  
 TACATGTAGAATTAATTTGTACCAAAATTATCTACAAAAATGTTCCCTCCTTGACGATATTTATG  
 ACACATATGGGACTGTTGAGGAATTGAAACCATTCAACAACAATTAAACAAGATGGGATG  
 TTTCCACAGTTGATAATCATCCAGACTACATGAAAATTGCTTTCAATTTTTCATATGAGATA  
 TATAAGGAAATTGCAAGTGAAGCCGAAAGAAAGCATGGTCCCTTTGTTTACAAATACCTTC  
 AATCTTGCTGGAAGAGTTATATCGAGGCTTATATGCAAGAAGCAGAATGGATAGCTTCTA  
 ATCATATAACCAGTTTTGATGAATACTTGATGAATGGAGTAAAAAGTAGCGGCATGCGAA  
 TTCTAATGATACATGCACTAATACTAATGGATACTCCTTTATCTGATGAAATTTTGGAGCA  
 ACTTGATATCCCATCATCCAAGTCGCAAGCTCTTCTATCATTAACTCGACTAGTGGAT  
 GATGTCAAAGACTTTGAGGATGAACAAGCTCATGGGGAGATGGCATCAAGTATAGAGTGC  
 TACATGAAAGACAACCATGGTTCTACAAGGGAAGATGCTTTGAATTATCTCAAAATTCGTA  
 TAGAGAGTTGTGTGCAAGAGTTAAATAAGGAGCTTCTCGAGCCTTCAAAATATGCATGGAT  
 CTTTGTAGAAACCTATATCTCAATGTTGGCATGCGAGTAATATTTTTTATGCTCAATGATGG  
 TGATCTCTTACACACTCCAATAGAAAAGAGATACAAGATGCAATAACAAAATTTTTTGTG  
 GAACCAATCATTCCATAG

SEQ ID NO: 2  
*ValC-short*  
*Chamaecyparis noothatensis*  
 Secuencia de aminoácidos

MPVKDALRRTGNHHPNLWTDFFIQSLNSPYSDSSYHKHREILIDEIRDMFSNGEGDEFGVL  
 ENIWFVDVVQRLGIDRHFQEEIKTALDYIKFWNHDSIFGDLNMVALGFRILRLNRYVASS  
 DVFKKFKGEEGQFSGFESSDQDAKLEMMLNLYKASELDFPDEDILKEARAFASMYLKHVI  
 KEYGDIQESKNPLLMEIEYTFKYPWRCRLRLEAWNFIHIMRQQDCNISLANNLYKIPKIY  
 MKKILELAILDFNILQSQHQHEMKLISTWWWKNSSAIQLDFFRHRHIESYFWWASPLFEPEF  
 STCRINCTKLSTKMFLDDIYDTYGTVEELKPFTTTLTRWDVSTVDNHPDYMKIAFNFSYEI  
 YKEIASEAERKHGPFVYKYLQSCWKSYIEAYMQEAEWIASNHIPGFDEYLMNGVKSSGMRI  
 LMIHALILMDTPLSDEILEQLDIPSSKSQALLSLITRLVDDVKDFEDEQAHGEMASSIECYM  
 KDNHGSTREDALNYLKIRIESCVQELNKELLEPSNMHGSFRNLYLNVGMRVIFFMLNDGD  
 LFTHSNRKEIQDAITKFFVEPIIP

SEQ ID NO: 3

*valC*

- 5 *Chamaecyparis nootkatensis*  
 Secuencia de nucleótidos

ATGGCTGAAATGTTTAATGGAAATTCAGCAATGATGGAAGTTCTTGATGCCCGTGAAG  
 GACGCCCTTCGTCGGACTGGAAATCATCATCCTAACTGTGGACTGATGATTTACATACAGT  
 CCTCAATTCTCCATATTCGGATTCTTCATACCATAAACATAGGGAAATACTAATTGATGA  
 GATTCGTGATATGTTTTCTAATGGAGAAGGCGATGAGTTCGGTGTACTTGAAAATATTTGG  
 TTTGTTGATGTTGTACAACGTTTGGGAATAGATCGACATTTTCAAGAGGAAATCAAAACTG  
 CACTTGATTATATCTACAAGTTCTGGAATCATGATAGTATTTTTGGCGATCTCAACATGGT  
 GGCTCTAGGATTCGGATACTACGACTGAATAGATATGTCGCTTCTTCAGATGTTTTAAA  
 AAGTTCAAAGGTGAAGAAGGACAATTCTCTGTTTTGAATCTAGCGATCAAGATGCAAAA  
 TTAGAAATGATGTTAAATTTATATAAAGCTTCAGAATTAGATTTTCCTGATGAAGATATCTT  
 AAAAGAAGCAAGAGCGTTTGCTTCTATGTACCTGAAACATGTTATCAAAGAATATGGTGAC  
 ATACAAGAATCAAAAAATCCACTTCTAATGGAGATAGAGTACACTTTTAAATATCCTTGGA  
 GATGTAGGCTTCCAAGGTTGGAGGCTTGAACTTTATTCATATAATGAGACAACAAGATT  
 GCAATATATCACTTGCCAATAACCTTTTAAAAATTCAAAAATATATGAAAAAGATATT  
 GGAAGTACAACTGACTTCAATATTTTGCAGTCACAACATCAACATGAAATGAAATTA  
 ATATCCACATGGTGGAAAAATTCAGTGCAATTCAAATGGATTTCTTTCGGCATCGTCACA  
 TAGAAAGTTATTTTTGGTGGGCTAGTCCATTATTTGAACCTGAGTTCAGTACATGTAGAAT  
 TAATTGTACCAAATTATCTACAAAAATGTTCCCTCCTTGACGATATTTATGACACATATGGG  
 ACTGTTGAGGAATTGAAACCATTCACAACAACATTAACAAGATGGGATGTTTCCACAGTTG  
 ATAATCATCCAGACTACATGAAAATGCTTTCAATTTTTTCATATGAGATATATAAGGAAAT  
 TGCAAGTGAAGCCGAAAGAAAGCATGGTCCCTTTGTTTACAAATACCTTCAATCTTGCTGG  
 AAGAGTTATATCGAGGCTTATATGCAAGAAGCAGAATGGATAGCTTCTAATCATATACCAG  
 GTTTTGATGAATACTTGATGAATGGAGTAAAAAGTAGCGGCATGCGAATTCTAATGATACA  
 TGCACTAATACTAATGGATACTCCTTTATCTGATGAAATTTTGGAGCAACTTGATATCCCA  
 TCATCCAAGTCGCAAGCTTCTATCATTAATTACTCGACTAGTGGATGATGTCAAAGACT  
 TTGAGGATGAACAAGCTCATGGGGAGATGGCATCAAGTATAGAGTGCTACATGAAAAGACA  
 ACCATGGTTCTACAAGGGAAGATGCTTTGAATTATCTCAAATTCGTATAGAGAGTTGTGT  
 GCAAGAGTTAAATAAGGAGCTTCTCGAGCCTTCAAATATGCATGGATCTTTTAGAAACCTA  
 TATCTCAATGTTGGCATGCGAGTAATTTTTTATGCTCAATGATGGTGATCTCTTTACAC  
 ACTCCAATAGAAAAGAGATACAAGATGCAATAACAAAAATTTTTTGTGGAACCAATCATTCC  
 ATAG

10 SEQ ID NO: 4

*ValC*

- Chamaecyparis nootkatensis*  
 Secuencia de aminoácidos

MAEMFNGNSSNDGSSCMPVKDALRRRTGNHHPNLWTDDEFIQLNSPYSDSSYHKHREILID  
 EIRDMFNSNGEGDEFGVLENIWFVDVVQRLGIDRHFQEEIKTALDYIKFWNHDSIFGDLNM  
 VALGFRILRLNRYVASSDVFKKFKGEEGQFSGFESSDQDAKLEMMLNLYKASELDFPDEDI  
 LKEARAFASMYLKHVIKEYGDIQESKNPLLMEIEYTFKYPWRCRLPRLEAWNFIHIMRQQD  
 CNISLANNLYKIPKIYMKKILELAILDFNILQSQHQHEMKLSTWWKNSSAIQLDFFRHRHI  
 ESYFWWASPLFEPEFSTCRINCTKLSTKMFLDDIYDTYGTVEELKPFTTTLTRWDVSTVD  
 NHPDYMKIAFNFSYEIYKEIASEAERKHGPFVYKYLQSCWKS YEAYMQEAEWIASNHIPG  
 FDEYLMNGVKSSGMRILMIHALILMDTPLSDEILEQLDIPSSKSQALLSLITRLVDDVKDFED  
 EQAHGEMASSIECYMKDNHGSTREDALNLYLKIRIESCVQELNKELLEPSNMHGSFRNLYL  
 NVGMRVIFMFLNDGDLFTHSNRKEIQDAITKFFVEPIIP

SEQ ID NO: 5

*valC-directo*

5 Cebador

Secuencia de nucleótidos

ATATAGGATCCGGCTGAAATGTTTAATGGAATTCCAGC

SEQ ID NO: 6

*valC-inverso*

10 Cebador

Secuencia de nucleótidos

ATATACTGCAGCTCTGGATCTATGGAATGATTGGTTCCAC

SEQ ID NO: 7

*valF*

15

Gen sintético (codones optimizados)

Secuencia de nucleótidos

ATGTCGAGCGGCGAGACCTTCCGCCCCACGGCCGACTTCCATCCGTCCCTCTGGCGGAAC  
 CACTTCTCAAGGGGGCCTCCGATTTCAAGACCGTGGACCATACGGCGACGCAGGAACGG  
 CACGAGGCCCTCAAGGAGGAGGTCCGCCGATGATCACCGACGCCGAAGACAAGCCGGT  
 CCAGAAGCTCCGCTGATCGACGAGGTCCAGCGCCTGGGCGTGGCGTATCATTTGAGAA  
 AGAAATCGAGGATGCGATCCAGAAGCTCTGCCGATCTATATCGATAGCAATCGCGCCGA  
 TCTCCATACCGTGTGCTGCACTTCCGCTGCTGCGGCAGCAGGGCATCAAGATCAGCTG  
 CGACGTGTTGAAAAGTTCAAGGACGACGAGGGCCGCTTCAAGTCGTGCTGATCAACGA  
 CGTGCAGGGCATGCTGCTGCTGACGAGGCCGCTACATGGCCGTGCGCGGCGAGCATA  
 TCCTGGACGAAGCCATCGCGTTCACGACCACGCATCTGAAGTCGCTGGTGGCGCAGGACC  
 ACGTGACGCCGAAGCTCGCCGAGCAGATCAACCACGCGCTGTATCGGCCGCTCCGCAAGA  
 CCCTCCCGCGCCTCGAGGCCGCTATTTTCATGAGCATGATCAACTCGACCTCGGATCACC  
 TGTACAATAAGACCCTGCTCAACTTCGCGAAACTGGACTTCAATATCCTCCTCGAGCTGCA  
 CAAGGAGGAGCTCAACGAGCTGACCAAGTGGTGGAAGGATCTGGACTTCAACCAAGCT  
 GCCGTACGCCCGCGCTCGCCTCGTGAGCTGTATTTCTGGGACCTGGGCACCTACTTCA  
 ACCCCAGTACGCCTTCGGGCGGAAGATCATGACCCAGCTCAATTATATCCTCAGCATCAT  
 CGACGACACCTATGACGCGTACGGCAGCTGGAGGAGCTGTCCCTGTTACGGAAGCCGT  
 CCAGCGGTGGAACATCGAGGCCGTCGACATGCTCCCGAGTACATGAAACTGATCTACCG  
 GACCCTGCTGGATGCCTTCAACGAGATCGAGGAGGACATGGCGAAACAGGGCCGGTCCC  
 ACTGCGTGCGCTACGCGAAGGAAGAGAACCAGAAGGTCATCGGCGCCTACTCGGTCCAG  
 GCGAAGTGTTTACGCGAGGGCTATGTGCCGACGATCGAGGAATATATGCCGATCGCGCTC  
 ACCTCGTGCGCGTACACGTTTCTGATCACCAATTCGTTCTCGGCATGGGCGATTTTCGCG  
 ACCAAGGAGGTCTTCGAGTGGATCAGCAACAATCCGAAGGTGGTGAAGGCGGCCTCGGT  
 CATCTGCCGGCTCATGGATGACATGACGGGGCATGAGTTCGAACAGAAGCGCGGCCACGT  
 CGCGTCCGCCATCGAGTGTATACCAAGCAGCATGGCGTGTGGAAGGAGGAGGCCATCAA  
 GATGTTTCGAGGAGGAAGTCGCCAACGCGTGGAAAGGACATCAATGAGGAGCTGATGATGA  
 AGCCCACCGTCTGTCGCCCGCCCCCTGCTGGGCACCATCCTGAACCTCGCCCGGCCATCG  
 ACTTCATCTACAAGGAGGACGATGGGTATACGCATTCCTATCTGATCAAGGACCAGATCG  
 CCTCGGTCTCGGCGATCATGTCCCGTTCTGATAA

20

SEQ ID NO: 8

*valFpoR*

25

Gen sintético (codones optimizados)

Secuencia de nucleótidos

ATGAGCTCGGGCGAGACCTTCCGCCCGACCGCCGATTTCCATCCCTCGCTCTGGCGCAAC  
 CATTTCTGAAGGGCGCCTCCGACTTCAAGACCGTCGATCACACGGCCACCCAGGAGCGC  
 CACGAGGCGCTGAAGGAAGAGGTGCGCCGGATGATCACCGACGCGGAGGACAAGCCGGT  
 GCAGAAGCTGCGGCTGATCGACGAGGTGCAGCGTCTCGGCGTGGCCTATCACTTCGAGAA  
 GGAGATCGAGGATGCGATCCAGAAGCTCTGCCCGATCTACATCGACAGCAACCGCGCCGA  
 TCTGCACACGGTCTCGCTGCATTTCCGGCTGCTGCGCCAGCAGGGCATCAAGATCTCCTG  
 CGACGTCTTCGAGAAGTTCAAGGACGACGAGGGCCGCTTCAAGTCCTCGCTGATCAACGA  
 CGTGCAGGGGATGCTGTGCTCTACGAGGCGGCCTACATGGCGGTGCGCGGCGAGCATA  
 TCCTCGACGAGGCGATCGCCTTACCACCACCCATCTGAAATCGCTCGTGGCGCAGGACC  
 ATGTCACGCCGAAGCTCGCCGAGCAGATCAACCATGCGCTCTACCGCCCGCTGCGCAAGA  
 CGCTGCCGCGGCTCGAGGCGCGCTATTTTCATGTCGATGATCAACTCGACCTCGGACCATC  
 TCTACAACAAGACGCTGCTGAACTTCGCCAAGCTCGACTTCAACATCCTGCTCGAGCTGC  
 ACAAGGAAGAGCTGAACGAGCTGACGAAATGGTGGAAAGGATCTCGACTTACCACCAAGC  
 TGCCCTATGCGCGGACCGGCTGGTTCGAGCTCTATTTCTGGGATCTCGGCACCTATTTTCG  
 AGCCGAGTATGCTTCCGGCCGCAAGATCATGACCCAGCTGAACTACATCCTCTCGATCA  
 TCGACGACACCTACGACGCTACGGCAGCTGGAAGAGCTGTCGCTCTTACCAGGCGG  
 TGCAGCGCTGGAACATCGAGGCGGTCGACATGCTGCCGGAATACATGAAGCTGATCTACC  
 GCACGCTGCTCGATGCCCTTCAACGAGATCGAGGAAGACATGGCGAAACAAGGGCGCAGC  
 CACTGCGTGGCTATGCCAAGGAAGAGAACCAGAAGGTCATCGGCGCCTATTCGGTCCAG  
 GCGAAATGGTTCTCGGAAGGCTATGTCCCACGATCGAGGAATACATGCCGATCGCGCTG  
 ACCTCCTGCGCCTATACCTTCGTCATCACCAACAGCTTCTCGGCATGGGCGACTTCGCCA  
 CCAAGGAAGTCTTCGAATGGATCTCGAACAACCCGAAGGTGCTCAAGGCGGCCTCGGTCA  
 TCTGCCGGCTGATGGACGACATGCAGGGCCACGAGTTCGAGCAGAAGCGCGGCCATGTC  
 GCCTCGGCCATCGAATGCTACACCAAGCAGCACGGCGTCTCGAAGGAAGAGGCGATCAA  
 GATGTTTCAAGAGGAAGTGGCCAATGCCTGGAAGGACATCAACGAGGAACTGATGATGAA  
 GCCCACCCTCGTGGCCCGTCCGCTGCTCGGCACGATCCTGAACCTCGCCCGCGCCATCGA  
 CTTTCATCTACAAGGAAGACGACGGCTATACCCATTCTATCTGATCAAGGACCAGATCGC  
 CTCGGTCTCGGCGACCATGTGCCTTTCATTAATTGATAA

5 SEQ ID NO: 9  
 ValFpoR  
*Citrus x paradisi*  
 Secuencia de aminoácidos

MSSGETFRPTADFHPSLWRNHFLKGASDFKTV DHTATQERHEALKEEVRRMITDAEDKPV  
 QKLRLIDEVQRLGVAYHFEKEIEDAIQKLCPIYIDSNRADLHTVSLHFRLLRQQGIKISCDVF  
 EKFKDDEGRFKSSLINDVQGMLSLYEAAYMAVRGEHILDEAIAFTTHLKSVAQDHVTPK  
 LAEQINHLYRPLRKTLPRLARYFMSMINSTSDHLYNKTLNFAKLDFNILLELHKEELN  
 ELTKWWDLDFTTKLPYARDRLVELYFWDLGTYFEPQYAFGRKIMTQLNYILSIIDDTYDA  
 YGTLEELSLFTEAVQRWNIEAVDMLPEYMKLIYRTLLDAFNEIEEDMAKQGRSHCVRYAKE  
 ENQKVIGAYSVQAKWFSEGYVPTIEEYMPIALTSCAYTFVITNSFLGMGDFATKEVFEWISN  
 NPKVVKAASVICRLMDDMQGHEFEQKRGHVASAIECYTKQHGVSKEEAIKMFEEEVANA  
 WKDINEELMMKPTVVARPLLG TILNLARAIDFIYKEDDGYTHSYLIKDQIASVLGDHVPFIN

10 SEQ ID NO: 10  
*mbp-valFpoR*  
 Gen sintético  
 Secuencia de nucleótidos

15

ATGAAGATCGAGGAAGGCAAGCTCGTCATCTGGATCAACGGCGACAAGGGCTACAACGG  
 CCTCGCCGAGGTGGGCAAGAAGTTCGAGAAGGACACGGGCATCAAGGTCACCGTTCGAGC  
 ATCCCAGACAAGCTCGAGGAGAAGTTCGCGAGGTCGCGCCACCGGCGACGGCCCCGAC  
 ATCATCTTCTGGGCCACGACCGCTTCGGCGGCTATGCGCAGTCGGGCCCTGCTCGCCGAG  
 ATCACGCCCCGACAAGGCCTTCCAGGACAAGCTCTATCCCTTACCTGGGATGCGGTGCGC  
 TACAACGGCAAGCTGATCGCCTATCCGATCGCCGTCGAGGCGCTGTGCTGATCTACAAC  
 AAGGATCTGCTGCCGAACCCGCGGAAGACCTGGGAAGAGATCCCGGCGCTCGACAAGGA  
 ACTGAAGGCCAAGGGCAAGTCCGCGCTGATGTTCAACCTGCAGGAGCCCTATTTACCTG  
 GCCGCTGATCGCCGCGACGCGGCTATGCCTTCAAATACGAGAACGGCAAATACGACAT  
 CAAGGACGTGGGCTCGACAATGCGGGCGCCAAGGCCGGGCTGACCTTCTCGTTCGATC  
 TGATCAAGAACAAGCACATGAATGCCGACACCGACTATTCCATCGCCGAGGCGGCCTTCA  
 ACAAGGGCGAGACCGCCATGACGATCAACGGGCCGTTGGCCTGGTGAACATCGACACC  
 TCGAAGGTCAATTACGGCGTACGGTGTGCGGACCTTCAAGGGCCAGCCCTCGAAACCC  
 TTCGTCGGCGTGTGCTGTCGGCGGGCATCAACGCGGCCTCGCCGAACAAGGAACTCGCCAA  
 GGAGTTCTCGAGAACTACCTGCTGACCGACGAGGGGCTCGAGGCGGTGAACAAGGACA  
 AGCCGCTCGGCGCGGTGGCGTGAATCCTACGAGGAAGAGCTCGTCAAGGACCCGCGG  
 ATCGCCGCCACGATGGAGAATGCGCAGAAGGGCGAGATCATGCCGAACATCCCGCAGAT  
 GTCGGCCTTCTGGTATGCCGTCCGACCGCGGTGATCAACGGGCCTCGGGCCGTGACAC

CGTCGACGAGGCGCTGAAGGATGCGCAGACTGGTGTGACGACGACAAGATTAATAGCTC  
 GGGCGAGACCTTCCGCCGACCGCCGATTTCCATCCCTCGCTCTGGCGCAACCATTTCCT  
 GAAGGGCGCCTCCGACTTCAAGACCGTCGATCACACGGCCACCCAGGAGCGCCACGAGG  
 CGCTGAAGGAAGAGGTGCGCCGGATGATCACCGACGCGGAGGACAAGCCGGTGCAGAAG  
 CTGCGGCTGATCGACGAGGTGCAGCGTCTCGGCGTGGCCTTACTTCGAGAAGGAGATC  
 GAGGATGCGATCCAGAAGCTCTGCCGATCTACATCGACAGCAACCGCGCCGATCTGCAC  
 ACGGTCTCGCTGCATTTCCGGCTGCTGCGCCAGCAGGGCATCAAGATCTCCTGCGACGTC  
 TTCGAGAAGTTCAGGACGACGAGGGCCGCTTCAAGTCTCCTCGCTGATCAACGACGTGCAG  
 GGGATGCTGCTGCTTACGAGGCGGCCTACATGGCGGTGCGCGGCGAGCATATCCTCGA  
 CGAGGGGATCGCCTTACCACCACCATCTGAAATCGCTCGTGGCGCAGGACCATGTACAC  
 GCCGAAGCTCGCCGAGCAGATCAACCATGCGCTTACCGCCCGCTGCGCAAGACGCTGCC  
 GCGGCTCGAGGCGCGCTATTTTCATGTGCGATGATCAACTCGACCTCGGACCATCTCTACAA  
 CAAGACGCTGCTGAACTTCGCCAAGCTCGACTTCAACATCCTGCTCGAGCTGCACAAGGA  
 AGAGCTGAACGAGCTGACGAAATGGTGAAGGATCTCGACTTCAACCAAGCTGCCCTA  
 TGCGCGGACCGGCTGGTTCGAGCTCTATTTCTGGGATCTCGGCACCTATTTTCGAGCCGCA  
 GTATGCCTTCGGCCGCAAGATCATGACCCAGCTGAACTACATCCTCTCGATCATCGACGA  
 CACCTACGACGCTACGGCAGCTGGAAGAGCTGTGCTCTTCAACCGAGGCGGCTGCAGCG  
 CTGGAACATCGAGGCGGTGACATGCTGCCGGAATACATGAAGCTGATCTACCGCACGCT  
 GCTCGATGCCTTCAACGAGATCGAGGAAGACATGGCGAAAACAAGGGCGCAGCCACTGCG  
 TCGCTATGCCAAGGAAGAGAACCAGAAGGTCATCGGCGCCTATTCGGTCCAGGCGAAAT  
 GGTTCGGAAGGCTATGTCCCACGATCGAGGAATACATGCCGATCGCGCTGACCTCCT  
 GCGCCTATACCTTCGTCATCACCAACAGCTTCTCCTCGGCATGGGCGACTTCGCCACCAAGG  
 AAGTCTTCGAATGGATCTCGAACAACCCGAAGGTGTCGAAGGCGGCCTCGGTTCATCTGCC  
 GGCTGATGGACGACATGCAGGGCCACGAGTTCGAGCAGAAGCGCGGCCATGTGCTCCTCG  
 GCCATCGAATGCTACACCAAGCAGCACGGCGTCTCGAAGGAAGAGGCGATCAAGATGTT  
 GAAGAGGAAGTGGCCAATGCTGGAAGGACATCAACGAGGAACTGATGATGAAGCCCAC  
 CGTCGTGGCCCGTCCGCTGCTCGGCACGATCCTGAACCTCGCCGCGCCATCGACTTCAT  
 CTACAAGGAAGACGACGGCTATACCATTCCCTATCTGATCAAGGACCAGATCGCCTCGGT  
 CCTCGGCGACCATGTGCCTTTCATTAATTGATAA

SEQ ID NO: 11

MBP-ValFpoR

5 Proteína de fusión de MBP de *E. coli* y ValFpoR de *Citrus x paradisi*  
 Secuencia de aminoácidos



MKIEEGKLVIIWINGDKGYNGLAEVGKKFEKDTGIKVTVEHPDKLEEKFPQVAATGDGPDII  
FWAHDRFGGYAQSGLLAEITPDKAFQDKLYPFTWDAVRYNGKLIAYPIAVEALSLIYNKDL  
LPNPPKTWEEIPALDKELKAKGKSALMFNLQEPYFTWPLIAADGGYAFKYENKDYDIKDV  
GVDNAGAKAGLTFLVDLIKNKHMNADTDYSLAEAAFNKGETAMTINGPWAWSNIDTSKVN  
YGVTVLPTFKGQPSKPFVGVLSAGINAASPNKELAKEFLENYLLTDEGLEAVNKDKPLGAV  
ALKSYEEELVKDPRIAATMENAQKGEIMPNIQMSAFWYAVRTAVINAASGRQTVDEALKD  
AQTGDDDDKINSSGETFRPTADFHPSLWRNHFLKGASDFKTV DHTATQERHEALKEEVR  
MITDAEDKPVQKLRLIDEVQRLGVAYHFEKEIEDAIQKLCPIYIDSNRADLHTVSLHFLLR  
QQGIKISCDVFEKFKDDEGRFKSSLINDVQGMLSLYEAAAYMAVRGEHILDEALAFTHLKS  
LVAQDHVTPKLAEQINHALYRPLRKTLPRLRLEARYFMSMINSTSDHLYNKTLNFAKLDENI  
LLELHKEELNELTKWWKDLDFTTKLPYARDRLVELYFWDLGTYFEPQYAFGRKIMTQLNY  
ILSIIDDTYDAYGTLEELSLFTEAVQRWNIEAVDMLPEYMKLIYRTLLDAFNEIEEDMAKQG  
RSHCVRYAKEENQKVIGAYSVQAKWFSEGYVPTIEEYMPIALTSCAYTFVITNSFLGMGDF  
TKEVFEWISNNPKVKAASVICRLMDDMQGHEFEQKRGHVASAIECYTKQHGVSKEEAIK  
MFEEEVANAWKDINEELMMKPTVVARPLLGTILNLARAIIDFIYKEDDGYTHSYLIKDIASV  
LGDHVPPFIN

SEQ ID NO: 12

*nusA-valFpoR*

5 Gen sintético  
Secuencia de nucleótidos

ATGAACAAGGAGATCCTGGCCGTCGTCGAGGCGGTCTCGAACGAGAAGGCGCTGCCGCG  
CGAGAAGATCTTCGAGGCGCTGGAATCCGCGCTGGCCACCGCCACCAAGAAGAAATACGA  
GCAGGAGATCGACGTGCGCGTGCAGATCGACAGGAAATCCGGCGACTTCGACACCTTCCG  
CCGCTGGCTCGTCGTCGACGAGGTACGCGAGCCGACCAAGGAGATCACGCTCGAGGCGG  
CCCGCTACGAGGACGAGAGCCTGAACCTCGGCGACTATGTCGAGGATCAGATCGAGAGC  
GTCACCTTCGACCGGATCACACGCAGACCGCCAAGCAGGTCATCGTGCAGAAGGTCCGC  
GAGGCCGAGCGGGCGATGGTCGTCGATCAGTTCGCGAGCACGAGGGCGAGATCATCAC  
CGGCGTGGTGAAGAAGGTCAACCGCGACAACATCTCGCTCGATCTCGGCAACAATGCCGA  
GGCGGTGATCCTGCGCGAGGACATGCTGCCGCGCGAGAACTTCGCCCCGGGCGACCGGG  
TGCGCGGCGTGTCTATTCCGTCCGTCCCGAGGCGCGCGGCGCGCAGCTCTTCGTCACCC  
GCTCGAAGCCCGAGATGCTGATCGAGCTGTTCCGCATCGAGGTGCCCGAGATCGGCGAG  
GAAGTGATCGAGATCAAGGCCGCGGCCCGCGACCCGGGCTCGCGCGCCAAGATCGCCGT  
CAAGACCAACGACAAGCGGATCGACCCGGTGGGCGCCTGCGTGGGCATGCGCGGCGCGC  
GGGTGCAGGCCGTCCTCGACCGAGCTCGGCGGCGAGCGGATCGACATCGTGTCTTGGGAC  
GACAATCCGGCGCAGTTCGTCATCAATGCCATGGCGCCCGCCGACGTGGCCTCGATCGTC  
GTCGACGAGGACAAGCACACGATGGACATGCGCGTTCGAGGCGGGCAACCTCGCGCAGG  
CATCGGCCGACAACGCGAGAACGTGCGGCTGGCCTCGCAGCTCTCGGGCTGGGAGCTGA  
ACGTGATGACCGTCGACGATCTGCGAGCCAAGCACCAGGCGAGGCCATCGCGCCATC  
GACACCTTCACCAAATATCTCGACATCGACGAGGATTTCCGCCACGGTTCTCGTCAAGAG  
GGCTTCTCGACGCTGGAAGAGCTGGCCTATGTGCCGATGAAGGAACTGCTCGAGATCGAG  
GGGCTCGACGAGCCGACCGTCGAGGCGCTGCGCGAGCGCGCCAAGAACGCGCTGGCCAC  
CATCGCGCAGGCGCAGGAAGAGAGCCTCGGCGACAACAAGCCCGCCGACGATCTGCTGA  
ACCTCGAGGGCGTCGACCGCGACCTGGCCTTCAAGCTGGCCGCGCGCGGCGTCTGCACG  
CTCGAGGATCTGGCCGAGCAGGGCATCGACGATCTGGCCGACATCGAGGGGCTGACCGA  
CGAGAAGGCGGGCGCGCTGATCATGGCCGCCGCAACATCTGCTGGTTCGGCGACGAAG  
GTGATGACGACGACAAGATTAATAGCTCGGGCGAGACCTTCCGCCCGACCGCCGATTTCC  
ATCCCTCGCTCTGGCGCAACCATTTCTGAAGGGCGCCTCCGACTTCAAGACCGTTCGATC  
ACACGGCCACCCAGGAGCGCCACGAGGCGCTGAAGGAAGAGGTGCGCCGGATGATCACC  
GACGCCGAGGACAAGCCTGGTGCAGAAGCTGCGGCTGATCGACGAGGTGCAGCGTCTCG  
CGTGGCCTATCACTTCGAGAAGGAGATCGAGGATGCGATCCAGAAGCTCTGCCCGATCTA  
CATCGACAGTCAACCGCGCGATCTGACACGCTGCTCGCTGCATTTCCGGCTGCTGCCCA  
GCAGGGCATCAAGATCTCCTGCGACGCTTTCGAGAAGTTCAAGGACGACGAGGGCCGCTT  
CAAGTCTCGCTGATCAACGACGTGCAGGGATGCTGTGCTCTACGAGGCGGCCTACAT  
GGCGGTGCGCGGCGAGCATATCCTCGACGAGGCGATCGCCTTACCACCACCCATCTGAA  
ATCGCTCGTGGCGCAGGACCATGTCAACGCGAAGCTCGCCGAGCAGATCAACCATGCGCT  
CTACCGCCCCTGCGCAAGACGCTGCCGCGGCTCGAGGCGCGCTATTTTCATGTGATGAT  
CAACTCGACCTCGGACCATCTCTACAACAAGACGCTGCTGAACTTCGCCAAGCTCGACTT  
CAACATCCTGCTCGAGCTGCACAAGGAAGAGCTGAACGAGCTGACGAAATGGTGGAAAG  
ATCTCGACTTACCACCAAGCTGCCCTATGCGCGCACCGGCTGGTTCGAGCTCTATTTCT  
GGGATCTCGGCACCTATTTTCGAGCCGAGTATGCCTTCGGCCGCAAGATCATGACCCAGC  
TGAACATACATCCTCTCGATCATCGACGACACCTACGACGCCCTACGGCACGCTGGAAGAGC  
TGTCGCTCTTACCGAGGCGGTGCAGCGCTGGAACATCGAGGCGGTTCGACATGCTGCCG  
GAATACATGAAGCTGATCTACCGCACGCTGCTCGATGCCCTTCAACGAGATCGAGGAAGAC  
ATGGCGAAACAAGGGCGCAGCCACTGCGTGGCTATGCCAAGGAAGAGAACCAGAAGGT  
CATCGGCGCCTATTCGGTCCAGGCGAAATGGTTCGGAAGGCTATGTCCCACGATCGA  
GGAATACATGCCGATCGCGCTGACCTCCTGCGCCTATACCTTCGTCATCACCAACAGCTTC  
CTCGGATGGCGACTTCGCCACCAAGGAAGTCTTCAATGGATCTCGAACAACCCGAAG  
GTCGTCAAGGCGGCCTCGGTCATCTGCCGCTGATGGACGACATGCAGGGCCACGAGTTC  
GAGCAGAAGCGCGGCCATGTCGCTCGGCCATCGAATGCTACACCAAGCAGCACGGCGT  
CTCGAAGGAAGAGGCGATCAAGATGTTCAAGAGGAAGTGGCCAATGCCTGGAAGGACA  
TCAACGAGGAACTGATGATGAAGCCCACCGTCTGGCCCGTCCGCTGCTCGGCACGATCC  
TGAACCTCGCCCGCGCCATCGACTTCATCTACAAGGAAGACGACGGCTATAACCATTCT

ATCTGATCAAGGACCAGATCGCCTCGGTCTCGGCGACCATGTGCCTTTCATTAAATTGATA  
A

SEQ ID NO: 13  
NusA-ValFpoR

5 Proteína de fusión de NusA de *E. coli* y ValFpoR de *Citrus x paradisi*

Secuencia de aminoácidos

MNKEILAVVEAVSNEKALPREKIFEALESALATATKKKYEQEIDVRVQIDRKSDFDFTFR  
 WLVVDEVTPQTKETLEAARYEDESLESLNLDYVEDQIESVTFDRITQTAKQVIVQKVREAER  
 AMVVDQFREHEGEIITGVVKKVNRDNISLDLGNNAEAVILREDMLPRENFRPGDRVRGVLY  
 SVRPEARGAQLFVTRSKPEMLIELFRIEVPEIGEEVIEIKAAARDPGSRAKIAVKTNDKRIDP  
 VGACVGMRGARVQAVSTELGGERIDIVLWDDNPAQFVINAMAPADVASIVVDEDKHTMDI  
 AVEAGNLAQAIGRNGQNVRLASQLSGWELNVMTVDDLQAKHQAEAHAAIDTFTKYLDIDE  
 DFATVLVEEGFSTLEELAYVPMKELLEIEGLDEPTVEALRERAKNALATIAQAQEEESLGN  
 KPADDLLNLEGVDRDLAFKLAARGVCTLEDLAEQGIDDLADIEGLTDEKAGALIMAARNIC  
 WFGDEGDDDDKINSSGETFRPTADFHPSLWRNHFLKGASDFKTVDHDTATQERHEALKEEV  
 RRMITDAEDKPVQKLRLLIDEVQRLGVAYHFEKEIEDAIQKLCPIYIDSNRADLHTVSLHFRL  
 LRQQGIKISCDVFEKFKDDEGRFKSSLINDVQGMLSLYEAAVMAVRGEHILDEAIAFTTTHL  
 KSLVAQDHVTPKLAEQINHALYRPLRKTLPRLREARYFMSMINSTSDHLYNKTLNFAKLD  
 NILLELHKEELNELTKWWKDLDFTTKLPYARDRLVELYFWDLGTYFEPQYAFGRKIMTQL  
 NYILSIIDDTYDAYGTLEELSLFTEAVQRWNEAVDMLPEYMKLIYRLLDAFNEIEEDMAK  
 QGRSHCVRYAKEENQKVIGAYSVAQKWFSEGYVPTIEEYMPIALTSCAYTFVITNSFLGMG  
 DFATKEVFEWISNPNKVVKAASVICRLMDDMQGHEFEQKRGHVASAIECYTKQHGVSKEE  
 AIKMFEEEVANAWKDINEELMMKPTVVARPLLGTILNLARAIDFIYKEDDGYTHSYLIKDQI  
 ASVLGDHVPFIN

SEQ ID NO: 14

5 *trx-ValFpoR*

Gen sintético

Secuencia de nucleótidos

ATGTCGGACAAGATCATCCACCTGACCGACGACAGCTTCGACACCGACGTGCTGAAGGCC  
 GACGGCGCCATCCTCGTCGATTTCTGGGCCGAATGGTGCGGCCCCTGCAAGATGATCGCG  
 CCGATCCTCGACGAGATCGCCGACGAATATCAGGGCAAGCTGACCGTCGCCAAGCTGAAC  
 ATCGACCAGAACCCGGGCACGGCGCCGAAATACGGCATCCGCGGCATCCCGACGCTGCT  
 GCTCTTCAAGAACGGCGAGGTGGCGGCCACCAAGGTCCGCGCGCTGTCGAAGGGCCAGC  
 TGAAGGAGTTCTCGATGCGAACCTCGCCGTTGGTATGACGACGACAAGATTAATAGCT  
 CGGGCGAGACCTTCGCCCCGACCGCCGATTTCCATCCCTCGCTCTGGCGCAACCATTTC  
 TGAAGGGCGCCTCCGACTTCAAGACCGTCGATCACACGGCCACCCAGGAGCGCCACGAG  
 GCGCTGAAGGAAGAGGTGCGCCGATGATCACCGACCGGAGGACAAGCCGGTGCAGAA  
 GCTGCGGCTGATCGACGAGGTGCGCGTCTCGGCGTGGCCTATCACTTCGAGAAGGAGAT  
 CGAGGATGCGATCCAGAAGCTCTGCCCCGATCTACATCGACAGCAACCGCGCCGATCTGCA  
 CACGGTCTCGCTGCATTTCCGGCTGCTGCGCCAGCAGGGCATCAAGATCTCTGCGACGT  
 CTTCGAGAAGTTCAAGGACGACGAGGGCCGCTTCAAGTCTCTGCTGATCAACGACGTGCA  
 GGGGATGCTGTGCTCTACGAGGCGCCCTACATGGCGGTGCGCGGCGAGCATATCCTCG  
 ACGAGGCGATCGCCTTACCACCACCCATCTGAAATCGCTCGTGGCGCAGGACCATGTCA  
 CGCCGAAGCTCGCCGAGCAGATCAACCATGCGCTCTACCGCCCGCTGCGCAAGACGCTGC  
 CGCGGCTCGAGGCGCGCTATTTTCATGTGATGATCAACTCGACCTCGGACCATCTCTACA  
 ACAAGACGCTGCTGAACTTCGCCAAGCTCGACTTCAACATCCTGCTCGAGCTGCACAAGG  
 AAGAGCTGAACGAGCTGACGAAATGGTGGAAGGATCTCGACTTACCACCAAGCTGCCCT  
 ATGCGCGGACCGGCTGGTCTGAGCTCTATTTCTGGGATCTCGGCACCTATTTTCGAGCCG  
 AGTATGCCTTCGGCCGCAAGATCATGACCCAGCTGAACTACATCCTCTCGATCATCGACG  
 ACACCTACGACGCTACGGCAGCTGGAAGAGCTGTCGCTCTTACCAGGCGGTGCAGC  
 GCTGGAACATCGAGGCGGTGACATGCTGCCGGAATACATGAAGCTGATCTACCGCACGC

TGCTCGATGCCTTCAACGAGATCGAGGAAGACATGGCGAAACAAGGGCGCAGCCACTGC  
GTGCGCTATGCCAAGGAAGAGAACCAGAAGGTCATCGGCGCCTATTCGGTCCAGGCGAAA  
TGGTTCTCGGAAGGCTATGTCCCCACGATCGAGGAATACATGCCGATCGCGCTGACCTCC  
TGCGCCTATACCTTCGTCATCACCAACAGCTTCCTCGGCATGGGCGACTTCGCCACCAAG  
GAAGTCTTCGAATGGATCTCGAACAACCCGAAGGTCGTCGAAGGCGGCCTCGGTCATCTGC  
CGGCTGATGGACGACATGCAGGGCCACGAGTTCGAGCAGAAGCGCGGCCATGTTCGCCTC  
GGCCATCGAATGCTACACCAAGCAGCACGGCGTCTCGAAGGAAGAGGCGATCAAGATGTT  
CGAAGAGGAAGTGGCCAATGCCTGGAAGGACATCAACGAGGAACTGATGATGAAGCCCA  
CCGTCGTGGCCCGTCCGCTGCTCGGCACGATCCTGAACCTCGCCCGCGCCATCGACTTCA  
TCTACAAGGAAGACGACGGCTATACCCATTCCTATCTGATCAAGGACCAGATCGCCTCGG  
TCCTCGGCGACCATGTGCCTTTCATTAATTGATAA

SEQ ID NO: 15

Trx-ValFpoR

- 5 Proteína de fusión de Trx de *E. coli* y ValFpoR de *Citrus x paradisi*  
Secuencia de aminoácidos

MSDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAIEWCGPCKMIAPILDEIADEYQGKLTVAKLNID  
QNPGTAPKYGIRGIPTLLLFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDANLAGDDDDKINSSGET  
FRPTADFHPSLWRNHFLKGASDFKTV DHTATQERHEALKEEVRMITDAEDKPVQKLRLI  
DEVQRLGVAYHFEKEIEDAIQKLCPIYIDSNRADLHTVSLHFRLLRQQGIKISCDVFEKFKD  
DEGRFKSSLINDVQGMLSLYEAAVMVRGEHILDEAIAFTTTHLKSVAQDHVTPKLAEQI  
NHALYRPLRKTLPRLRLEARYFMSMINSTSDHLYNKTLNFAKLDFNILLELHKEELNELTKW  
WKDLDFTTKLPYARDRLVELYFWDLGTYFEPQYAFGRKIMTQLNYILSIIDDYDAYGTL EE  
LSLFTEAVQRWNIEAVDMLPEYMKLIYRTL DAFNEIEEDMAKQGRSHCVRYAKEENQKVI  
GAYSVQAKWVSEGYVPTIEEYMPIALTSCAYTFVITNSFLGMGDFATKEVFEWISNNPKVV  
KAASVICRLMDDMQGHEFEQKRGHVASAIECYTKQHGVSKEEAIKMFEEEVANAWKDINE  
ELMMKPTVVARPLLGTILNLARAIDFIYKEDDGYTHSYLIKDQLASVLGDHVPFIN

10 SEQ ID NO: 16

*mbp-valF*

Gen sintético

Secuencia de nucleótidos

ATGAAGATCGAGGAAGGCAAGCTCGTCATCTGGATCAACGGCGACAAGGGCTACAACGG  
 CCTCGCCGAGGTGGCAAGAAGTTCGAGAAGGACACGGGCATCAAGGTCACCGTCGAGC  
 ATCCCAGACAAGCTCGAGGAGAAGTTCGCGAGGTCGCGCCACCGGCGACGGCCCCGAC  
 ATCATCTTCTGGGCCCACGACCGCTTCGGCGGCTATGCGCAGTCGGGCCTGCTCGCCGAG  
 ATCACGCCCGACAAGGCCCTCCAGGACAAGCTCTATCCCTTCACCTGGGATGCGGTGCGC  
 TACAACGGCAAGCTGATCGCCTATCCGATCGCCGTCGAGGCGCTGTCGCTGATCTACAAC  
 AAGGATCTGCTGCCGAACCCGCGGAAGACCTGGGAAGAGATCCCGGCGCTCGACAAGGA  
 ACTGAAGGCCAAGGGCAAGTCCGCGCTGATGTTCAACCTGCAGGAGCCCTATTTACCTG  
 GCCGCTGATCGCCGCCGACGGCGGCTATGCCTTCAAATACGAGAACGGCAAATACGACAT  
 CAAGGACGTGGGCGTCGACAATGCGGGCGCCAAGGCCGGGCTGACCTTCCTCGTCGATC  
 TGATCAAGAAACAAGCACATGAATGCCGACACCGACTATTCATCGCCGAGGCGGCCTTCA  
 ACAAGGGCGAGACCGCCATGACGATCAACGGGCGGTGGGCCTGGTCGAACATCGACACC  
 TCGAAGGTCAATTACGGCGTACGGGTGCTGCCGACCTTCAAGGGCCAGCCCTCGAAACCC  
 TTCGTCGGCGTGTGTCGGCGGGCATCAACGCGGCCCTGCCGAACAAGGAACCTGCCAA  
 GGAGTTCTCGAGAACTACCTGCTGACCGACGAGGGGCTCGAGGCGGTGAACAAGGACA  
 AGCCGCTCGGCGCGGTGGCGCTGAAATCCTACGAGGAAGAGCTCGTCAAGGACCCGCGG  
 ATCGCCGCCACGATGGAGAATGCGCAGAAGGGCGAGATCATGCCGAACATCCCGCAGAT  
 GTCGGCCTTCTGGTATGCCGTCCGCACCGCGGTGATCAACGCGGCCTCGGGCCGTCAGAC  
 CGTCGACGAGGCGCTGAAGGATGCGCAGACTGGTGTGACGACGACAAGATTATGTGCA  
 GCGGCGAGACCTTCCGCCCCACGGCCGACTTCCATCCGTCCCTCTGGCGGAACCACTTCC  
 TCAAGGGGGCCTCCGATTTCAAGACCGTGGACCATAACGGCGACGAGGAACGGCACGAG  
 GCCCTCAAGGAGGAGTCCGCCGATGATCACCGACGCCGAAGACAAGCCGGTCCAGAA

GCTCCGCCTGATCGACGAGGTCCAGCGCCTGGGCGTGGCGTATCATTTTCGAGAAAGAAAT  
 CGAGGATGCGATCCAGAAGCTCTGCCCGATCTATATCGATAGCAATCGCGCCGATCTCCA  
 TACCGTGTGCTGCACTTCCGCCTGCTGCGGCAGCAGGGCATCAAGATCAGCTGCGACGT  
 GTTCGAAAAGTTCAAGGACGACGAGGGCCGCTTCAAGTCGTGCTGATCAACGACGTGCA  
 GGGCATGCTGTGCTGTACGAGGCCGCTACATGGCCGTGCGCGGCGAGCATATCCTGG  
 ACGAAGCCATCGCGTTCACGACCACGCATCTGAAGTCGCTGGTGGCGCAGGACCACGTGA  
 CGCCGAAGCTCGCCGAGCAGATCAACCACGCGCTGTATCGGCCGCTCCGCAAGACCTCC  
 CGCGCCTCGAGGCCCGCTATTTTCATGAGCATGATCAACTCGACCTCGGATCACCTGTACA  
 ATAAGACCTGCTCAACTTCCGCGAACTGGACTTCAATATCCTCCTCGAGCTGCACAAGG  
 AGGAGCTCAACGAGCTGACCAAGTGGTGGAAAGGATCTGGACTTCACCACCAAGTCCCGT  
 ACGCCCGGATCGCCTCGTGGAGCTGATTTCTGGGACCTGGGCACCTACTTCGAACCCC  
 AGTACGCCTTCGGGCGGAAGATCATGACCCAGCTCAATTATATCCTCAGCATCATCGACG  
 ACACCTATGACGCGTACGGCACGCTGGAGGAGCTGTCCCTGTTACGGAAGCCGTCCAGC  
 GGTGGAACATCGAGGCCGTCGACATGCTCCCGAGTACATGAAACTGATCTACCGGACCC  
 TGCTGGATGCCTTCAACGAGATCGAGGAGGACATGGCGAAACAGGGCCGTCCTACTGC  
 GTGCGCTACGCGAAGGAAGAGAACCAGAAGGTCATCGGCGCCTACTCGGTCCAGGCGAA  
 GTGGTTCAGCGAGGGCTATGTGCCGACGATCGAGGAATATATGCCGATCGCGCTCACCTC  
 GTGCGCGTACACGTTTCGTGATCACC AATTCGTTTCTCGGCATGGGCGATTTTCGCGACCA  
 GGAGGTCTTCGAGTGGATCAGCAACAATCCGAAGGTGGTGAAGGCGGCCTCGGTTCATCTG  
 CCGGCTCATGGATGACATGCAGGGGCATGAGTTCGAACAGAAGCGCGGCCACGTGCGGT  
 CCGCCATCGAGTGTATAACCAAGCAGCATGGCGGTGTCGAAGGAGGAGGCCATCAAGATGT  
 TCGAGGAGGAAGTCGCCAACGCGTGAAGGACATCAATGAGGAGCTGATGATGAAGCCC  
 ACCGTGCTGGCCCGCCCCCTGCTGGGCACCATCCTGAACCTCGCCCGCGCCATCGACTTC  
 ATCTACAAGGAGGACGATGGGTATACGCATTCCTATCTGATCAAGGACCAGATCGCCTCG  
 GTCTCGGCGATCATGTCCCGTTCTGATAA

SEQ ID NO: 17

MBP-ValF

5 Proteína de fusión de MBP de *E. coli* y ValFpoR de *Citrus x paradisi*  
 Secuencia de aminoácidos

MKIEEGKLVWINGDKGYNGLAEVGKKFEKDTGIKVTVEHPDKLEEKFPQVAATGDGPDII  
 FWAHDRFGGYAQSGLLAEITPKAFQDKLYPFTWDAVRYNGKLLAYPIAVEALSILYNKDL  
 LPNPPKTWEIPALDKELKAKGKSALMFNLQEPYFTWPLAADGGYAFKYENKDYDIKDV  
 GVDNAGAKAGLTFVLVDLIKHKHMNADTDYSIAEAAFNKGETAMTINGPWAWSNIDTSKVN  
 YGVTVLPTFKGQPSKPFVGVLSAGINAASPNKELAKEFLENYLLTDEGLEAVNKDKPLGAV  
 ALKSYEEELVKDPRIAAATMENAQKGEIMPNIQMSAFWYAVRTAVINAASGRQTVDEALKD  
 AQTGDDDDKINSSGETFRPTADFHPSLWRNHFLKGASDFKTVVDHTATQERHEALKEEVRR  
 MITDAEDKPVQKLRRLIDEVQRLGVAYHFEKEIEDAIQKLCPIYIDSNRADLHTVSLHFRLLR  
 QQGIIKISCDVFEKFKDDEGRFKSSLINDVQGMLSLYEAAAYMAVRGEHILDEALAFTTTHLKS  
 LVAQDHVTPKLAEQINHALYRPLRKTLPRLREARYFMSMINSTSDHLYNKTLNFAKLDENI  
 LLELHKEELNELTKWKDLDFTTKLPYARDRLVELYFWDLGTYFEPQYAFGRKIMTQLNY  
 ILSIIDDYDAYGTLLESLFTEAVQRWNIEAVDMLPEYMKLIYRTLDAFNEIEEDMAKQG  
 RSHCVRYAKEENQKVGAYSVAQKWFSEGYVPTIEEYMPIALTSWAYTFVITNSFLGMGDEFA  
 TKEVFEWISNPNKVVKAASVICRLMDDMQGHEFEQKRGHVASAIECYTKQHGVSKEEAIK  
 MFEEEVANAWKDINEELMMKPTVVARPLLGTLNLARAIIDFIYKEDDGYTHSYLIKDQIASV  
 LGDHVFPF

SEQ ID NO: 18

*valC-opt*

5 Gen sintético

Secuencia de nucleótidos

ATGGCCGAAATGTTCAATGGCAATTCAGCAATGATGGCAGCTCCTGCATGCCGGTCAAG  
 GACGCGCTGCGCCGACCCGGAACCATCCGAACCTCTGGACCGACGATTTTCATCCAG  
 TCGCTGAACCTCCCCATTCGGATTCTCGTATCATAAACATCGCGAGATCCTGATCGATG

AGATCCGGGACATGTTCTCCAACGGCGAGGGGATGAGTTCGGGGTCTCGAGAACATCT  
 GGTTCTGCGACGTGGTCCAGCGGCTGGGCATCGATCGGCACTTCCAGGAAGAGATCAAGA  
 CGGCCCTGGATTATATCTATAAGTTCTGGAACCATGATAGCATCTTCGGCGACCTCAACAT  
 GGTGGCGCTGGGGTTCGATCCTGCGGCTCAATCGCTACGTGGCGTCTGCGGACGTGTT  
 CAAGAAGTTCAGGGCGAGGAGGGCCAGTTCTCGGGTTCGAGAGCAGCGATCAGGACG  
 CCAAGCTGGAGATGATGCTGAACCTCTACAAGCCTCGGAACCTCGACTTCCCGGATGAGG  
 ACATCCTCAAGGAAGCGCGGGCCTTCGCGTCTGATGTATCTCAAGCATGTCATCAAGGAGT  
 ATGGGGACATCCAGGAATCGAAGAACCCCTGCTCATGGAGATCGAGTACACCTTCAAGT  
 ACCCTGGCGCTGCCGCTCCCGCGGCTGGAGGCGTGGAACCTCATCCACATCATGCCGGC  
 AGCAGGACTGCAATATCTCGCTCGCCAACAACCTCTATAAGATCCCGAAGATCTATATGAA  
 GAAGATCCTGGAGCTGGCGATCCTCGACTTCAACATCCTCCAGAGCCAGCATCAGCATGA  
 GATGAAACTGATCAGCACGTGGTGGAAGAACTCGTCCGCGATCCAGCTCGACTTCTTCCG  
 CCACCGCCATATCGAGAGCTACTTCTGGTGGGCCAGCCGCTGTTTCGAGCCCGAGTTCTC  
 CACTGCGCATCAACTGCACCAAGCTGTCCACCAAGATGTTCTCCTGGACGACATCTAT  
 GACACGTACGGGACCGTCCGAGGAACTCAAGCCGTTACGACCACCCTCACGCGCTGGGAT  
 GTCAGCACGGTGGACAATCACCCGACTACATGAAGATCGCGTCAATTTCTCCTACGAG  
 ATCTACAAGGAGATCGCGTCCGAGGCCGAGCGCAAGCACGGCCCGTTCGTGTATAAGTAT  
 CTCCAGTCGTGCTGGAAGTCGTATATCGAGGCGTATATGAGGAGGCCGAGTGGATCGCC  
 TCCAACCACATCCCCGGCTTCGACGAGTACCTGATGAATGGCGTGAAGAGCTCGGGGATG  
 CGCATCCTCATGATCCATGCGCTGATCCTGATGGATACGCCCTGTCCGACGAGATCCTC  
 GAGCAGCTCGACATCCCGAGCAGCAAGAGCCAGGCCCTGCTGTGCTCATCACGCGGCTC  
 GTCGATGATGTGAAGGATTTTCGAGGACGAGCAGGCGCATGGGAGATGGCCTCGTCGAT  
 CGAATGCTATATGAAGGATAATCACGGCTCCACGCGGAGGACGCCCTGAACTACCTGAA  
 AATCCGCATCGAGAGCTGCGTGCAGGAGCTCAACAAGGAACTCCTCGAACCAGCAACAT  
 GCATGGCAGCTCCGCAACCTGTACCTCAACGTGGGCATGCGGGTATCTTCTCATGCT  
 GAACGACGGGACCTCTTCAACCATTGCAATCGGAAGGAGATCCAGGATGCGATCACGAA  
 GTTCTTCGTGGAACCGATCATCCCGTGATAA

10 SEQ ID NO: 19

*valC-opt-short*

Gen sintético

Secuencia de nucleótidos

ATGCCGGTCAAGGACGCGCTGCGCCGCACCGGAACCACCATCCGAACCTCTGGACCGA  
 CGATTTTCATCCAGTCGCTGAACTCCCCCTATTCCGATTCCCTCGTATCATAAACATCGCGAG  
 ATCCTGATCGATGAGATCCGGGACATGTTCTCCAACGGCGAGGGGGATGAGTTCGGGGTC  
 CTCGAGAACATCTGGTTCGTGACGTGGTCCAGCGGCTGGGCATCGATCGGCACTTCCAG  
 GAAGAGATCAAGACGGCCCTGGATTATATCTATAAGTTCTGGAACCATGATAGCATCTTC  
 GCGACCTCAACATGGTGGCGCTGGGGTTCGCATCCTGCGGCTCAATCGCTACGTGGCG  
 TCGTCCGACGTGTTCAAGAAGTTCAAGGGCGAGGAGGGCCAGTTCTCGGGGTTTCGAGAG  
 CAGCGATCAGGACGCCAAGCTGGAGATGATGCTGAACCTCTACAAGGCCCTCGAACTCGA  
 CTTCCCGGATGAGGACATCCTCAAGGAAGCGCGGGCCTTCGCGTCGATGTATCTCAAGCA  
 TGTCAATCAAGGAGTATGGGGACATCCAGGAATCGAAGAACCCCTGCTCATGGAGATCGA  
 GTACACCTTCAAGTACCCCTGGCGCTGCCGCCCTCCCGCGGCTGGAGGCGTGGAACTTCAT  
 CCACATCATGCGGCAGCAGGACTGCAATATCTCGCTCGCCAACAACCTCTATAAGATCCC  
 GAAGATCTATATGAAGAAGATCCTGGAGCTGGCGATCCTCGACTTCAACATCCTCCAGAG  
 CCAGCATCAGCATGAGATGAAACTGATCAGCACGTGGTGGAAAGAACTCGTCCGCGATCCA  
 GCTCGACTTCTCCGCCACCGCCATATCGAGAGCTACTTCTGGTGGGCCAGCCCGCTGTT  
 CGAGCCCGAGTTCTCCACCTGCCGCATCAACTGCACCAAGCTGTCCACCAAGATGTTCTC  
 CCTGGACGACATCTATGACACGTACGGGACCGTCCGAGGAACTCAAGCCGTTACGACCAC  
 CCTACCGCGCTGGGATGTCAGCACGGTGGACAATCACCCGGACTACATGAAGATCGCGTT  
 CAATTTCTCCTACGAGATCTACAAGGAGATCGCGTCCGAGGCCGAGCGCAAGCACGGCCC  
 GTTCGTGTATAAGTATCTCCAGTCGTGCTGGAAGTCGTATATCGAGGCGTATATGCAGGA  
 GGCCGAGTGGATCGCCTCCAACCACATCCCCGGCTTCGACGAGTACCTGATGAATGGCGT  
 GAAGAGCTCGGGGATGCGCATCCTCATGATCCATGCGCTGATCCTGATGGATACGCCCT

GTCCGACGAGATCCTCGAGCAGCTCGACATCCCGAGCAGCAAGAGCCAGGCCCTGCTGTC  
 GCTCATCACGCGGCTCGTCGATGATGTGAAGGATTTTCGAGGACGAGCAGGCGCATGGGG  
 AGATGGCCTCGTCGATCGAATGCTATATGAAGGATAATCACGGCTCCACGCGCGAGGACG  
 CCCTGAACTACCTGAAAATCCGCATCGAGAGCTGCGTGCAGGAGCTCAACAAGGAACTCC  
 TCGAACCAGCAACATGCATGGCAGCTTCGGCAACCTGTACCTCAACGTGGGCATGCGGG  
 TGATCTTCTTCATGCTGAACGACGGGGACCTCTTACCCATTTCGAATCGGAAGGAGATCC  
 AGGATGCGATCACGAAGTCTTCGTGGAACCGATCATCCCGTGATAA

SEQ ID NO: 20  
*nabp-valC-opt*  
 Gen sintético  
 Secuencia de nucleótidos

5

ATGAAGATCGAGGAAGGCAAGCTCGTCATCTGGATCAACGGCGACAAGGGCTACAACGG  
 CCTCGCCGAGGTGGGCAAGAAGTTCGAGAAGGACACGGGCATCAAGGTCACCGTTCGAGC  
 ATCCCGACAAGCTCGAGGAGAAGTTCGCGCAGGTCGCGCCACCGGCGACGGCCCCGAC  
 ATCATCTTCTGGGCCACGACCGCTTCGGCGGTATGCGCAGTCGGGCTGCTCGCCGAG  
 ATCACGCCCAGACAAGGCTTCCAGGACAAGCTTATCCCTTACCTGGGATGCGGTGCGC  
 TACAACGGCAAGCTGATCGCCTATCCGATCGCCGTCGAGGCGCTGTGCTGATCTACAAC  
 AAGGATCTGCTGCCGAACCCGCGAAGACCTGGGAAGAGATCCCGGCGCTCGACAAGGA  
 ACTGAAGGCCAAGGGCAAGTCCGCGCTGATGTTCAAACCTGCAGGAGCCCTATTTACCTG  
 GCCGCTGATCGCCGCGACGGCGGCTATGCCTTCAAATACGAGAACGGCAAATACGACAT  
 CAAGGACGTGGGCGTCGACAATGCGGGCGCAAAGGCCGGGCTGACCTTCTCGTTCGATC  
 TGATCAAGAACAAGCACATGAATGCCGACACCGACTATTCCATCGCCGAGGCGGCCTTCA  
 ACAAGGGCGAGACCGCCATGACGATCAACGGGCCGTGGGCCTGGTCGAACATCGACACC  
 TCGAAGGTCAATTACGGCGTACGGTGTGCTGCCGACCTTCAAGGGCCAGCCCTCGAAACCC  
 TTCGTGCGCGTGTGCTGCGGCGGGCATCAACGCGCCCTCGCCGAACAAGGAACCTCGCCAA  
 GGAGTTCTCGAGAACTACCTGCTGACCGACGAGGGGCTCGAGGCGGTGAACAAGGACA  
 AGCCGCTCGGCGCGGTGGCGCTGAAATCCTACGAGGAAGAGCTCGTCAAGGACCCGCGG  
 ATCGCCGCCACGATGGAGAATGCGCAGAAGGGCGAGATCATGCCGAACATCCCGCAGAT  
 GTCGGCCTTCTGGTATGCCGTCCGACCGCGGTGATCAACGCGGCCCTCGGGCCGTGACAC  
 CGTCGACGAGGCGCTGAAGGATGCGCAGACTGGTGTGACGACGACAAGATTATGGCCG  
 AAATGTTCAATGGCAATTCCAGCAATGATGGCAGCTCCTGCATGCCGGTCAAGGACGCGC  
 TGCGCCGACCGGGAACCACCATCCGAACCTCTGGACCGACGATTTTCATCCAGTCCGCTGA  
 ACTCCCTTATTCGGATTCCTGATCATAAATCATCGCGAGATCCTGATCGATGAGATCCCG  
 GGACATGTTCCAAACGGCGAGGGGATGAGTTCGGGGTCTCGAGAACATCTGGTTCGT  
 CGACGTGGTCCAGCGGCTGGGCATCGGCACTTCCAGGAAGAGATCAAGACGGCCC  
 TGGATTATATCTATAAGTTCGGAACCATGATAGCATCTTCGGCGACCTCAACATGGTGGC  
 GCTGGGGTTCGCATCCTGCGGCTCAATCGCTACGTGGCGTGTGCGGACGTGTTCAAGAA  
 GTTCAAGGGCGAGGAGGGCCAGTTCGCGGGTTCGAGAGCAGCGATCAGGACGCCAAGC  
 TGGAGATGATGCTGAACCTCTACAAGGCTCGGAACTCGACTTCCCGGATGAGGACATCC  
 TCAAGGAAGCGCGGGCCTTCGCGTTCGATGTATCTCAAGCATGTCATCAAGGAGTATGGGG  
 ACATCCAGGAATCGAAGAACCCCTGCTCATGGAGATCGAGTACACCTTCAAGTACCCCT  
 GGCGCTGCCGCTCCCGCGGCTGGAGGCGTGAACCTTCATCCACATCATGCGGCAGCAG  
 GACTGCAATATCTCGTTCGCCAACCAACCTCTATAAGATCCCGAAGATCTATATGAAGAAGA  
 TCCTGGAGCTGGCGATCCTCGACTTCAACATCCTCCAGAGCCAGCATCAGCATGAGATGA  
 AACTGATCAGCACGTGGTGAAGAACTCGTCCGCGATCCAGCTCGACTTCTTCCGCCACC  
 GCCATATCGAGAGCTACTTCTGGTGGGCCAGCCCGCTGTTTCGAGCCCGAGTTCCTCACCT  
 GCCGCATCAACTGCACCAAGCTGTCCACCAAGATGTTCTCCTGGACGACATCTATGACA  
 CGTACGGGACCGTCGAGGAACTCAAGCCGTTACGACCACCTCACGCGCTGGGATGTCA  
 GCACGGTGGACAATCACCCGACTACATGAAGATCGCGTTCAATTTCTCCTACGAGATCTC  
 ACAAGGAGATCGCGTCCGAGGCCGAGCGCAAGCACGGCCCGTTCGTGTATAAGTATCTCC  
 AGTCGTGCTGGAAGTCGTATATCGAGGCGTATATGCAGGAGGCCGAGTGGATCGCCTCCA  
 ACCACATCCCCGCTTCGACGAGTACCTGATGAATGGCGTGAAGAGCTCGGGGATGCGCA  
 TCCTCATGATCCATGCGCTGATCCTGATGGATACGCCCTGTCCGACGAGATCCTCGAGC

AGCTCGACATCCCGAGCAGCAAGAGCCAGGCCCTGCTGTGCTCATCACGCGGCTCGTCCG  
 ATGATGTGAAGGATTTTCGAGGACGAGCAGGCGCATGGGGAGATGGCCTCGTTCGATCGAA  
 TGCTATATGAAGGATAATCACGGCTCCACGCGCGAGGACGCCCTGAACTACCTGAAAATC  
 CGCATCGAGAGCTGCGTGCAGGAGCTCAACAAGGAACTCCTCGAACCGAGCAACATGCAT  
 GGCAGCTTCCGCAACCTGTACCTCAACGTGGGCATGCGGGTGTATCTTCTCATGCTGAAC  
 GACGGGACCTTTCACCCATTCCAATCGGAAGGAGATCCAGGATCCGATCACGAAGTTC  
 TTCGTGGAACCGATCATCCCGTGATAA

SEQ ID NO: 21

MBP-ValC

5 Proteína de fusión de MBP de *E. coli* y ValC de *Chamaecyparis nootkatensis*  
 Secuencia de aminoácidos



MKIEEGKLVWINGDKGYNGLAEVGKKFEKDTGIKVTVEHPDKLEEKFPQVAATGDGPDII  
 FWAHDRFGGYAQSGLLAEITPDKAFQDKLYPFTWDAVRYNGKLIAYPIAVEALSILYNKDL  
 LPNPPKTWEEIPALDKELKAKGKSALMFNLQEPYFTWPLIAADGGYAFKYENGYDIKDV  
 GVDNAGAKAGLTFVLVLIKNKHMNADTDYSIAEAAFNKGETAMTINGPWAWSNIDTSKVN  
 YGVTVLPTFKGQPSKPFVGVLSAGINAASPNKELAKEFLENYLLTDEGLEAVNKDKPLGAV  
 ALKSYEEELVKDPRIAATMENAQKGEIMPNIQMSAFWYAVRTAVINAASGRQTVDEALKD  
 AQTGDDDDKIMAEMFNSSNDGSSCMPVKDALRRTGNHHPNLWTDDFIQSLNSPYSDSS  
 YHKHREILIDEIRDMFSNGEGDEFGVLENIWFVDVVQRLGIDRHFQEEIKTALDYTYKFWN  
 HDSIFGDLNMVALGFRILRLNRYVASSDVFKKFKGEEGQFSGFESSDQDAKLEMMLNLYK  
 ASELDFPDEDILKEARAFASMYLKHVIKEYGDIQESKNPLLMEIEYTFKYPWRCRLPRLEA  
 WNFHIMRQQDCNISLANNLYKIPKIYMKKILELAILDFNILQSQHQHEMKLISTWWKNSSA  
 IQLDFFRHRHIESYFWWASPLFEPEFSTCRINCTKLSTKMFLDDIYDITYGTVEELKPFITT  
 LTRWDVSTVDNHPDYMKIAFNFSYEIYKEIASEAERKHGPFVYKYLQSCWKSIEAYMQEA  
 EWIASNHIPGFDEYLMNGVKSSGMRILMIHALILMDTPLSDEILEQLDIPSSKSQALLSLITR  
 LVDDVKDFEDEQAHGEMASSIECYMKDNHGSTREDALNYLKIRIESCVQELNKELLEPSN  
 MHGSFRNLYLNVGMRVIFFMLNDGDLFTHSNRKEIQDAITKFFVEPIIP

SEQ ID NO: 22

*nabp-valC-opt-short*

5 Gen sintético

Secuencia de nucleótidos

ATGAAGATCGAGGAAGGCAAGCTCGTCATCTGGATCAACGGCGACAAGGGCTACAACGG  
 CCTCGCCGAGGTGGGCAAGAAGTTCGAGAAGGACACGGGCATCAAGGTCACCGTTCGAGC  
 ATCCCACAAAGCTCGAGGAGAAGTTCGCGAGGTCGCGCCACCGGCGACGGCCCCGAC  
 ATCATCTTCTGGGCCACGACCGCTTCGGCGGCTATGCGCAGTCGGGCTGCTCGCCGAG  
 ATCAGCCCCGACAAGGCCTTCCAGGACAAGCTCTATCCCTTACCTGGGATGCGGTGCGC  
 TACAACGGCAAGCTGATCGCCTATCCGATCGCCGTCGAGGCGCTGTCGCTGATCTACAAC  
 AAGGATCTGCTGCCGAACCCGCCGAAGACCTGGGAAGAGATCCCGGCGCTCGACAAGGA  
 ACTGAAGGCCAAGGGCAAGTCCGCGCTGATGTTCAACCTGCAGGAGCCCTATTTACCTG  
 GCCGCTGATCGCCGCCGACGGCGGCTATGCCTTCAAATACGAGAACGGCAAATACGACAT  
 CAAGGACGTGGGCGTCGACAATGCCGGCGCCAAGGCCGGGCTGACCTTCTCGTTCGATC  
 TGATCAAGAACAAGCACATGAATGCCGACACCGACTATTCATCGCCGAGGCGGCCTTCA  
 ACAAGGGCGAGACCGCCATGACGATCAACGGGCGGCTGGGCTGGTGAACATCGACACC  
 TCGAAGGTCAATTACGGCGTCACGGTCTGCGGACCTTCAAGGGCCAGCCCTCGAAACCC  
 TTCGTGCGGCTGCTGTCGGCGGGCATCAACGCGGCTCGCCGAACAAGGAACTCGCAA  
 GGAGTTCTCGAGAACTACCTGCTGACCGACGAGGGGCTCGAGGCGGTGAACAAGGACA  
 AGCCGCTCGGCGCGGTGGCGCTGAAATCCTACGAGGAAGAGCTCGTCAAGGACCCGCGG  
 ATCGCCGCCACGATGGAGAATGCGCAGAAGGGCGAGATCATGCCGAACATCCCGCAGAT  
 GTCGGCCTTCTGGTATGCCGTCCGACCGCGGTGATCAACGCGGCTCGGGCCGTCAGAC  
 CGTCGACGAGGCGCTGAAGGATGCGCAGACTGGTATGACGACGACAAGATTATGCCGG  
 TCAAGGACGCGCTGCGCCGACCGGGAACACCATCCGAACCTCTGGACCGACGATTTCA  
 TCCAGTTCGCTGAACTCCCCCTATTCGGATTCTCGTATCATAAACATCGCGAGATCCTGAT

CGATGAGATCCGGGACATGTTCTCCAACGGCGAGGGGGATGAGTTCGGGGTCTCGAGA  
 ACATCTGGTTCGTGACGCTGGTCCAGCGGCTGGGCATCGATCGGCACTTCCAGGAAGAGA  
 TCAAGACGGCCCTGGATTATATCTATAAGTTCTGGAACCATGATAGCATCTTCGGCGACCT  
 CAACATGGTGGCGCTGGGGTTCGCGATCCTGCGGCTCAATCGCTACGTGGCGTCTCGGA  
 CGTGTCAAGAAGTTCAAGGGCGAGGAGGGCCAGTTCTCGGGTTCGAGAGCAGCGATC  
 AGGACGCCAAGCTGGAGATGATGCTGAACCTCTACAAGGCCTCGGAACTCGACTTCCCGG  
 ATGAGGACATCCTCAAGGAAGCGCGGGCCTTCGCGTCGATGTATCTCAAGCATGTCATCA  
 AGGAGTATGGGACATCCAGGAATCGAAGAACCCCTGCTCATGGAGATCGAGTACACCT  
 TCAAGTACCCCTGGCGCTGCCGCTCCCGCGGCTGGAGGCGTGGAACTTCATCCACATCA  
 TGCGGCAGCAGGACTGCAATATCTCGCTCGCCAACAACCTCTATAAGATCCCGAAGATCT  
 ATATGAAGAAGATCCTGGAGCTGGCGATCCTCGACTTCAACATCCTCCAGAGCCAGCATC  
 AGCATGAGATGAACTGATCAGCACGTGGTGGAAAGACTCGTCCGCGATCCAGCTCGACT  
 TCTTCCGCCACCGCCATATCGAGAGCTACTTCTGGTGGGCCAGCCCGCTGTTCCGAGCCCG  
 AGTTCTCCACCTGCCGATCAACTGCACCAAGCTGTCCACCAAGATGTTCTCCTGGACG  
 ACATCTATGACACGTACGGGACCGTTCGAGGAACTCAAGCCGTTACGACCACCCTCACGC  
 GCTGGGATGTCAGCACGGTGGACAATCACCCGGACTACATGAAGATCGCGTTCAATTTCT  
 CCTACGAGATCTACAAGGAGATCGCGTCCGATAGCCGAGCGCAAGCACGGCCCGTTCTGT  
 ATAAGTATCTCCAGCTGCTGGAAGTCGTATATCGAGGCGTATATGCGAGGCGCCGAGT  
 GGATCGCCTCCAACCACATCCCGGCTTCGACGAGTACCTGATGAATGGCGTGAAGAGCT  
 CGGGGATGCGCATCCTCATGATCCATGCGCTGATCCTGATGGATAACGCCCTGTCCGACG  
 AGATCCTCGAGCAGCTCGACATCCCGAGCAGCAAGAGCCAGGCCCTGCTGTGCTCATCA  
 CGCGGCTCGTTCGATGATGTGAAGGATTTGAGGACGAGCAGGCGCATGGGGAGATGGCC  
 TCGTTCGATCGAATGCTATATGAAGGATAATCACGGCTCCACGCGGAGGACGCCCTGAAC  
 TACCTGAAAATCCGCATCGAGAGCTGCGTGCAGGAGCTCAACAAGGAACTCCTCGAACCG  
 AGCAACATGCATGGCAGCTTCGCAACCTGTACCTCAACGTGGGCATGCGGGTGTCTTC  
 TTCATGCTGAACGACGGGGACCTTTCACCCATTGCAATCGGAAGGAGATCCAGGATGCG  
 ATCACGAAGTTCTTCGTGGAACCGATCATCCCGTGATAA

SEQ ID NO: 23

MBP-ValC-short

- 5 Proteína de fusión de MBP de *E. coli* y ValC-short de *Chamaecyparis nootkatensis*  
 Secuencia de aminoácidos

MKIEEGKLVWINGDKGYNGLAIEVGGKFEKDTGIKVTVEHPDKLEEKFPQVAATGDGPDII  
 FWAHDRFGGYAQSGLLAEITPKAFQDKLYPFTWDAVRYNGKLIAYPIAVEALS LIYNKDL  
 LPNPPKTWEEIPALDKELKAKGKSALMFNLQEPYFTWPLIAADGGYAFKYENGYDIKDV  
 GVDNAGAKAGLTFLVDLIKHKHMNADTDYSIAEAFNKGETAMTINGPWAWSNIDTSKVN  
 YGVTVLPTFKGQPSKPFVGVLSAGINAASPNKELAKEFLENYLLTDEGLEAVNKDKPLGAV  
 ALKSYEEELVKDPRIAATMENAQKGEIMPNIQMSAFWYAVRTAVINAASGRQTVDEALKD  
 AQTGDDDDKIMPVKDALRRGTGNHHPNLWTDDFIQSLNSPYSYSSYHKHREILIDEIRDMFS  
 NGEDEFVLENIWFDVVRQLGIDRHFQEEIKTALDYIYKFWNHDSIFGDLNMVALGFRI  
 LRLNRYVASSDVFKFKGEEGQFSGFESSDQDAKLEMMLNLYKASELDFPDEDILKEARA  
 FASMYLKHVIKEYGDIQESKNPLLMEIEYTFKYPWRCRLPRLEAWNFIHIMRQQDCNISLA  
 NNLYKIPKIYMKKILELAILDFNILQSQHHEMKLITWWKNSSAIQLDFFRHRHIESYFW  
 WASPLFEPEFSTCRINCKLSTKMFLDDIYDYGTVEELKPFTTTLTRWDVSTVDNHPDY  
 MKIAFNFSYIEIYKEIASEAERKHGPFVYKYLQSCWKSIEAYMQEAEWIASNHIPGFDEYL  
 MNGVKSSGMRILMIHALILMDTPLSDEILEQLDIPSSKSQALLSLITRLVDDVVKDFEDEQAH  
 GEMASSIECYMKDNHGSTREDALNYLKIRIESCVQELNKELLEPSNMHGSFRNLYLNVGM  
 RVIFFMLNDGDLFTHSNRKEIQDAITKFFVEPIIP

10 SEQ ID NO: 24

*set-valFpoR*

Gen sintético

Secuencia de nucleótidos

ATGGAAGAGGCTCGGTACCTCGACCGAAGAGACGCTGACGCCCGCGCAGGAAGCCGC  
 GCGCACCCGCGCGGCCAACAAGGCGCGCAAGGAAGCCGAGCTCGCCGCGGCCACCGCCG  
 AGCAGGGTGATGACGACGACAAGATTAATAGCTCGGGCGAGACCTTCCGCCCGACCGCC  
 GATTCATCCCTCGCTCTGGCGCAACCATTTCCTGAAGGGCGCTCCGACTTCAAGACC  
 GTCGATCACACGGCCACCCAGGAGCGCCACGAGGCGCTGAAGGAAGAGGTGCGCCGGAT  
 GATCACCGACGCCGAGGACAAGCCGGTGCAGAAGCTGCGGCTGATCGACGAGGTGCAGC  
 GTCTCGGCGTGGCCTATCACTTCGAGAAGGAGATCGAGGATGCGATCCAGAAGCTCTGCC  
 CGATCTACATCGACAGCAACCCGCGCCGATCTGCACACGGTCTCGCTGCATTTCCGGCTGC  
 TCGCCAGCAGGGCATCAAGATCTCCTGCGACGTCTTCGAGAAGTTCAAGGACGACGAGG  
 GCCGCTTCAAGTCTCGTGATCAACGACGTGCAGGGGATGCTGTGCTCTACGAGGCGG  
 CCTACATGGCGGTGCGCGGCGAGCATATCCTCGACGAGGCGATCGCCTTACCACCACC  
 ATCTGAAATCGCTCGTGGCGCAGGACCATGTACGCCGAAGCTCGCCGAGCAGATCAACC  
 ATGCGCTTACCGCCCGCTGCGCAAGACGCTGCCGCGCTCGAGGCGCGCTATTTTCATGT  
 CGATGATCAACTCGACCTCGGACCATCTTACAACAAGACGCTGTGAACTTCGCCAAGC  
 TCGACTTCAACATCTGCTCGAGCTGCACAAGGAAGAGCTGAACGAGCTGACGAAATGTT  
 GGAAGGATCTCGACTTCAACCACCAAGCTGCCATGCGCGCGACCCGCTGGTTCGAGCTCT  
 ATTTCTGGGATCTCGGCACCTATTTTCGAGCCGCGAGTATGCCTTCGGCCGCAAGATCATGA  
 CCCAGCTGAACTACATCCTCTCGATCATCGACGACACCTACGACGCTACGGCAGCTGG  
 AAGAGCTGTGCTTTCACCGAGGCGGTGCAGCGCTGGAACATCGAGGCGGTGACATG  
 CTGCCGGAATACATGAAGCTGATCTACCGCACGCTGCTCGATGCCTTCAACGAGATCGAG  
 GAAGACATGGCGAAAACAAGGGCGCAGCCACTGCGTGCCTATGCCAAGGAAGAGAACA  
 GAAGGTCATCGGCGCTATTCGGTCCAGGCGAAATGGTTCTCGGAAGGCTATGTCCCAC  
 GATCGAGGAATACATGCCGATCGCGCTGACCTCCTGCGCCTATACCTTCGTCATACCAA  
 CAGCTTCTCGGCATGGGCGACTTCGCCACCAAGGAAGTCTTCGAATGGATCTCGAACAA  
 CCCGAAGGTCGTCAAGGCGGCCTCGGTTCATCTGCCGGCTGATGGACGACATGCAGGGCC  
 ACGAGTTCGAGCAGAAGCGCGGCCATGTGCGCTCGGCCATCGAATGCTACACCAAGCAGC  
 ACGGCGTCTCGAAGGAAGAGGCGATCAAGATGTTTGAAGAGGAAGTGGCCAATGCCTGG  
 AAGGACATCAACGAGGAACCTGATGATGAAGCCCACCGTGTGGCCCGTCCGCTGCTCGGC  
 ACGATCCTGAACCTCGCCCGCGCCATCGACTTCATCTACAAGGAAGACGACGGCTATAACC  
 CATTCTATCTGATCAAGGACCAGATCGCCTCGGTCTCGGCGACCATGTGCCTTTTACATA  
 ATTGATAA

SEQ ID NO: 25

SET-ValFpoR

- 5 Proteína de fusión de péptido SET y ValFpoR de *Citrus x paradisi*  
 Secuencia de aminoácidos

MEEASVTSTEETLTPAQEAARTRAANKARKEAELAAATAEQGDDDDKINSSGETFRPTADF  
 HPSLWRNHFLKGASDFKTV DHTATQERHEALKEEVRRMITDAEDKPVQKLRLIDEVQRLG  
 VAYHFEKEIEDAIQKLCPIYIDSNRADLHTVSLHFRLRQGGIKISCDVFEKFKDDEGRFKSS  
 LINDVQGMLSLYEAYMAVRGEHILDEAIAFTTTHLKSLVAQDHVTPKLAEQINHALYRPL  
 RKTLPRLEARYFMSMINSTSDHLYNKTLNFAKLDNFILLELHKEELNELTKWWKDLDF  
 TKLPYARDRLVELYFWDLGTYFEPQYAFGRKIMTQLNYILSIIDDTYDAYGTLEELSLFTEA  
 VQRWNIEAVDMLPEYMKLIYRTLLDAFNEIEEDMAKQGRSHCVRYAKEENQKVIGAYSVQ  
 AKWFSEGYVPTIEEYMPIALTSCAYTFVITNSFLGMGDFATKEVFEWISNNPKVVKAASVIC  
 RLMDDMQGHEFEQKRGHVASAIECYTKQHGVSKEEAIKMFEEEVANAWKDINEELMMKP  
 TVVARPLLGTILNLARAIDFIYKEDDGYTHSYLIKDQIASVLGDHVPFIN

10 SEQ ID NO: 26

aaaS

Gen sintético

Secuencia de nucleótidos

ATGGCCCTGACCGAGGAAAAGCCGATCCGCCCCATCGCGAACTTCCCGCCCAGCATCTGG  
GGCGATCAGTTCCTGATCTACGAGAAGCAGGTGGAGCAGGGCGTCGAGCAGATCGTGAA  
CGATCTCAAGAAGGAGGTGCGGCAGCTGCTGAAGGAGGCCCTCGATATCCCATGAAGCA

CGCCAACCTCCTGAAGCTGATCGATGAAATCCAGCGCCTCGGCATCCCGTATCACTTCGA  
ACGCGAGATCGACCACGCGCTCCAGTGCATCTATGAGACCTACGGCGACAACCTGGAACGG  
CGACCGCTCGTCCCTCTGGTTCGCGCTGATGCGCAAGCAGGGCTATTACGTGACCTGCGA  
TGTCTTCAACAACATAAAGGACAAGAACGGGGCGTTCAAACAGTCGCTCGCGAACGACGT  
GGAGGGCCTGCTGGAGCTGTATGAGGCGACGAGCATGCGCGTCCCGGCGAGATCATCC  
TGGAGGACGCGCTCGGCTTACGCGCTCGCGCTCTCCATCATGACGAAGGACGCCTTCT  
CGACGAACCCGGCGCTGTTACCGAGATCCAGCGGGCGCTCAAGCAGCCGCTGTGGAAG  
CGCCTGCCCGCATCGAGGGCGGCGCAGTACATCCCCTTCTATCAGCAGCAGGATAGCCAT  
ACAAGACGCTCCTCAAGCTCGCGAAGCTCGAGTTCAACCTGCTGCAGTCGCTCCATAAG  
GAGGAGCTGTCCATGTGTGCAAGTGGTGAAGGCGTTCGATATCAAAAAGAACGCCCC  
TGCCTCCGGGACCGCATCGTCGAGTGCTATTTCTGGGGCCTGGGCTCGGGCTATGAGCCG  
CAGTACTCCCGCGCCCGGGTCTTCTTACCAAGGCGGTGGCGGTGATCACGCTCATCGAC  
GATACGTACGACGCCTACGGCACGTACGAGGAACTGAAAATCTTACCGAGGCCGTGGAA  
CGCTGGTCGATCACTGCCTCGATACGCTCCCGGAGTATATGAAGCCCATCTATAAGCTC  
TTCATGGATACCTATACCGAGATGGAGGAGTTCCTCGCGAAGGAGGGGCGCACGGACCTG  
TTCAACTGCGGCAAGGAGTTCGTCAAGGAGTTCGTGCGCAACCTGATGGTGGAGGCGAAG  
TGGGCCAACGAGGGGCATATCCCCACGACGGAGGAGCATGACCCCGTGGTGTATCATCAC  
CGGCGGCGCCAACCTGCTCACCACCACCTGCTACCTGGGCATGTCCGACATCTTACGAA  
GGAGAGCTGGAGTGGGCGGTGTCCGCCCCCGCTCTTCCGCTATTCCGGCATCCTG  
GCCGGCGTCAACGACCTCATGACCCACAAGCGGAGCAGGAGCGGAAGCACTCCTCG  
AGCAGCTGGAAGCTATATGAAGGAATATAACGTGAACGAGGAGTACGCCAGACGCTG  
ATCTACAAGGAGTTCGAGGATGTGTGGAAGGACATCAACCGGGAGTATCTCACGACGAAG  
AACATCCCCCGCCGCTCCTCATGGCGGTCATCTACCTCTGCCAGTTCCTGGAGGTCCAG  
TATGCGGGCAAGGATAATTTACGCGCATGGGCGATGAGTATAAGCACCTGATCAAGTCG  
CTGCTCGTGTACCCCATGTCGATCTGATAA

SEQ ID NO: 27

AaaS

5 *Artemisia annua*

Secuencia de aminoácidos

MALTEEKPIRPIANFPPSIWGDQFLIYEKQVEQGVQIVNDLKKEVRQLLKEALDIPMKHA  
NLLKLIDEIQRLGIPYHFEREIDHALQCIYETYGDNDWNGDRSSLWFRLMRKQGYVVTCDVF  
NNYKDKNGAFKQSLANDVEGLLELYEATSMRVPGEIILEDALGFTRSRLSIMTKDAFSTNP  
ALFTEIQRALKQPLWKRLPRIEAAQYIPFYQQQDSHNKTLKLALEFNLLQSLHKEELSH  
VCKWWWKAFDIKKNAPCLRDRIVECYFWGLGSGYEPQYSRARVFFTKAVAVITLIDDTYDAY  
GTYEELKIFTEAVERWSITCLDTLPEYMKPIYKLFMDTYTEMEEFLAKEGRTDLFNCGKEF  
VKEFVRNLMVEAKWANEGHIPTTEEHPVVIITGGANLLTTCYLGMSDIFTKESVEWAVS  
APPLFRYSGILGRRLNDLMTKAEQERKHSSSSLESYMKKEYNVNEEYAQTLYKEVEDVW  
KDINREYLTTKNIPRPLMAVIYLCQFLEVQYAGKDNFTRMGDEYKHLIKSLLVYPMSI

10 SEQ ID NO: 28

*mbp-aaaS*

Gen sintético

Secuencia de nucleótidos

ATGAAGATCGAGGAAGGCAAGCTCGTCATCTGGATCAACGGCGACAAGGGCTACAACGG  
 CCTCGCCGAGGTGGGCAAGAAGTTCGAGAAGGACACGGGCATCAAGGTACCGTTCGAGC  
 ATCCCGACAAGCTCGAGGAGAAGTTCCTCGAGGTTCGCGCCACCGGCGACGGCCCCGAC  
 ATCATCTTCTGGGCCACGACCGCTTCGGCGGTATGCGCAGTCGGGCCCTGCTCGCCGAG  
 ATCACGCCGACAAGGCCTTCCAGGACAAGCTCTATCCCTTACCTGGGATGCGGTGCGC  
 TACAACGGCAAGCTGATCGCCTATCCGATCGCCGTCGAGGCGCTGTGCTGATCTACAAC  
 AAGGATCTGCTGCCGAACCCGCGGAAGACCTGGGAAGAGATCCCGGCGCTCGACAAGGA  
 ACTGAAGGCCAAGGGCAAGTCCGCGCTGATGTTCAACCTGCAGGAGCCCTATTTACCTG  
 GCCGCTGATCGCCGCGACGCGGCTATGCTTCAAATACGAGAACGGCAAATACGACAT  
 CAAGGACGTGGGCGTCGACAATGCGGGCGCAAGGCCGGGCTGACCTTCTCGTTCGATC

TGATCAAGAACAAGCACATGAATGCCGACACCGACTATTCCATCGCCGAGGCGGCCCTTCA  
 ACAAGGGCGAGACCGCCATGACGATCAACGGGCCGTGGGCCTGGTTCGAACATCGACACC  
 TCGAAGGTCAATTACGGCGTACGGTGTGCGGACCTTCAAGGGCCAGCCCTCGAAACCC  
 TTCGTGCGCGTGTGCTGCGGCGGGCATCAACGCGGCCCTCGCCGAACAAGGAACTCGCCAA  
 GGAGTTCCTCGAGAACTACCTGCTGACCGACGAGGGGCTCGAGGCGGTGAACAAGGACA  
 AGCCGCTCGGCGCGGTGGCGCTGAAATCCTACGAGGAAGAGCTCGTCAAGGACCCGCGG  
 ATCGCCGCCACGATGGAGAATGCGCAGAAGGGCGAGATCATGCCGAACATCCCGCAGAT  
 GTCGGCCTTCTGGTATGCCGTCCGACCCGCGGTGATCAACGCGGCCCTCGGGCCGTCAGAC  
 CGTCGACGAGGCGCTGAAGGATGCGCAGACTGGTGTGACGACGACAAGATTATGGCCC  
 TGACCGAGGAAAAGCCGATCCGCCCCATCGCGAACTTCCCGCCAGCATCTGGGGCGATC  
 AGTTCCTGATCTACGAGAAGCAGGTGGAGCAGGGCGTTCGAGCAGATCGTGAACGATCTCA  
 AGAAGGAGGTGCGGCGAGCTGCTGAAGGAGGCCCTCGATATCCCCATGAAGCACGCCAAC  
 CTCCTGAAGCTGATCGATGAAATCCAGCGCCTCGGCATCCCGTATCACTTCGAACGCGAG  
 ATCGACCACGCGCTCCAGTGCATCTATGAGACCTACGGCGACAACCTGGAACGGCGACCCG  
 TCGTCCCTCTGGTTCGGCCTGATGCGCAAGCAGGGCTATTACGTGACCTGCGATGTCTTC  
 ACAAATAAGGACAAGAACGGGGCGTTCAAACAGTTCGCTCGCGAACGACCTGGAGGG  
 CCTGTGGAGCTGATGAGGCGACGAGCATGCGCGTCCCGGCGAGATCATCTGGAGG  
 ACGCGCTCGGCTTACGCGCTCGCGCCTCTCCATCATGACGAAGGACGCTTCTCGACGA  
 ACCCGGCGCTGTTACCGAGATCCAGCGGGCGCTCAAGCAGCCGCTGTGGAAGCGCCTG  
 CCCCAGATCGAGGCGGCGCAGTACATCCCTTCTATCAGCAGCAGGATAGCCATAACAAG  
 ACGTCTCTAAGCTCGCGAAGCTCGAGTTCAACCTGCTGCAGTCGCTCCATAAGGAGGAG  
 CTGTGCGATGTGTGCAAGTGGTGAAGGCGTTTCGATATCAAAAAGAACGCCCCCTGCCTC  
 CGGGACCGCATCGTTCGAGTGTATTTCTGGGGCCTGGGCTCGGGCTATGAGCCGAGTAC  
 TCCCGCGCCCGGGTCTTCTTACCAAGGCGGTGGCGGTGATCACGCTCATCGACGATACG  
 TACGACGCTACGGCACGTACGAGGAACTGAAAATCTTACCGAGGCCGTGGAACGCTGG  
 TCGATCACCTGCCTCGATACGCTCCCGGAGTATATGAAGCCATCTATAAGCTCTTCATGG  
 ATACCTATAACGAGATGGAGGAGTTCCTCGCGAAGGAGGGGCGCACGGACCTGTTCAACT  
 GCGGCAAGGAGTTCGTCAAGGAGTTCGTGCGCAACCTGATGGTGGAGGCGAAGTGGGCC  
 AACGAGGGGCATATCCCCACGACGAGGAGCATGACCCCGTGGTGTGATCATCACCGGCGG  
 CGCAAACCTGCTCACCAACCTGCTACCTGGGCATGTCGACATCTTACGAAGGAGAG  
 CGTGGAGTGGGCGGTGTCCGCCCCCGCTCTTCCGCTATTCGGGCATCCTGGGCCGCGG  
 GCTCAACGACCTCATGACCCACAAAGCGGAGCAGGAGCGGAAGCACTCCTCGAGCAGCCT  
 GGAAAGCTATATGAAGGAATATAACGTGAACGAGGAGTACGCCCAGACGCTGATCTACAA  
 GGAGGTCGAGGATGTGTGAAGGACATCAACCGGGAGTATCTCACGACGAAGAACATCC  
 CCCGCCGCTCCTCATGGCGGTCTACCTCTGCCAGTTCCTGGAGGTCCAGTATGCGG  
 GCAAGGATAATTTACGCGCATGGGCGATGAGTATAAGCACCTGATCAAGTTCGCTGCTCG  
 TGTACCCCATGTCGATCTGATAA

SEQ ID NO: 29

MBP-AaaS

- 5 Proteína de fusión de MBP de *E. coli* y AaaS de *Artemisia annua*  
 Secuencia de aminoácidos

MKIEEGKLVWINGDKGYNGLAEVGKKFEKDTGIKVTVEHPDKLEEKFPQVAATGDGPDII  
 FWAHDRFGGYAQSGLLAEITPDKAFQDKLYPFTWDAVRYNGKLIAYPIAVEALS LIYNKDL  
 LPNPPKTWEEIPALDKELKAKGKSALMFNLQEPYFTWPLIAADGGYAFKYENGYDIKDV  
 GVDNAGAKAGLTFVLVLIKNKHMNADTDYSIAEAAFNKGETAMTINGPWAWSNIDTSKVN  
 YGVTVLPFTFKGQPSKPFVGVLSAGINAASPNKELAKEFLENYLLTDEGLEAVNKDKPLGAV  
 ALKSYEEELVKDPRIAATMENAQKGEIMPNIQMSAFWYAVRTAVINAASGRQTVDEALKD  
 AQTGDDDDKIMALTEEKPIRPIANFPFSIWGDQFLIYEKQVEQGVEQIVNDLKKEVRQLLKE  
 ALDIPMKHANLLKLIDEIQRLGIPYHFEREIDHALQCIYETYGDNWNGDRSSLWFRLMRKQ  
 GYYVTCDFVFNKYKDKNGAFKQSLANDVEGLLELYEATSMRVPGEIILEDALGFTRSRLSIM  
 TKDAFSTNPALFTEIQRALKQPLWKRLPRIEAAQYIPFYQQQDSHNKTLLKLAKLEFNLLQS  
 LHKEELSHVCKWWKAFDIKKNAPCLRDRIVECYFWGLGSGYEPQYSRARVFFTKAVAVITL  
 IDDTYDAYGTYEELKIFTEAVERWSITCLDTLPEYMKPIYKLFMDTYTEMEEFLAKEGRIDL

FNCGKEFVKEFVRNLMVEAKWANEGHIPTTEEHDPPVVIITGGANLLTTTCYLGMSDIFTEKE  
 SVEWAVSAPPLFRYSGILGRRLNDLMTHKAEQERKHSSSSLESYMKEYNVNEEYAQTLIYK  
 EVEDVWKDINREYLTTKNIPRPLLMAVIYLCQFLEVQYAGKDNFTRMGDEYKHLIKSLLVY  
 PMSI

- 5 SEQ ID NO: 30  
65-3ATGDuetFw  
Cebador  
Secuencia de nucleótidos  
TATATGGATCCATGGCTGAAATGTTAATGGAAATTCCAGC
- 10 SEQ ID NO: 31  
DuetAS 1  
Cebador  
Secuencia de nucleótidos  
GATTATGCGGCCGTGTACAA
- 15 SEQ ID NO: 32  
cebador  
Secuencia de nucleótidos  
TTGTAAAACGACGGCCAGTG
- 20 SEQ ID NO: 33  
cebador  
Secuencia de nucleótidos  
GTGACACTATAGAATACTCAAGC
- 25 SEQ ID NO: 34  
Marcador de SET  
péptido  
EEASVTSTEETLTPAQEAARTRAANKARKEAELAAATAEQ

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Valenceno sintasa que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, o un homólogo funcional de cualquiera de estas secuencias, siendo dicho homólogo una valenceno sintasa que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 60 % con SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4.
- 10 2. Valenceno sintasa de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos 98 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4.
- 15 3. Ácido nucleico, que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una valenceno sintasa de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 o una secuencia complementaria de la misma.
- 20 4. Ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 3, en el que ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico como se muestra en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 u otra secuencia de ácido nucleico que codifica una valenceno sintasa de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia de al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 95 % con una cualquiera de las secuencias mostradas en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19.
- 25 5. Vector de expresión que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 3 o 4.
- 30 6. Una célula hospedadora, que puede ser un organismo en sí misma o parte de un organismo multicelular, comprendiendo dicha célula hospedadora un vector de expresión que comprende una secuencia de ácido nucleico heteróloga de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, seleccionándose preferentemente dicha célula hospedadora del grupo de células bacterianas, células fúngicas y células vegetales.
- 35 7. Una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la célula hospedadora es una célula bacteriana del grupo de bacterias gram negativas, en particular del grupo de *Rhodobacter*, *Paracoccus* y *Escherichia*, más en particular del grupo de *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Paracoccus carotinifaciens*, *Paracoccus zeaxanthinifaciens* y *Escherichia coli*.
- 40 8. Una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la célula hospedadora es una célula fúngica seleccionada del grupo de *Aspergillus*, *Blakeslea*, *Penicillium*, *Phaffia* (*Xanthophyllomyces*), *Pichia*, *Saccharomyces*, y *Yarrowia*, en particular del grupo de *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Blakeslea trispora*, *Penicillium chrysogenum*, *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*), *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, y *Yarrowia lipolytica*, más en particular del grupo de *Saccharomyces cerevisiae*, *Penicillium chrysogenum* y *Pichia pastoris*.
- 45 9. Planta transgénica o cultivo que comprende células vegetales transgénicas, comprendiendo dicha planta o cultivo células hospedadoras de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la célula hospedadora es de una planta transgénica seleccionada de *Nicotiana* spp, *Solanum* spp, *Cichorium intybus*, *Lactuca sativa*, *Mentha* spp, *Artemisia annua*, plantas formadores de tubérculos, tales como *Helianthus tuberosus*, yuca y *Beta vulgaris*, cultivos oleaginosos, tales como colza, canola, palmera, girasol, soja y cacahuete, plantas de cultivo líquido, tales como lenteja acuática, células BY2 de tabaco y *Physcomitrella patens*, árboles, tales como pino y chopo.
- 50 10. Hongo transgénico o cultivo que comprende células de hongos transgénicos, conteniendo dicho hongo o cultivo células hospedadoras de acuerdo con la reivindicación 6, en el que la célula hospedadora se selecciona de *Schizophyllum*, *Agaricus* y *Pleurotis*, en particular del grupo de *Schizophyllum commune*, *Agaricus bisporis*, *Pleurotis ostreotis* y *Pleurotis sapidus*.
- 55 11. Método para la preparación de valenceno, que comprende convertir un farnesil difosfato en valenceno en presencia de una valenceno sintasa de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el valenceno se prepara en una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 6, 7 u 8, una planta o cultivo vegetal de acuerdo con la reivindicación 9, o un hongo o cultivo de hongo de acuerdo con la reivindicación 10, que expresa dicha valenceno sintasa.
- 60 12. Método de acuerdo con la reivindicación 11, que comprende además aislar el valenceno de la célula, planta, cultivo vegetal, hongo o cultivo de hongo hospedador.
13. Método de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, que comprende además la etapa de convertir el valenceno en nootkatona, pudiendo comprender dicha conversión una hidroxilación regioespecífica de valenceno seguida de oxidación del mismo formando nootkatona, y opcionalmente aislando la nootkatona de la célula hospedadora.

14. Método de acuerdo con la reivindicación 13, en el que la nootkatona se prepara en una célula hospedadora que expresa una o más enzimas que catalizan una etapa de reacción para la conversión de valenceno a nootkatona.

15. Anticuerpo que se une específicamente a una valenceno sintasa de acuerdo con la reivindicación 1 o 2.